

ANDERSON LUIZ FERREIRA

**Atividade Antiulcerogênica da espécie
Anacardium humile St. Hil. (Anacardiaceae)**

Campinas

2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ANDERSON LUIZ FERREIRA

**Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St.
Hil. (Anacardiaceae)**

**Tese de mestrado apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Farmacologia.
Departamento de Farmacologia.
Universidade Estadual de Campinas-SP**

Orientadora Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito



**UNICAMP
2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F413a Ferreira, Anderson Luiz
 Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St.Hil.
(Anacardiaceae) / Anderson Luiz Ferreira. Campinas, SP : [s.n.],
2005.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito
Dissertação (Mestado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gastroproteção. 2. Úlcera gástrica. I. Brito, Alba Regina
Monteiro Souza II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Prof. Dr. Edgard Ferro Collares

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/09/2005

Filtro Solar

Desfrute do poder e da beleza de sua juventude.

Oh! esqueça. Você só vai compreender o poder e a beleza de sua juventude quando já tiverem desaparecido.

Mas, acredite em mim. Dentro de vinte anos, você olhará suas fotos e compreenderá, de um jeito que não pode compreender agora, quantas oportunidades realmente fabulosas se abriram para você.

Você não é tão gordo quanto você imagina.

Não se preocupe com o futuro.

Ou se preocupe, se quiser, sabendo que a preocupação é tão eficaz quanto tentar resolver uma equação de álgebra mascarando chiclete.

É quase certo que os problemas que realmente têm importância em sua vida são aqueles que nunca passaram por sua mente, tipo aqueles que tomam conta de você às 4 horas da tarde em alguma terça-feira ociosa.

Todos os dias faça alguma coisa que seja assustadora.

Cante!

Não trate os sentimentos alheios de forma irresponsável.

Não tolere aqueles que agem de forma irresponsável em relação a você.

Relaxe!

Não perca tempo com a inveja.

Algumas vezes você ganha, algumas vezes perde.

A corrida é longa e, no final, tem que contar só com você.

Lembre-se dos elogios que recebe.

Esqueça os insultos. (Se conseguir fazer isso me diga como).

Guarde suas cartas de amor.

Jogue fora seus velhos extratos bancários.

Estique-se!

Não tenha sentimento de culpa se não sabe muito bem o que quer da vida.

As pessoas mais interessantes que eu conheço não tinham, aos 22 anos, nenhuma idéia do que fariam na vida.

Algumas das pessoas interessantes de 40 anos que conheço ainda não sabem.

Tome bastante cálcio.

Seja gentil com seus joelhos.

Você sentirá falta deles quanto não funcionarem mais.

Talvez você se case, talvez não.

Talvez tenha filhos, talvez não.

Talvez se divorcie aos quarenta, talvez dance uma valsinha quando fizer 75 anos de casamento.

O que quer que faça, não se orgulhe nem se critique demais.

Todas as suas escolhas tem 50% de chance de dar certo.

Como as escolhas de todos os demais.

Curta seu corpo da maneira que puder.

Não tenha medo dele ou do que as outras pessoas pensem dele.

Ele é seu maior instrumento.

Dance, mesmo que o único lugar que você tenha para dançar seja sua sala de estar.

Leia todas as indicações, mesmo que você não as siga.

Não leia revista de beleza.

*A única coisa que elas fazem é mostrar você como uma pessoa feia.
Saiba entender seus pais.*

Você nunca sabe a falta que vai sentir deles.

Seja agradável com seus irmãos.

Eles são seus melhores vínculos com seu passado e aqueles que, no futuro, provavelmente nunca deixarão você na mão.

Entenda que os amigos vão e vêm, mas que há um punhado deles, preciosos, que você tem que guardar com carinho.

Trabalhe duro para transpor os obstáculos geográficos e da vida, porque quanto mais você envelhece tanto mais precisa das pessoas que conheceram você na juventude.

More em Nova Iorque, mas mude-se antes que a cidade transforme você em uma pessoa dura.

More no Norte da Califórnia, mas mude-se antes de torna-se uma pessoa mole.

Viaje!

Aceite as verdades eternas: os preços sempre vão subir; os políticos são todos mulherengos; você também vai envelhecer.

E quando envelhecer, vai fantasiar que, quando você era jovem, os preços eram acessíveis, os políticos eram nobres de alma e as crianças respeitavam os mais velhos.

Respeite as pessoas mais velhas.

Não espere apoio de ninguém.

Talvez você tenha uma aposentadoria.

Talvez você tenha um cônjuge rico.

Mas, nunca se sabe quando um ou outro podem desaparecer.

Não mexa muito em seu cabelo.

Senão, quando tiver quarenta anos, vai ficar com aparência de oitenta e cinco.

Tenha cuidado com as pessoas que lhe dão conselhos, mas seja paciente com elas.

Conselho é uma forma de nostalgia.

Dar conselho é uma forma de resgatar o passado da lata de lixo, limpá-lo, esconder as partes feias e reciclá-lo por um preço maior do que realmente vale.

Mas, acredite em mim quando eu falo do filtro solar.

Victor Hugo

*Agradeço a DEUS,
Por proporcionar saúde no decorrer desses anos e não deixar faltar vontade e muita
fé.*

*Aos meus pais,
João e Nicélia, por se privarem de seus anseios para me verem estudando,*

*Aos meus irmãos,
Celso, Sandro e Fabiana, pelo constante incentivo e ajuda.*

*À Daiane,
companheira de todas as horas.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito pela orientação, confiança e exemplo de ser humano.

À Profa. Dra. Leônia Maria Batista pela adoção em minha chegada ao laboratório e seu papel importante como minha “segunda mãe”.

À Dra. Elisângela Farias Silva pelas correções ortográficas e auxílio científico.

Ao Prof. Dr. Wagner Villegas pela colaboração imprescindível a esse projeto;

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima pelas constantes ajudas para a execução desse projeto.

À Profa. Nanci Dollevedo pelos ensinamentos didáticos e iniciação ao magistério.

À Dra. Audrey Barros di Sessa pelos conselhos importantíssimos para minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Edgard Ferro Collares pelas dicas preciosas durante a elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Heitor Moreno coordenador da pós-graduação pelo constante auxílio nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes e ao Prof. Miguel Arcanjo Areas pela participação na minha banca de qualificação.

À equipe do Laboratório de Produtos Naturais (Adriana, Ana Beatriz, Ana Carolina, Ana Cristina, Cibele, Débora, Déborah, Eduardo, Érica, Fabiana, Fernanda, Luciana, Maíra, Patrícia, Priscila, Rangel, Tatiane, Victor e Vinicius).

À equipe do Laboratório de Química Orgânica da Unesp de Araraquara, em especial, a Crystiane, pelos ensinamentos e colaboração para tornar esse projeto uma realidade.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia (Alexandra, Chico, Lécio, Ivo, Lú, Marcelo, Sandra e Zefa) pelo profissionalismo.

Ao secretário do Departamento de Farmacologia Vanderlei pelo esclarecimento de todas minhas dúvidas na excussão desse projeto.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Sumário	iii
Lista de fluxogramas, Ilustrações, figuras e tabelas e gráficos	vi
Lista de abreviaturas	viii
Resumo	ix
Abstract	xi
I INTRODUÇÃO	1
1 Considerações Gerais	1
1.1 Dados Epidemiológicos	2
1.2 Etiologia da Doença Péptica	3
1.3 Anatomia funcional do estômago	4
1.4 Secreção do suco gástrico	7
1.5 Mecanismos de proteção do estômago	9
2 Plantas medicinais	12
2.1 Moléculas farmacologicamente ativas que apresentam atividade antiulcerogênica	14
2.2 Flavonóides e Taninos e suas atividades biológicas	16
2.2.1 Flavonóides	16
2.2.3 Taninos	17
2.3 Espécie selecionada	19
II OBJETIVOS	21
III MATERIAIS E MÉTODOS	22
3. Preparação do material vegetal	22
3.1 Coleta e identificação da espécie em estudo	22

3.3	Preparação das frações acetato e aquosa	23
3.4	Drogas	24
3.5	Animais	25
3.6	Procedimentos Experimentais	25
3.6.1	Modelo de indução de úlcera gástrica pelo etanol em ratos	26
3.6.2	Modelo de indução de úlcera gástrica pela droga antiinflamatória não-esteroidal (Piroxicam) em camundongos	27
3.6.3	Modelo de indução de úlcera gástrica crônica pelo ácido acético em ratos	27
3.7	Determinação dos mecanismos de ação	29
3.7.1	Determinação da produção de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos	29
3.7.2	Determinação de muco aderido no estômago de ratos	30
3.7.3	Participação do Óxido nítrico endógeno envolvido na proteção obtida com as frações FAc e Faq	31
3.7.4	Participação dos Grupamentos Sulfidrilas não protéicos (SHs) endógenos na proteção das frações FAc e Faq	31
3.7.5	Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro	32
3.8	Análise estatística	32
IV	RESULTADOS	34
4.1	Descrição química da espécie em estudo	34
4.2	Modelo de indução de úlcera gástrica pelo etanol em ratos	36
4.2	Modelo de indução de úlcera gástrica pela droga antiinflamatória não-esteroidal (Piroxicam) em camundongos	38
4.3	Modelo de indução de úlcera gástrica crônica pelo ácido acético em ratos	41

4.4	Determinação dos mecanismos de ação	43
4.4.1	Determinação da produção de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos	43
4.4.2	Determinação de muco aderido no estômago de ratos	43
4.4.3	Participação do Óxido nítrico endógeno envolvido na proteção das frações FAc e FAq	45
4.4.4	Participação dos Grupamentos Sulfidrila não protéicos (SHs) endógenos envolvidos na proteção das frações FAc e FAq	47
4.4.5	Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro	48
V	DISCUSSÃO	51
VI	CONCLUSÕES	61
VI	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
VII	ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO	79

LISTA DE FLUXOGRAMA, FIGURAS, ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Fluxograma 1	Preparação do extrato metanólico e das frações acetato de etila e aquosa de <i>Anacardium humile</i> St. Hil.	25
Figura 1	Estruturas da mucosa gástrica	5
Figura 2	Células do epitélio gástrico	6
Figura 3	Representação esquemática da secreção ácida	9
Figura 4	Estrutura Básica dos Flavonóides	16
Figura 5	Estrutura Tanino Condensado	19
Figura 6	Monômeros de Taninos hidrolisáveis	19
Figura 7	<i>Anacardium humile</i> St. Hil.	20
Figura 8A e 8B	Perfil cromatográfico HPLC da <i>A. humile</i> St. Hil.	36
Figura 9	Índice de lesões ulcerativas induzidas por etanol em ratos após tratamento com EMeOH de <i>A. humile</i> St. Hil.	37
Figura 10	Índice de lesões ulcerativas induzidas por etanol em ratos após tratamento com a FAc de <i>A. humile</i> St. Hil.	38
Figura 11	Índice de lesões ulcerativas induzidas por etanol em ratos após tratamento com a FAq de <i>A. humile</i> St. Hil.	39
Figura 12	Índice de lesões ulcerativas induzidas por piroxicam em camundongos após tratamento com EMeOH de <i>A. humile</i> St. Hil.	40
Figura 13	Índice de lesões ulcerativas induzidas por piroxicam em camundongos após tratamento com FAc de <i>A. humile</i> St. Hil.	41
Figura 14	Índice de lesões ulcerativas induzidas por piroxicam em camundongos após tratamento com FAq de <i>A. humile</i> St. Hil.	41

Figura 15	Área de lesões ulcerativas induzidas por ácido acético em ratos após tratamento com a FAc obtido de <i>A. humile</i> St. Hil.	42
Figura 16	Área de lesões ulcerativas induzidas por ácido acético em ratos após tratamento com a FAq obtido de <i>A. humile</i> St. Hil.	43
Figura 17	Efeito da administração de FAc de <i>A. humile</i> St. Hil. e da injeção subcutânea de indometacina na produção de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) em ratos.	44
Figura 18	Efeito da FAc de <i>A. humile</i> St. no muco gástrico aderido em ligadura de piloro em ratos.	45
Figura 19	Efeito da FAq de <i>A. humile</i> St. no muco gástrico aderido em ligadura de piloro em ratos.	45
Figura 20	Índice de lesões ulcerativas em ratos pré-tratados com L-NAME no efeito protetor da FAc obtido de <i>A. humile</i> St. Hil.	46
Figura 21	Índice de lesões ulcerativas em ratos pré-tratados com L-NAME no efeito protetor da FAq obtido de <i>A. humile</i> St. Hil.	47
Figura 22	Índice de lesões ulcerativas em ratos pré-tratados com NEM no efeito protetor da FAc obtido de <i>A. humile</i> St. Hil.	48
Figura 23	Índice de lesões ulcerativas em ratos pré-tratados com NEM no efeito protetor da FAq obtido de <i>A. humile</i> St. Hil.	48
Tabela 1	Concentração dos metabólitos secundários presentes na FAc de <i>A. humile</i> St. Hil.	36

Tabela 2	Efeito da administração intraduodenal da FAc nos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro.	50
-----------------	--	----

Tabela 3	Efeito da administração intraduodenal da FAq nos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro.	50
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de etila

ALU – Área de lesão ulcerativa

CCK - colecistocinina

DAINE – Droga antiinflamatória não esteroideal

DCM – Diclorometano

d.p – Desvio padrão

EMeOH – Extrato metanólico

FAc – Fração acetato

FAq – Fração aquosa

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

ILU – Índice de lesões ulcerativas

L-NAME – *N*^G-nitro-L-arginina metil ester

MeOH - Metanol

NEM – *N*-etilmaleimida

NO – Óxido nítrico

PG's – Prostaglandinas

SHs – Compostos sulfidrilas

TNF- α - Tumor Necrosis Factor- α

v.o – Via oral

v.ip. – Via intraperitoneal

v. id. – Via intraduodenal

RESUMO

Anacardium humile St. Hil. conhecida popularmente como cajuzinho-do-cerrado é uma planta com hábito arbustivo que pertence à família *Anacardiaceae* e ao gênero *Anacardium*; é tipicamente tropical, sendo encontrada nos cerrados e em algumas regiões da Mata Atlântica. Essa planta é utilizada na medicina popular contra inflamações em gerais e distúrbios gastrointestinais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antiulcerogênica de extrato e frações da *A. humile* St. Hil. A partir do extrato metanólico (EMeOH) da *A. humile* St. Hil. duas frações foram obtidas, uma acetato (FAc) e outra aquosa (FAq). O EMeOH dessa espécie, nas doses de 250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹, via oral, foi estudado apenas em modelos de úlceras induzidas agudamente (etanol, piroxicam). Já as frações FAc e FAq nas doses de 50 e 200 mg.kg⁻¹, respectivamente, além dos modelos de úlceras induzidas agudamente (etanol e piroxicam); também foram avaliados no modelo crônico (ácido acético 30 %) em camundongos e ratos. A via intraduodenal foi empregada somente para as frações no modelo de ligadura do piloro. Tanto extrato, quanto frações, inibiram significativamente as lesões ulcerativas desencadeadas pelos diferentes agentes. Também foram observadas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica, como elevação do pH na FAq. Estes resultados sugeriram atividade anti-secretória e citoprotetora para essa fração. No pré-tratamento com as frações, apenas FAq produziu, no modelo de úlcera por ácido acético, redução da área da lesão. Adicionalmente, verificou-se que a atividade antiulcerogênica da FAc está relacionada ao aumento da PGE₂, justificando o aumento do muco aderido. Grupamento sulfidrilas protéicos parecem estar envolvidos com a atividade de ambas frações, enquanto que

óxido nítrico participa apenas da ação da fração FAc. Análises cromatográficas e RMN preliminares demonstraram que a FAc contém ácido gálico, galato de metila, catequina, amentoflavona. Na FAq as mesmas análises demonstraram uma grande quantidade de taninos. O conjunto de dados permite concluir que a atividade antiulcerogênica do extrato e das frações da *A. humile* St. Hil. está relacionada à ação anti-secretória dos taninos e dos flavonóides existentes nessa espécie.

ABSTRACT

Anacardium humile St. Hil. known as popularly “cajuzinho-do-cerrado” is a plant with arbustivo habit that belongs to the *Anacardiaceae* family and the *Anacardium* genus, is typically tropical, being found in the Cerrado, a savannah like vegetation and some regions of Mata Atlântica. This plant is used in the popular medicine against inflammations gastrointestinal. Thus, the objective of this work was to evaluate the antiulcerogenic activity of extract and fractions of the *A. humile* St. Hil. From the metanólico extract (EMeOH) of the *A. humile* St. Hil. two fractions had been gotten, an acetate (FAc) and another aqueous (FAq). The EMeOH of this species, in the doses of 250, 500 and 1000 mg.kg⁻¹, v.o. was studied only in models of induced ulcers acutely (ethanol, piroxicam). Already the fractions FAc and FAq in the doses of 50 and 200 mg.kg⁻¹ respectively, beyond the models of induced ulcers acutely (ethanol and piroxicam) the chronic model (acid acetic 30 %) was evaluated, in mice and rats. The intraduodenal way was only used for the fractions in the model of pylorus-ligated. As much extract how much fractions had inhibited significantly the ulcerative injuries unchained by the different agents. Significant alterations in the parameter biochemists had been observed in the gastric secretion, as rise of pH in the FAq. These results had suggested anti-secretory and citoprotetora activity for this fraction. In the pre-treatment with the fractions, only FAq produced, in the acetic acid-induced ulcers, reduction of the area of the injury. Additionally, the increase of mucus was verified that the antiulcerogenic activity of the FAc is related to the increase of the PGE₂, justifying the increase of adhered mucus. Endogenous sulfhydryl perish to be involved

with the activity of both fractions, while that nitric oxide is involved only with the FAc. Fraction preliminary chromatographic analyses and RMN they had demonstrated that the FAc contains acid gallic, methyl gallate, catequin, amentoflavone. In the FAq this analysis had demonstrated a great amount of tanning barks. The data set allows to conclude that the antiulcerogenic activity of the extract and the fractions of the *A. humile* St. Hil. is related to the anti-secretory activity of tannin and the existing flavonóides in this species.

I INTRODUÇÃO

1. Considerações Gerais

A pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e apresenta um caráter multidisciplinar, principalmente quando o objetivo da pesquisa é encontrar substâncias ativas úteis para a terapêutica. Nessas pesquisas, a experiência indica que a seleção da espécie a ser estudada deve levar em consideração a indicação popular de uso medicinal e o trabalho conjunto de uma equipe que tenha um esforço comum na identificação da espécie, no isolamento e determinação das substâncias ativas e na escolha e execução dos ensaios farmacológicos (SOUZA BRITO, 1996).

Para a escolha da planta *Anacardium humile* St. Hil. foi utilizada uma abordagem etnofarmacológica que, segundo SCHULTES (1995), é uma subdivisão da etnobotânica. Ela preocupa-se basicamente em estudar o conhecimento popular relativo às propriedades químicas e medicinais das plantas. A comparação de resultados obtidos com coleta de plantas, ao acaso ou quimiotaxonomicamente orientadas com aqueles obtidos com base no uso em medicina popular, tem gerado dados que demonstram que o conhecimento tradicional é indicativo de espécies que acumulam compostos bioativos (FRANÇA, 1999).

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com uma filosofia de multidisciplinaridade. Nesta filosofia, o grupo de pesquisadores é composto por profissionais com amplos conhecimentos e experiência em etnobotânica, fitoquímica, química de síntese, farmacologia e toxicologia. É necessária a conjunção de todos estes profissionais, num trabalho multidisciplinar e interativo, para a busca de novas

substâncias bioativas com potencial terapêutico (SOUZA BRITO, 1996; SOUZA BRITO e NUNES, 1997).

1.1 Dados epidemiológicos

Úlcera péptica são doenças crônicas que afetam de 8 a 10% da população dos países industrializados (PEZARD, 1995)

Apesar da diminuição na frequência de úlcera péptica causada pela infecção de *Helicobacter pylori*, a úlcera péptica permanece como o principal problema de saúde no mundo (SHIOTANI e GRAHAM, 2002).

Quase 2 milhões de americanos adultos têm úlcera ativa em alguma fase da vida. Sabe-se que 4 milhões de casos de úlcera péptica foram estimados nos Estados Unidos, contudo 500.000 novos casos são registrados anualmente (KURATA, 1989). A úlcera péptica alcança aproximadamente de 11 a 20% dos homens, e de 8 a 11% das mulheres (KURATA et al., 1992). No Japão, a proporção do sexo masculino para o feminino é de 2:1, sendo que a quantidade de úlceras gástricas é 1,5 vezes maior que as úlceras duodenais (WATANABE et al., 1992). Em países ocidentais em desenvolvimento, a proporção de úlcera duodenal para úlcera gástrica é oposta, com alta incidência de úlceras duodenais. A úlcera péptica causa grandes perdas econômicas e gastos com saúde por causa da baixa produtividade do trabalhador, atividades limitadas, visitas médicas e hospitalizações. Os gastos nos Estados Unidos com úlcera péptica alcançam US\$ 20 bilhões por ano. Infecção por *H. pylori* e úlceras gástricas ocasionadas por essa infecção decaíram nos Estados Unidos. Ao contrário, o uso de droga antiinflamatória não esteroideal (DAINE) permanece alto. Úlceras gástricas ocasionadas pelo uso crônico de DAINE, passaram de 9 para 31% e úlceras

duodenais de 0 para 19% (GRAHAM et al., 1991; LOEB et al., 1992). Hoje acredita-se que a infecção por *H. pylori* e o uso de DAINE são as maiores causas de úlcera gástrica (PAWLIK et al., 2002).

A recente introdução de inibidores seletivos de ciclooxigenase-2 (COX-2) pode resultar na redução das úlceras causadas pelo DAINE, mas isto pode ser compensado em parte pelo aumento do uso de aspirina para a profilaxia das doenças cardiovasculares. O risco de sangramento gastrointestinal na terapia com aspirina é cerca de 2.5% por ano, tornando-se inalterado com o uso de doses baixas (DERRY e LOKE, 2000).

No Brasil, os casos relacionados a esta patologia não são rigorosamente notificados. Isto torna praticamente impossível obter dados epidemiológicos confiáveis da incidência desta patologia.

No entanto, é sabido que um aspecto importante a ser analisado, quando se decide pelo trabalho aplicado a uma dada classe terapêutica em particular, as úlceras pépticas nesse caso, é a incidência da morbidade na população que reflete sua importância em saúde pública; além disso, o mercado (local e mundial) aponta na direção de se estudar substâncias potencialmente úteis contra esta patologia (MCINTOSH et al., 1991; ALPER, 1993; PETERSEN et al., 1995).

1.2 Etiologia da Doença Péptica

Nos últimos vinte anos, o estudo das doenças relacionadas à úlcera péptica gástrica e duodenal tem aumentado significativamente devido a identificação de várias técnicas, as quais têm possibilitado o estudo mais detalhado da mucosa gástrica (BRZOZOWSKI, 2003).

Originalmente, acreditava-se que todas as úlceras do trato gastrointestinal eram causadas apenas pela ação agressiva do ácido clorídrico e da pepsina sobre a mucosa. Assim tornaram-se conhecidas como “úlceras pépticas”. As úlceras provavelmente resultam de vários mecanismos (RICHARDSON, 1993). Atualmente, sabe-se que o desequilíbrio entre fatores agressivos e mecanismos protetores da mucosa (BROZOWSKI, 2003), a infecção por *Helicobacter pylori* e drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) são os maiores responsáveis por danos à mucosa gastroduodenal (PAWLIK et al., 2002).

Adicionalmente, outros fatores envolvidos na patogênese da úlcera péptica gástrica, incluindo predisposição genética, secreção ácida alterada, rápido esvaziamento gástrico, defeito nos mecanismos de defesa da mucosa, estresse físico e psicológico, além do tabagismo (QUAN e TALLEY, 2002) e a ingestão de bebidas contendo álcool ou cafeína (RICHARDSON, 1993).

1.3 Anatomia funcional do estômago

O trato gastrointestinal é constituído pelo tubo digestivo e suas glândulas secretoras anexas, sendo responsável pela digestão e absorção dos nutrientes encontrados no bolo alimentar, funcionando ao mesmo tempo, como barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o interno (SANIOTO, 1991).

De acordo com KUTCHAI (1996), o estômago pode ser anatomicamente e funcionalmente dividido em quatro regiões revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo e antro. A mucosa gástrica, por sua vez, é constituída por uma série de depressões e glândulas (WOLFE e SOLL, 1988) (Figura 1). Nas depressões estão as células epiteliais superficiais, enquanto que a porção glandular contém as células

mucosas cervicais, parietais, pépticas ou principais e algumas endócrinas (DOCKRAY et al., 1996) (Figura 2).

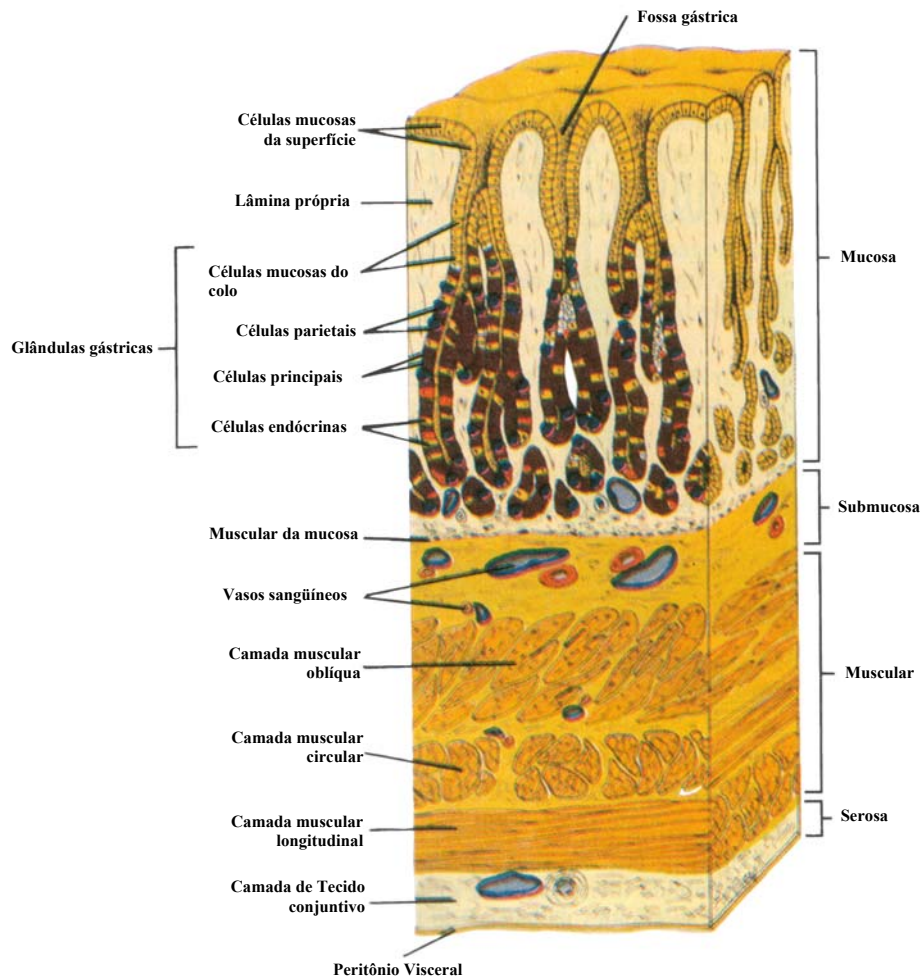


Figura 1: Estruturas da mucosa gástrica (Retirada de Schaaf, 1993. Guanabara Koogan).

As células parietais (secretoras de ácido clorídrico) e as células principais (secretoras de pepsinogênio) estão localizadas primariamente no fundo e no corpo, enquanto que as células secretoras de gastrina estão no antro (WOLFE e SOLL, 1988).

O estômago de um humano contém aproximadamente um bilhão de células parietais ou oxínticas (WOLFE e SOLL, 1988).

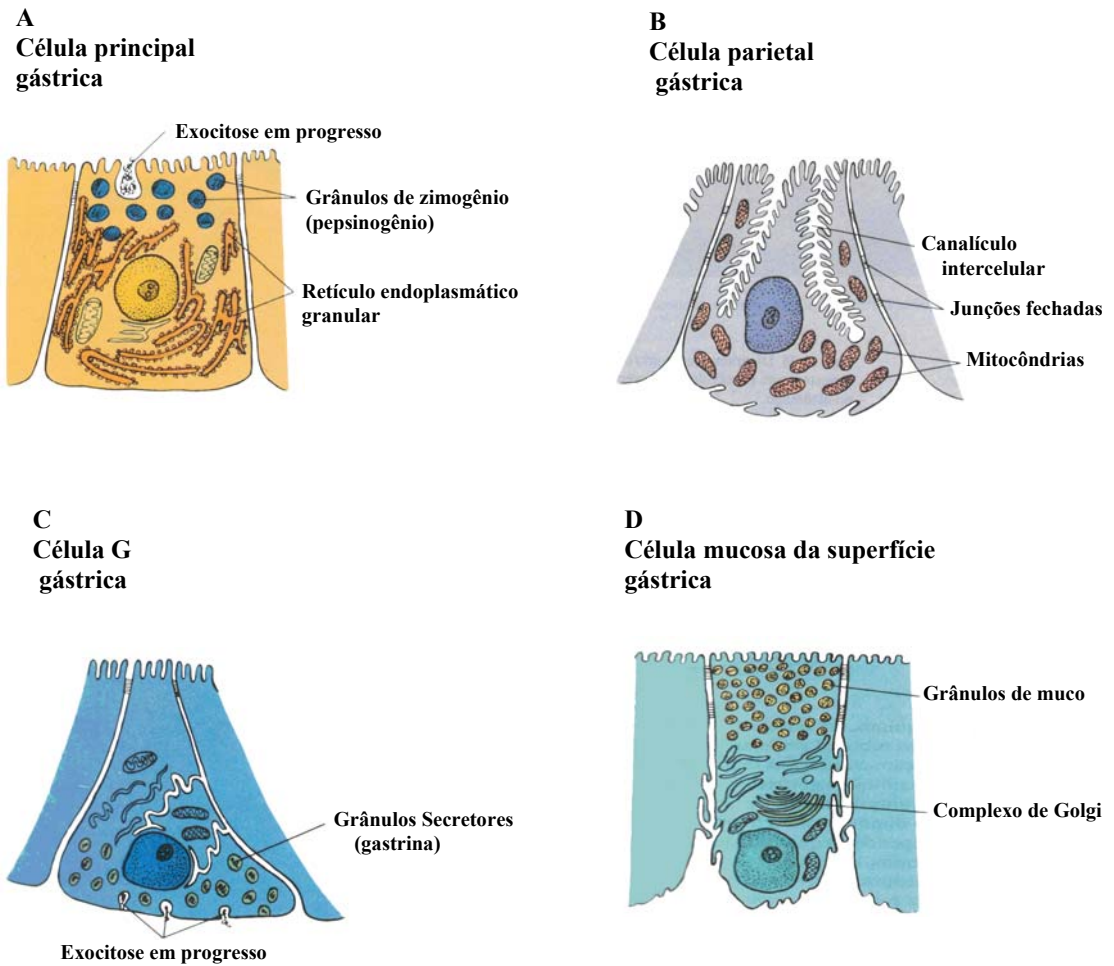


Figura 2. Células do epitélio gástrico: Estão representadas as células encontradas nas glândulas da mucosa gástrica: célula péptica (A) responsável pela secreção de pepsina e fator intrínseco, célula parietal (B) responsável pela secreção de HCl, célula G (C) responsável pela síntese e secreção de gastrina e célula mucosa cervical (D) responsável pela síntese e secreção de muco e bicarbonato (Retirada de Schauf, 1993. Guanabara Koogam).

1.4 Secreção do suco gástrico

A secreção ácida gástrica é produzida pelas células oxínticas, um dos diversos tipos de células presentes nas glândulas gástricas (YAO e FORTE, 2003). Essa secreção é o aspecto mais importante da função gástrica estudada na prática médica. A influência de alterações nessa função tem sido considerada no desenvolvimento de drogas (POHLE e DOMSCHKE, 2003).

O processo de secreção consiste em três etapas, duas das quais são estimulatórias (fase encefálica e fase gástrica) e outra inibitória (fase intestinal). Estes estágios começam através de fenômenos neurológicos - cheiro ou memória, visualização dos alimentos, drogas e outras substâncias ingeridas (CHAVEZ, 1996).

Algumas vias de sinalização intracelular têm sido identificadas como importantes contribuintes na ativação da célula parietal incluindo: proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), calmodulina - Ca^{+2} (Cam), fosfatidil inositol (IP3) e várias outras quinases (YAO e FORTE, 2003).

Três substâncias químicas endógenas constituem os agonistas responsáveis por estimular a célula parietal a secretar ácido clorídrico:

Acetilcolina – liberada a partir do nervo vago, atua sobre receptores muscarínicos, provavelmente do tipo M_3 , estimulando a secreção ácida da célula parietal, elevando os níveis de Ca^{+2} intracelular. Sua liberação está associada a estímulos provenientes do olfato, visão, paladar ou mastigação e ainda aqueles provenientes do estímulo de neurônios locais da parede gástrica através da distensão das paredes do estômago com a chegada do alimento (HIRSCHOWITZ et al., 1995; KUTCHAI, 1996).

Gastrina – hormônio liberado a partir do antro, estimula receptores CCK-B da célula parietal, induzindo aumento da secreção ácida através do aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} , como a acetilcolina. A gastrina é liberada em resposta a produtos da digestão tais como aminoácidos (ZAVROS et al., 2002), além da estimulação vagal e da alcalinização do antro (DOCKAY et al., 1996; KUTCHAI, 1996).

Histamina – CODE e WATKINSON (1955) estabeleceram que a histamina era um quimio estimulador das células oxínticas melhor que a gastrina dado que: 1) histamina age diretamente na célula oxíntica; 2) histamina foi detectada em grande quantidade na mucosa gástrica, localmente liberada pelas células ECL, possuindo a histamina descarboxilase para transformar histidina em histamina; 3) histaminase que poderia destruir efetivamente a histamina, não pode ser detectada na mucosa oxíntica; 4) histamina é liberada por estimulantes da secreção ácida como alimento ou gastrina. A histamina atua em receptores H_2 e a sua liberação promove o aumento da secreção ácida por elevar os níveis intracelulares de AMPc (DOCKAY et al., 1996).

Várias H^+/K^+ ATPases localizadas em túbulos ou vesículas citoplasmáticas, após o estímulo, fundem-se com a membrana plasmática na superfície luminal das células parietais. Esta fusão aumenta a área de superfície canalicular pela formação de microvilos. As H^+/K^+ ATPases, atuam como bombas de prótons na etapa final da secreção de íons H^+ em troca dos íons K^+ . Assim sendo, os íons H^+ e Cl^- formam uma solução ácida extremamente importante às funções do estômago (LIND et al., 1983; HIRSCHOWITZ et al., 1995).

As alternativas terapêuticas disponíveis para regulação da secreção ácida buscam modificar a influência neural por meio de cirurgias, por alterar os mecanismos que

envolvem os segundos mensageiros na célula parietal, através da utilização de antagonistas muscarínicos ou histamínicos, assim como pela alteração do último evento da cascata de reações envolvidas com a secreção, utilizando inibidores da bomba protônica (HIRSCHOWITZ et al., 1995). A produção do ácido depende, numa primeira etapa, da histamina, acetilcolina e gastrina, primeiros mensageiros do processo (CHAVEZ, 1996).

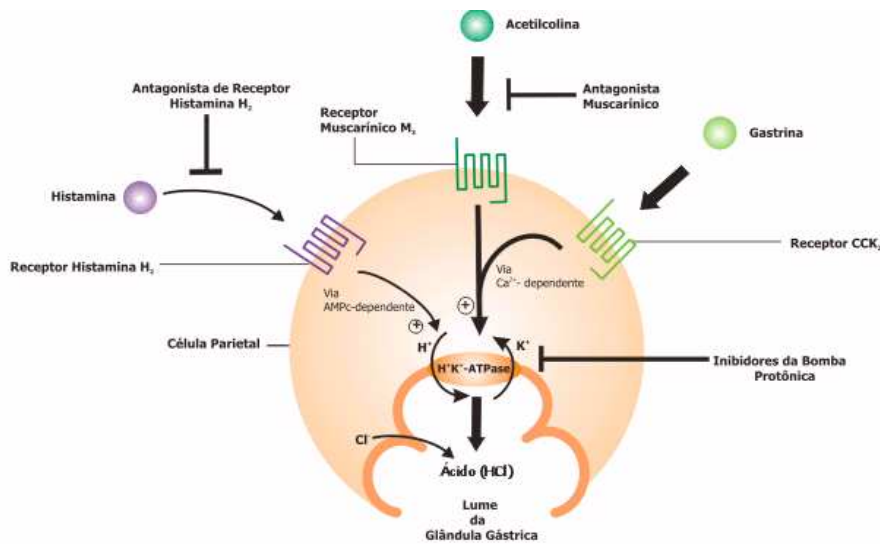


Figura 3. Representação esquemática da secreção ácida gástrica. Adaptado de Olbe et al., 2003.

1.5 Mecanismos de proteção do Estômago

O mecanismo de defesa da mucosa gastrointestinal contra fatores agressores, como o ácido clorídrico, ácido biliar e drogas antiinflamatórias não-esteroidais, consiste principalmente de fatores funcionais, humorais e neurais. A secreção do muco alcalino, microcirculação da mucosa e motilidade agem como fatores funcionais, enquanto que prostaglandina e óxido nítrico agem como fatores humorais e os neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina agem como fatores neurais (TSUKIMI e

OKABE, 2001; REPETTO e LLESUY, 2002). Dentre os fatores protetores da mucosa gástrica, são considerados como mais importantes:

Muco – É um fator de proteção da mucosa o qual, apresenta-se de forma viscosa, elástica, aderente, como um gel transparente, que contém 95% de água e 5% de glicoproteínas, recobrando toda a superfície da mucosa gastrointestinal. O muco é capaz de agir como antioxidante e reduzir danos na mucosa promovidos por radicais livres (REPETTO e LLESUY, 2002). Foi proposto que o muco seria o agente responsável por uma contínua “cobertura” na superfície da mucosa, a qual secreta bicarbonato pelo epitélio; por essa razão, o muco agiria como camada por onde ocorre a difusão do ácido luminal e sua conseqüente neutralização. Essa hipótese é sustentada pela demonstração do gradiente de pH que atinge níveis abaixo de 2, enquanto que a superfície do epitélio permanece com pH próximo à neutralidade (GARNER et al., 1984). O muco também protege a mucosa contra as forças mecânicas da digestão, retendo água e diminuindo a difusão de íons H^+ da luz para a membrana apical das células parietais, além de lubrificar a superfície gástrica (FORTE, 1986).

Bicarbonato – A proteção da mucosa do estômago não depende somente do controle da secreção ácida gástrica; há necessidade também de uma secreção adequada de muco e bicarbonato pelas células mucosas cervicais e superficiais do epitélio (WALLACE e GRANGER, 1996). Tanto a secreção de muco, quanto a de bicarbonato, são estimuladas por diversos fatores e formam a chamada “barreira mucoprotetora” (SANIOTO, 1991; KUTCHAI, 1996), que é de extrema importância na proteção da mucosa contra danos induzidos por ácido, pepsina e etanol (WALLACE e GRANGER, 1996). O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago e pelas glândulas de Brünner do duodeno permanecendo em

grande parte, abaixo ou na camada mucosa. Deste modo, a superfície mucosa fica em contato com o líquido que contém pH elevado em relação à luz do estômago que, em condições normais, irá neutralizar os íons H^+ que se difunde entre a luz e as células epiteliais (WALLACE e GRANGER, 1996).

Fluxo sangüíneo – O fluxo sangüíneo na mucosa mantém a estrutura e a função do estômago e está associado às doenças gástricas e cicatrização de lesões gastrointestinais. É regulado e modificado por sistemas e fatores metabólicos locais como prostaglandina, leucotrieno e outros mediadores químicos endógenos na mucosa (KAWANO e TSUJI, 2000). Um dos papéis do fluxo sanguíneo na mucosa é suprir a mucosa gástrica com oxigênio, nutrientes e hormônios, além de participar da regulação da saída do ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato, remoção dos produtos e retrodifusão de íons hidrogênio. Esses eventos contribuem substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa (KAWANO e TSUJI, 2000).

Reconstituição – O termo reconstituição refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida. As células gástricas estão ligadas à membrana basal da célula epitelial e este local é bastante sensível aos danos induzidos por ácido (PAIMELA et al., 1995). Tendo ocorrido dano na mucosa, forma-se uma “capa mucóide” sobre o local lesionado, que consiste de fragmentos celulares, muco e plasma (incluindo proteínas tais como fibrina e albumina). A capa mucóide provém um microambiente que conduz à reconstituição epitelial; o pH da capa mucóide é mantido em torno de 5 (WALLACE et al., 1991). A manutenção desse pH relativamente alto, nesse microambiente, é dependente de um suprimento contínuo de

sangue na região. Sem essa capa mucóide ocorre queda do pH causando lesões hemorrágicas graves (WALLACE et al., 1996)

Prostaglandina – A ação protetora das prostaglandinas envolve fluxo sanguíneo, estimulação de muco, secreção de bicarbonato (HAWKEY, 2000) e aumento da resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (HAWKEY e RAMPTON, 1985). Um dos mecanismos através do qual a prostaglandina diminui a resposta inflamatória e reduz a gravidade do dano na mucosa é a modulação da atividade de imunócitos na mucosa. As PGE₁, PGE₂, PGA₁, bem como os análogos das PGE₂, são responsáveis pela inibição da secreção gástrica enquanto que, principalmente as PG's do tipo E, F e as prostaciclina, encontradas na mucosa gástrica e intestinal, são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato e pelo aumento do fluxo sangüíneo da mucosa. Em conjunto, estes prostanóides atuam na prevenção da formação das úlceras gastrointestinais e auxiliam no processo de cicatrização das lesões já existentes (EBERHART e DUBOIS, 1995; TABATA et al., 1996). As funções vasodilatadoras e protetoras da mucosa gástrica das PG's têm sido extensivamente documentadas e estudadas (GISLASON et al., 1995; WHITTLE e VANE, 1987).

2. Plantas Medicinais

As plantas têm sido, desde os primórdios da civilização, recursos acessíveis ao ser humano. Durante milênios, o homem empiricamente aprofundou seu conhecimento para a cura de suas enfermidades, demonstrando assim uma estreita relação entre o uso de plantas medicinais e sua evolução.

No século XX a humanidade se encontra perplexa diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico, presente nas plantas medicinais. As descobertas de substâncias com atividades farmacológicas, muitas vezes já confirmadas pelo uso popular, passam a ser cientificamente comprovadas. Este momento passou a gerar interesses e incentivos institucionais e governamentais (MIGUEL e MIGUEL, 2000).

Desde a última década, as indústrias farmacêuticas têm demonstrado grande interesse nos estudos de plantas, visando descobrir novas estruturas de moléculas com potenciais atividades biológicas (HAMBURGER e HOSTETTMAN, 1991). O isolamento de composto de origem vegetal provocou, nos últimos anos, um surpreendente desenvolvimento na indústria farmacêutica (YAMADA, 1998). Várias empresas nacionais empregam matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de medicamentos (DI STASI, 1996).

A quantidade de evidências relativas às atividades biológicas de compostos derivados de planta aumentou durante a última década (KONSTANTOULOPOULOU et al., 1992). Porém, existem muitas espécies vegetais que são usadas sem se que se saiba exatamente qual sua composição química e se possuem componentes potencialmente tóxicos, o que pode representar um grande risco a saúde pública (GAILLARD e PEPIN, 1999). Sem o estudo adequado de plantas medicinais, tornam-se inviáveis o estabelecimento de parâmetros necessários ao uso seguro da mesma como fitoterápico, como por exemplo, o estabelecimento da dose terapêutica e de possíveis reações colaterais (GAILLARD e PEPIN, 1999; KONSTANTOULOPOULOU et al., 1992).

SHELDON et al. (1997) relatam que dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 80% dos países subdesenvolvidos fazem uso de plantas medicinais, as quais se encontram incorporadas a um sistema de medicina tradicional.

Assim, as plantas são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que podem ser utilizadas, não apenas como modelo para síntese e obtenção de novos fármacos, mas também como uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (GONZALES et al., 2000; SCHENKEL et al., 1999).

Como estratégia para investigação de plantas medicinais, o método etnofarmacológico permite a formulação de hipóteses quanto à(s) atividades(s) farmacológica(s) e à(s) substâncias ativa(s) responsáveis pelas ações terapêuticas relatadas pelas populações usuárias (SIMÕES, 2001). O interesse de conferir se são reais as atividades anunciadas pela medicina popular estimula a interdisciplinaridade, associando-se ao trabalho etnobotânico, os trabalhos farmacológico e químico (DI STASI, 1996).

Concluídos os ensaios fitoquímicos e farmacológicos, torna-se necessária a produção de um medicamento para comercialização necessitando, porém, de parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos, tais como a correta descrição botânica, testes de identidade, requisitos de pureza, ensaios químicos, determinação dos constituintes químicos majoritários, farmacologia, contra-indicações, perigos, precauções, reações adversas e posologia (WHO, 2000).

É, portanto, necessário que se realize um esforço no sentido de que as espécies brasileiras sejam avaliadas segundo critérios similares, a fim de que nossas plantas possam ser usadas com segurança e ao mesmo tempo que aumente o valor agregado a elas.

2.1 Moléculas farmacologicamente ativas que apresentam atividade antiulcerogênica

De acordo com recentes publicações, muitas plantas medicinais têm sido evidenciadas como úteis no tratamento de desordens gástricas. Como exemplos temos: *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. (BATISTA et al., 2004) e *Byrsonima crassa*, que possuem compostos que atuam como “varredoras” de espécies reativas de oxigênio na superfície da mucosa gástrica (SANNOMIYA et al., 2005).

Contudo, existe na flora mundial um grande número de espécies usadas na medicina popular, a exemplo da *Melissa officinalis* (GURBUS et al., 2000), *Mentha piperita*, *Silybum marianum* (KHAYYAL et al., 2001), *Brassica oleracea*, *Maytenus aquifolium*, *Symphytum officinalis*, *Zolernia ilifolia* (ALONSO, 1998) que são utilizadas no tratamento da úlcera gástrica por produzirem atividade antiulcerogênica dose-dependente associada à redução da acidez, aumento da secreção de mucina, diminuição da síntese de leucotrienos e aumento na produção e liberação de PGE₂ (REPETTO e LLESUY, 2002).

Os compostos obtidos de plantas medicinais com atividade antiulcerogênica apresentam estruturas químicas diversas e distintos mecanismos de ação. Dentre as principais classes de compostos relacionados a essa atividade têm-se: terpenos, triterpenos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, saponinas e polissacarídeos (LEWIS e HANSON, 1991).

Substâncias com atividade antiulcerogênica, obtidas a partir de plantas medicinais, exercem seus efeitos estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, aumentando a síntese de prostaglandina e/ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato, ou ainda inibindo a secreção gástrica (LEWIS e SHAW, 2001; BORRELI e IZZO, 2000).

Na pesquisa envolvendo plantas com atividades antiulcerogênica, devemos considerar como relevantes os seguintes dados:

- I- A úlcera péptica é uma patologia que apresenta uma elevada incidência em nosso país;
- II- Essa doença crônica, já que é quase sempre recorrente, requer uma intervenção endoscópica-terapêutica, que necessita, em muitos casos, de processo cirúrgico, acarretando transtornos financeiros para o indivíduo e também para o sistema de saúde;
- III- Não existe no mercado farmacêutico nenhum produto com 100% de eficácia os medicamentos existentes são de alto custo, efeitos limitados na patologia crônica, além de apresentarem efeitos colaterais e reações adversas;
- IV- As plantas possuem de compostos terapêuticos, potencialmente ativos, o que se constitui em grande estratégia para a descoberta de novos fármacos;
- V- A matéria-prima utilizada na produção dos produtos farmacêuticos é importada, o que representa dependência para a indústria farmacêutica nacional.

É nesse contexto que os produtos naturais devem ser discutidos na farmacologia e que, posteriormente, podem vir a ser usados para o tratamento e cura da úlcera péptica (LEWIS e HANSON, 1991).

2.2 Flavonóides e Taninos e suas atividades biológicas

2.2.1 Flavonóides

Os flavonóides são membros de uma classe de compostos naturais que recentemente tem sido assunto de interesse científico e terapêutico (MUKOHATA et al., 1978).

Os flavonóides são pigmentos das plantas sintetizados a partir da fenilalanina; (figura 4).

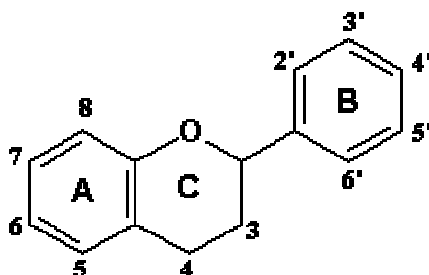


Figura 4. Estrutura básica dos flavonóides

Geralmente os flavonóides produzem colorações admiráveis nas pétalas das flores e, na maioria das vezes, emitem fluorescência brilhante quando excitadas por luz UV; são ubíquos em células de plantas verdes podendo assim supor sua participação no processo fotossintético (MUKOHATA et al., 1978; HAVSTEEN, 2002).

Os flavonóides são utilizados por botânicos para classificação taxonômica. Eles regulam o crescimento da planta pela inibição da exocitose da auxina (ácido indol acético), assim como pela indução da expressão gênica e influenciam outras células em numerosas vias. Flavonóides inibem o crescimento ou matam muitas cepas bacterianas, inibem importantes enzimas virais como transcriptase reversa e proteases, bem como destroem alguns protozoários patogênicos. Todas essas atividades são exercidas com baixa toxicidade em células animais (HAVSTEEN, 2002).

Flavonóides são os maiores componentes funcionais de plantas medicinais para uso médico, como a própolis, que tem sido usada desde a antiguidade. A clínica atual

indica o uso de flavonóides puros para o tratamento de muitas doenças, devido às suas habilidades comprovadas de inibirem enzimas específicas, estimularem alguns hormônios e neurotransmissores e seqüestrarem radicais livres (HAVSTEEN, 2002). Flavonóides também tem efeito considerável como agente gastroprotetor, mas esses compostos são pouco estudados em humanos (ZAYACHKIVSKA et al., 2005). Eles são capazes de proteger a mucosa gástrica de substâncias necrotizantes e podem ser úteis na terapia de ulcerações gástricas agudas e crônicas (ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

2.2.2 Taninos

O termo tanino é utilizado para definir duas classes distintas de compostos químicos de natureza fenólica: os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados (PIZZI, 1993). O primeiro grupo é constituído de misturas de fenóis simples, tais como pirogalol e ácido elágico, e também ésteres do ácido gálico ou di-gálico com açúcares, principalmente glicose (HERGERT, 1989). Os taninos hidrolisáveis apresentam comportamento químico semelhante aos fenóis, substituídos com baixa reatividade com o formoldeído.

Numa linguagem genérica, PIZZI (1993) afirma que os taninos condensados consistem de unidades de flavonóides possuindo diferentes graus de condensação e estão invariavelmente associados com seus precursores, denominados de flavan-3-ols (catequina) e flavan 3-4 diols (leucoantocianidinas).

Os taninos vegetais ou naturais são, por definição, substâncias que apresentam a propriedade de se associar e de se combinar com proteínas e certos polióis (HERGERT, 1989). Os taninos condensados e seus flavonóides precursores são

conhecidos por sua larga distribuição, estando presentes na casca de todas as folhosas e coníferas examinadas até hoje (HERGERT, 1989). Eles estão presentes freqüentemente em várias essências florais (HASLAM, 1967; PORTER, 1998).

Assim como os flavonóides, vários outros compostos fenólicos (incluindo taninos condensados e hidrolisados e seus metabólitos) têm sido isolados de plantas medicinais e suas atividades biológicas e farmacológicas foram revisadas por OKUDA et al (1992). Essas substâncias são conhecidas por terem efeitos benéficos contra úlceras gastrointestinais (KHENNOUF et al., 1999).

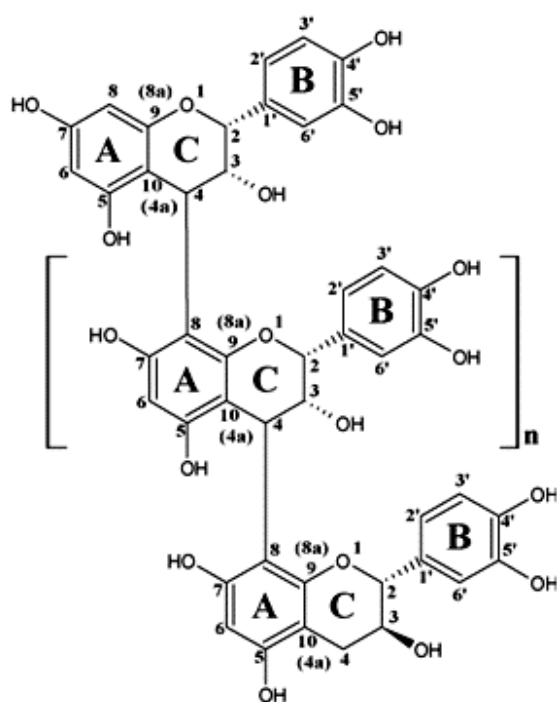


Figura 5. Estrutura de Tanino Condensado

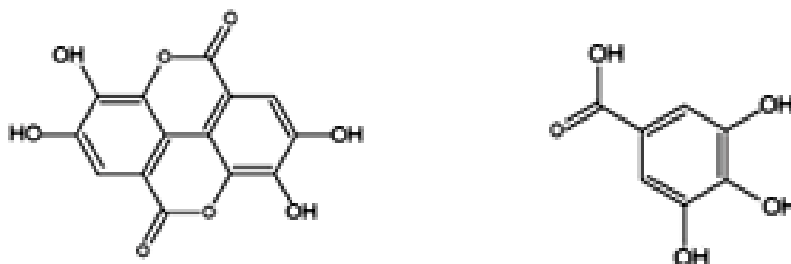


Figura 6. Monômeros de Taninos Hidrolisáveis

2.3 Espécie Seleccionada

Anacardium humile St. Hil. (Anacardiaceae), descrita por Auguste Sant-Hilare (1779-1853), é um vegetal com hábito arbustivo podendo chegar a 50 cm, formando uma touceira aberta com muitos ramos a partir de um sistema subterrâneo bem desenvolvido. As folhas são brilhantes, sem tricomas, alternas, ovadas com apêndice alargado. As flores são delicadas, vermelho-rosadas e os frutos são acinzentados em forma de rim com uma semente (castanha). Já o pedúnculo é bem desenvolvido (pseudofruto), vermelho com polpa esbranquiçada (SILVA et al., 2001). Pertence à família Anacardiaceae que consiste de 79 gêneros e mais de 600 espécies.



Figura 7: *Anacardium humile* St. Hil.

A. humile St. Hil é conhecida popularmente como cajueiro do campo, caju do cerrado, caju, cajuzinho do campo, cajuzinho do cerrado. A utilização da planta é

muito ampla; o fruto (pseudofruto) é usado na fabricação de suco, doces, vinhos e na indústria de plástico e verniz. Na medicina popular a planta é usada nas inflamações de garganta (casca), como purgante (raiz), como antidiarréico (folha), em calosidades, verrugas, dor de dente e manchas de pele (resina), além da confecção do gel dental com as cinzas (POTT e POTT, 1994).

Esta espécie é encontrada no bioma Cerrado do planalto central, na Mata Atlântica e Nordeste do Brasil, embora possa ser encontrada até o sul do Trópico de Capricórnio, no estado do Paraná e no Paraguai (POTT e POTT, 1994).

II OBJETIVOS

1. Isolar os princípios farmacologicamente eficazes a partir das frações ativas, a partir das folhas pelo menos no que diz respeito à classe química.
2. Avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato e das frações obtidas a partir das folhas utilizando a espécie *Anacardium humile* St. Hil. em modelos clássicos de indução de úlcera gástrica em ratos e camundongos;
3. Avaliar o possível mecanismo de ação antiulcerogênica relacionado à prevenção das úlceras gástricas induzidas por diferentes agentes em ratos e em camundongos;

III MATERIAIS E MÉTODOS

3. Preparação do Material Vegetal

3.1 Coleta e identificação da espécie em estudo

As folhas da espécie, *Anacardium humile* St. Hil, foi coletada na rodovia Monte do Carmo, Porto Nacional – Tocantins e identificada por Marcos Alves e Eduardo Ribeiro. Um exemplar foi depositado no Herbário de Tocantins com o Voucher nº. 1922. Para a condução dos experimentos foram utilizados:

3.2 Preparação do Extrato Metanólico e Frações Acetato e Aquosa

Em conjunto com o Prof. Dr. Wagner Villegas do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, folhas secas ao ar e moídas (650 g) de *A. humile* St. Hil. foram exaustivamente extraídas com 5 L diclorometano (DCM) e 5 L de metanol (MeOH), sucessivamente, em temperatura ambiente (uma semana para cada solvente). Os solventes foram evaporados em 60°C sobre pressão reduzida, originando os extratos DCM (6 g) e MeOH (193 g). Uma porção do extrato MeOH (80 g) foi particionada com 5 L de uma mistura EtOAc/água rendendo 3.4 g da fração acetato (FAc) e 74 g da fração aquosa (FAq). Flavonóides foram detectados na Fac como descrito por (WAGNER et al 1984).

Uma porção (1 g) do extrato MeOH de *A. humile* St. Hil. foi fracionada por cromatografia de permeação em gel em uma coluna de Sephadex LH-20 (Pharmacia) (5 cm x 100 cm) e eluída com MeOH (fluxo 0.5 ml.min⁻¹). Cem frações (5 mL cada) foram coletadas e verificadas por Cromatografia de Camada Delgada em placas de sílica gel, eluídas com uma mistura de CHCl₃/MeOH/n-PrOH/H₂O (5:6:1:4; fase inferior) e desenvolvido tanto com Produtos Naturais - Reagente de revelação: polietilenoglicol ou com reagente de revelação: anisaldeído/ácido sulfúrico (WAGNER et al 1985). As frações foram combinadas subseqüentemente e purificadas por HPLC usando um sistema Knauer Chance equipado com detector do índice de refração Waters R401, uma coluna de fase reversa Phenomenex Luna RP 18 (25 cm X 1 cm X 10 µm) e um injetor Rheodyne com 100 µl de loop. MeOH-H₂O (8:2, v/v) foi usado como eluente (fluxo 2 ml.min⁻¹). As frações 64-72 (150 mg) renderam ácido gallico (50 mg) and metil galato (75 mg); frações 98-103 (75 mg) renderam (+)-catequina (50 mg); frações 119-124 (35 mg) renderam quercetina-3-*O*-β-D-allopyranoside (5 mg) e quercetina-3-*O*-β-D-galactopyranoside (8 mg); frações 144–149 (35 mg) renderam quercetina-3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (rutina, 8 mg); e frações 178–200 (200 mg) renderam o biflavonoide amentoflavona (165 mg). Todas as substâncias isoladas foram analisadas por RMN e os dados comparados com aqueles reportados na literatura (HARBONE 1993; AGRAWAL 1989).

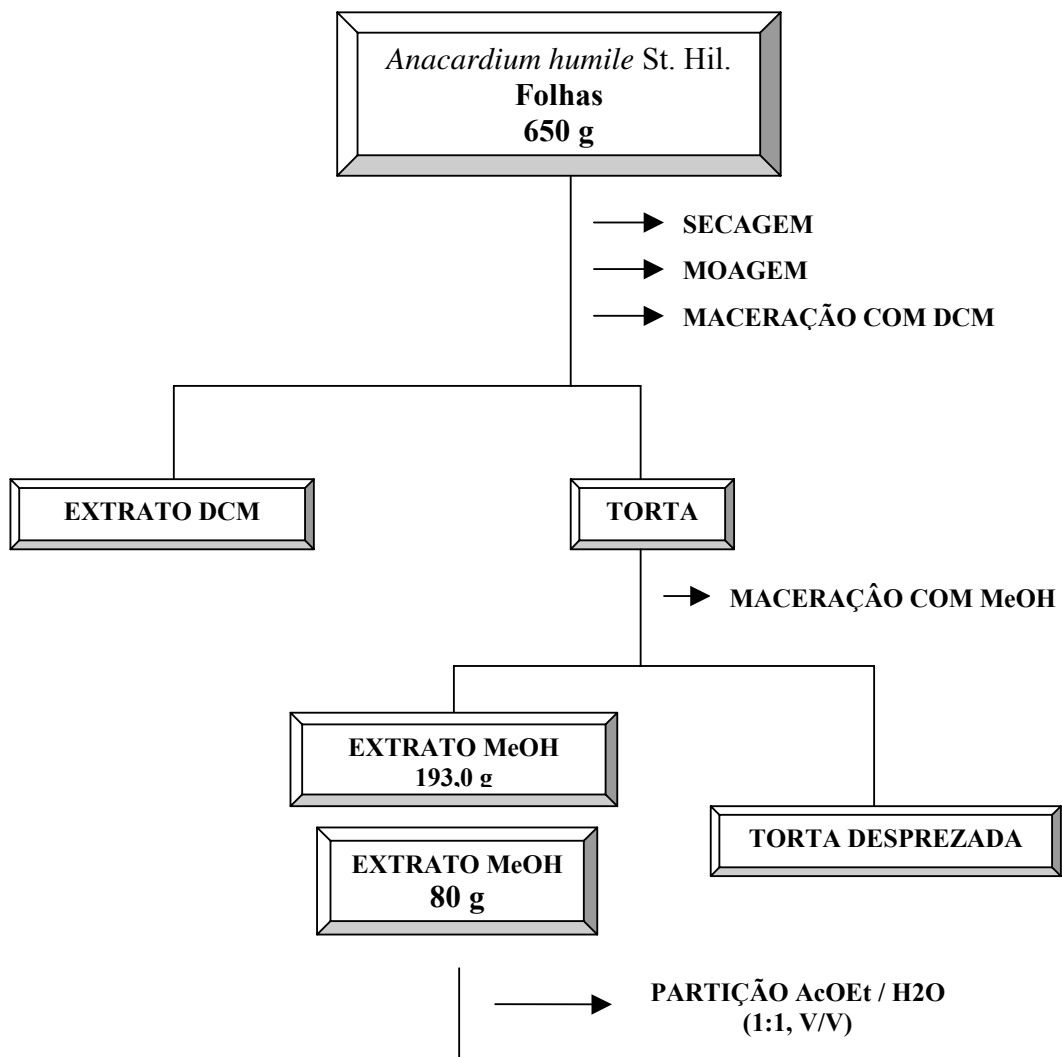
O perfil cromatográfico da FAc foi obtido usando um sistema HPLC (ProStar, Varian) equipado com um detector ultravioleta ProStar 330 com detector de arranjo de fotodiodos (PDA), um injetor Rheodyne (20 µl), uma coluna Phenomenex Luna RP-

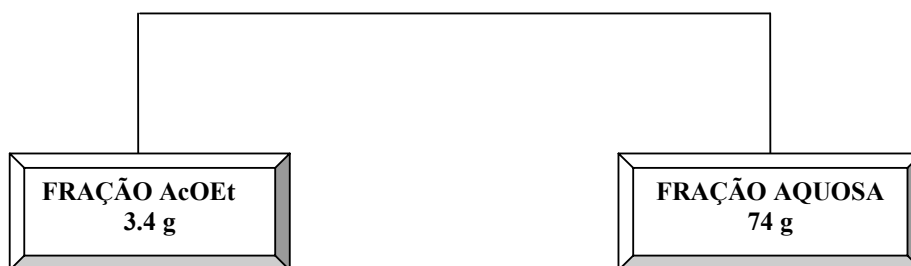
18 (250 x 4.6 mm i.d. 5 μ m) e uma coluna de guarda RP-18 Phenomenex (4 x 4.6 mm, i.d. 5 μ m). A eluição foi realizada em gradiente linear de água (A) e acetonitrila (B) (com 0.05% de ácido trifluoroacético) 23 a 30% do B em 5 min, então 30 to 48% do B em 40 min e então 48 to 100% do B em 65 min. O fluxo foi 1.0 ml.min⁻¹ e o efluente foi monitorado em 210 nm e em 360 nm.

A determinação da concentração dos metabólitos na FAc foi executada usando calibração externa. Os flavonóides foram expressos em termos de rutina, na faixa de calibração de 5 - 500 μ g.ml⁻¹ ($y = -4,81.10^5 + 1,91.10^5 x$, R = 0,9999, N = 6); derivados do ácido gálico foram expressas em termos de ácido gálico, na faixa de calibração de 2 - 200 μ g.ml⁻¹ ($y = -9,69.10^4 + 2,38.10^5 x$, R = 0,9998, N = 9); catequinas foram expressas nos termos de (+)-catequina, na faixa de calibração de 1 - 70 μ g.ml⁻¹ ($y = 1,40.10^5 + 8,93.10^5 x$, R = 0,9999, N = 6).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) em DMSO-d₆ foram obtidos por um espectrômetro Varian INOVA 500 operado em 500 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C. As análises 2D incluiu ¹H-¹H-COSY (Espectroscopia de Correlação), inverso detectado ¹H-¹³C HSQC (Coerência Heteronuclear Múltiplo Quântica) e HMBC (Coerência Heteronuclear com Ligações Múltiplas).

Espectrometria de Massas por Electrospray (ESI-MS) foi feita usando um instrumento Fisons VG platform, operando em (70 V). As amostras foram dissolvidas no metanol e injetadas diretamente no espectrofotômetro de massas através de um injetor Rheodyne. Acetonitrila foi usado como solvente e nitrogênio foi usado como gás de secagem e para o nebulização.





Fluxograma 1: Preparação do extrato metanólico e das frações acetato de etila e aquosa de *A. humile* St. Hil.

3.4 Drogas

Para determinação da atividade e mecanismo de ação antiulcerogênica foram utilizadas: cimetidina (SIGMA Chemical Co, U.S.A), lansoprazol 30 mg (MEDLEY, Brasil), piroxicam 20 mg (HEXAL, Brasil), ácido acético P.A. (CHEMCO, Brasil) e ácido clorídrico P.A. (CHEMCO, Brasil). O extrato bruto e a fração aquosa foram dissolvidos em solução salina preparada com Cloreto de Sódio P.A. (CHEMCO, Brasil) e a fração acetato foi dissolvida em Tween 80[®] a 12% (SYNTH, Brasil). Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso.

3.5 Animais

Todos os animais utilizados, ratos (180 a 220 g) e camundongos (25 a 35 g), foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP, protocolo

número 538-1). Foram sempre utilizados camundongos Swiss albinos machos ou ratos Wistar machos com pesos adequados para cada uma das metodologias empregadas. Todos os animais foram aclimatados às condições do biotério por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, com temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5 \%$ e ciclos claro-escuro controlados de 12 horas, alimentados com ração Nuvital (NUVILAB[®]) e água ad libitum. Os animais foram distribuídos ao acaso nos diferentes grupos experimentais e submetidos a diferentes períodos de jejum, de acordo com cada metodologia.

3.6 Procedimentos Experimentais

Para avaliar a atividade antiulcerogênica do EMeOH foram realizados experimentos de indução de úlcera gástrica em camundongos Swiss. (modelos de piroxicam) e em ratos Wistar (modelo de etanol). Com as frações FAc e FAq foram realizados além dos modelos utilizados com EMeOH, o modelo de ácido acético em ratos Wistar. Já para avaliar os mecanismos de ação das frações FAc e FAq foram determinados: concentração de prostaglandina, quantidade de muco aderido, envolvimento de óxido nítrico (NO) e compostos sulfidrila (SHs) na citoproteção e em outros parâmetros bioquímicos como pH, volume da secreção gástrica. O extrato e as frações foram administrados em diferentes doses, por via oral, com exceção da ligadura do piloro onde a administração foi intraduodenal.

Para cada um dos modelos experimentais foram utilizados grupos de animais que serviram como controle positivos (tratados com cimetidina ou lansoprazol) e controle negativos (Tween 80[®] a 12% ou solução de NaCl 0,9 %)

Em todos os experimentos de indução de úlcera gástrica, as lesões ulcerativas foram contadas e classificadas de acordo com a severidade da lesão como proposto por SZELENYI e THIEMER (1978): lesão de nível 1 (pontos hemorrágicos < 1 mm), nível 2 (úlceras de 2 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas de 3 mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesão ulcerativa (ILU), obtido através da equação:

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

3.6.1 Modelo de indução de úlcera gástrica pelo etanol em ratos

Esse modelo foi realizado de acordo com MORIMOTO et al. (1991). Após 24 horas de jejum, os grupos experimentais foram tratados com solução de NaCl 0,9 % (controle negativo), lansoprazol 30 mg.kg⁻¹ (controle positivo) ou EMeOH obtido de *A. humile* St. Hil. nas doses 250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹, 1 hora antes da indução da lesão pela administração de etanol. Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose/volume final de 10 ml.kg⁻¹.

A lesão gástrica foi induzida pela administração oral de 1 ml de etanol absoluto. Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical; em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura. Após esse procedimento, foram determinados os índices de lesões ulcerativas (ILU). Em outro momento, este mesmo experimento foi realizado; porém, um pré-tratamento dos animais com FAc (obtida de *A. humile* St. Hil. em doses de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹) e Tween 80 a 12 % ou com FAq nas doses de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹ e solução NaCl 0,9 %, sendo que tanto o Tween quanto a salina serviram de como controle negativo.

3.6.2 Modelo de indução de úlcera gástrica pela droga antiinflamatória não-esteroidal (Piroxicam) em camundongos

Este método foi realizado conforme descrito por HAYDEN et al. (1978) com modificações em PUSCAS et al. (1997). Após 36 horas de jejum, os grupos experimentais foram tratados 30 minutos antes da indução da lesão. Grupos de animais receberam solução de NaCl 0,9 % (controle negativo), cimetidina 100 mg.kg⁻¹ (controle positivo) e o EMeOHs obtidos de *A. humile* St. Hil. nas doses de 250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹. Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose/volume final de 10 ml.kg⁻¹.

A lesão gástrica foi induzida pela administração subcutânea de piroxicam 30 mg.kg⁻¹. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura, e determinado o índice de lesões ulcerativas (ILU). Em outro plano, este mesmo experimento foi realizado, porém fazendo pré-tratamento dos animais com FAc obtida de *A. humile* St. Hil. em doses de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹, utilizando cimetidina 100 mg.kg⁻¹ como controle positivo e Tween 80 a 12 % como controle negativo e a FAq nas doses de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹, utilizando cimetidina 100 mg.kg⁻¹ como controle positivo e solução NaCl 0,9 % como controle negativo.

3.6.3 Modelo de indução de úlcera gástrica crônica pelo ácido acético em ratos

Diferentes ensaios foram realizados utilizando as FAc e FAq, nas doses de 50 e 200 mg.kg⁻¹, conforme técnica descrita por TAKAGI et al. (1969). Ratos foram anestesiados com Ketamina (30 mg.kg⁻¹) e Xilazina (0,3 mg.kg⁻¹), para exposição do

estômago através de uma incisão de aproximadamente 2 cm realizada abaixo da apófise xifóide. No estômago exposto foram injetados, com auxílio de uma microseringa, 0,05 ml de uma solução de ácido acético a 30 %, na camada subserosa da junção do fundo para o antro. Dois dias após a inoculação do ácido, foram iniciados os tratamentos, por via oral, com as frações FAc e FAq, cimetidina 100 mg.kg⁻¹ como controle positivo, Tween 80 a 12 % e solução NaCl 0,9 % como controles negativos, respectivamente. Os tratamentos persistiram por 14 dias consecutivos.

Ao final do tratamento, os animais em jejum de 12 horas, foram sacrificados e seus estômagos removidos e abertos no sentido da maior curvatura para determinar a área da lesão. As úlceras foram determinadas através da medida do comprimento e da largura das lesões, observando-se os dois maiores eixos em ângulo de 90°, com auxílio de um paquímetro digital Digimatic (Mitutoyo Corporation da Caliper, Japão) sendo seu produto expresso em mm², denominado área da lesão ulcerativa (ALU). A fórmula utilizada para obtenção da ALU é descrita a seguir, sendo o produto final obtido através da multiplicação do eixo maior da lesão, denominada comprimento (c), pelo eixo que cruza o primeiro exatamente na metade em 90 °, sendo este eixo a largura (l) da lesão.

$$\text{Área da Lesão Ulcerativa} = (c) \cdot (l) = \text{mm}^2$$

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

$$(\text{ALU}) C$$

Após a determinação da área da lesão ulcerativa, a região que circunscribe a lesão foi removida e submetida à análise para quantificação do “Epidermal Growth Factor” (EGF) e ensaios histológicos.

3.7 Determinação dos Mecanismos de Ação

3.7.1 Determinação da produção de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos

O comportamento da fração FAc obtida a partir de *A. humile* St. Hil. em relação à produção de prostaglandina, na presença ou ausência de anti-inflamatórios não-esteroidais.

Esse experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por CURTIS et al. (1995), com pequenas modificações. Ratos Wistar machos, pesando entre 150 e 160 g, foram tratados com Tween 80 a 12 % (controle negativo), cimetidina 100 mg mg.kg⁻¹ ou FAc de *A. humile* St. Hil. 50 mg.kg⁻¹, todos por via oral. Outros grupos, tratados com estas mesmas amostras, foram submetidos previamente a uma administração de indometacina 30 mg mg.kg⁻¹ (um inibidor da ciclooxigenase, precursor da prostaglandina). Uma hora após o tratamento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O estômago foi retirado e aberto, a mucosa foi raspada até sua total remoção. O conteúdo gástrico foi pesado e homogeneizado utilizando homogeneizador Polytron® PT – 10-35 Kinematica AG - Switzerland, sendo logo colocado em uma solução de tampão sódio fosfato (10 nM, pH 7.4), esta solução permaneceu incubada em banho Maria (Dubnoff Tecnal – Brazil) a 37° C, por um período de 20 minutos. A prostaglandina presente no tampão foi determinada utilizando “kit” imunoenzimático (RPN222 – Amesham).

3.7.2 Determinação de muco aderido no estômago de ratos

Objetivando investigar o envolvimento de muco na citoproteção apresentado pelas frações FAc e FAq de *A. humile* St. Hil., seguiu a metodologia descrita por RAFATULLAH et al. (1990). Grupos de ratos, pesando entre 200-250 g, permaneceram em jejum por um período de 36 horas; sob anestesia de Ketamina (30 mg.kg⁻¹) e Xilazina (0,3 mg.kg⁻¹), o abdome foi aberto para a ligadura do piloro. Cada grupo teste recebeu 10 ml.kg⁻¹ da solução NaCl 0,9 % (controle negativo), carbenoxolona 200 mg.kg⁻¹ (controle positivo) ou FAq de *A. humile* St. Hil. 200 mg.kg⁻¹ enquanto outro grupo recebeu Tween 80 a 12 % (controle negativo), carbenoxolona 200 mg.kg⁻¹ (controle positivo) ou FAc de *A. humile* St. Hil. 50 mg.kg⁻¹, todos por via oral. Quatro horas após a amarradura do piloro, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, as incisões foram reabertas, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura e, cada um foi mergulhado imediatamente em 10 ml de uma solução de 0.1% “Alcian Blue” (0.16 M sacarose/0.05 M acetato de sódio, pH 5.8) durante duas horas. Após esse período o excesso do “Alcian Blue” foi removido primeiro por um banho de 15 e depois outro de 45 minutos em 10 ml de sacarose a 0.25 M. Os estômagos foram seqüencialmente transferidos para uma solução de cloreto de magnésio a 0.5 M, permanecendo nessa solução por 2 horas. Quatro mililitros dessa solução foram agitados vigorosamente junto com 4 ml de éter. O resultado dessa emulsão foi centrifugado a 3600 rpm e a absorbância do extrato azul foi determinada em ELISA a 580 nm.

3.7.3 Participação do Óxido Nítrico endógeno envolvido na proteção das frações FAc e FAq

Para investigar o envolvimento de NO endógeno no efeito protetor das frações FAc e FAq de *A. humile* St. Hil., seguiu-se a metodologia descrita por MATSUDA et al. (1999). Após 24 horas de jejum, todos os grupos experimentais foram pré-tratados com L-NAME (70 mg.kg⁻¹) e solução salina (i.p) 30 minutos antes da administração oral. Após 30 minutos, os animais receberam Tween 80 a 12 % (controle negativo), carbenoxolona 100 mg.kg⁻¹ (controle positivo) ou a FAc obtida de *A. humile* St. Hil. na dose de 50 mg.kg⁻¹ (v.o); outro grupo recebeu solução NaCl 0,9 % (controle negativo), carbenoxolona 100 mg.kg⁻¹ (controle positivo) ou FAq obtida de *A. humile* St. Hil. na dose de 200 mg.kg⁻¹ (v.o). Uma hora após a administração oral, as lesões foram induzidas pela administração (v.o) de 1 ml de etanol absoluto.

Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, em seguida os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura. Após esse procedimento foi determinado o índice de lesões ulcerativas (ILU), como descrito acima.

3.7.4 Participação dos Grupamentos Sulfidrilas (SHs) endógenos envolvidos na proteção das frações FAc e FAq

Para investigar o envolvimento de compostos sulfidrilas endógenos no efeito protetor das frações FAc e FAq de *A. humile* St. Hil., seguiu-se a metodologia descrita por MATSUDA et al. (1999). Após 24 horas de jejum, todos os grupos experimentais foram pré-tratados com NEM (10 mg.kg⁻¹) e solução salina (subcutânea) 30 minutos antes da administração oral. Após 30 minutos, os animais receberam Tween 80 a 12 %

(controle negativo), carbenoxolona 100 mg.kg⁻¹ (controle positivo) ou FAc obtida de *A. humile* St. Hil. na dose de 50 mg.kg⁻¹ (v.o); outro grupo recebeu solução NaCl 0,9 % (controle negativo), carbenoxolona 100 mg.kg⁻¹ (controle positivo) ou FAq obtida de *A. humile* St. Hil. na dose de 200 mg.kg⁻¹ (v.o). Uma hora após a administração oral, as lesões foram induzidas pela administração de (v.o) de 1 ml de etanol absoluto.

Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura. Após esse procedimento foi determinado o índice de lesões ulcerativas (ILU), como descrito anteriormente.

3.7.5 Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro

Os experimentos de ligadura do piloro em ratos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por SHAY et al. (1945). Após 36 horas de jejum os animais, sob anestesia com Ketamina (30 mg.kg⁻¹) e Xilazina (0,3 mg.kg⁻¹), sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para localização e amarradura do piloro. A administração da FAc e FAq (50 mg.kg⁻¹ e 200 mg.kg⁻¹), cimetidina 100 mg.kg⁻¹ (controle positivo) e Tween 80 (12 %) para FAc e solução NaCl 0,9 % para FAq (controle negativo), todos em dose final de 10 ml.kg⁻¹, foram realizados logo após a amarradura, por via intraduodenal (Morimoto et al., 1991). Quatro horas após a cirurgia, os ratos foram sacrificados, as incisões reabertas e, mantendo-se a ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) os estômagos foram retirados. O conteúdo estomacal foi coletado e pesado logo em seguida. Esse conteúdo foi expresso

em mg. O pH foi determinado em pHmêtro (modelo Q 400A Quimis Aparelhos Científico Ltda – Brasil).

3.8 Análise Estatística

Os resultados farmacológicos relacionados aos ensaios de indução de úlcera gástrica, úlcera crônica, determinação de muco, síntese de prostaglandina, pesagem dos órgãos e dos ensaios bioquímicos relacionados, estão expressos como média \pm desvio padrão (dp) da média. Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett quando se buscou comparar cada grupo teste em relação aos resultados obtidos para o grupo controle ou teste de Tukey, quando se buscou comparar cada grupo entre si. O valor de $\alpha = 0,05$ foi estabelecido para todas as análises estatísticas.

IV RESULTADOS

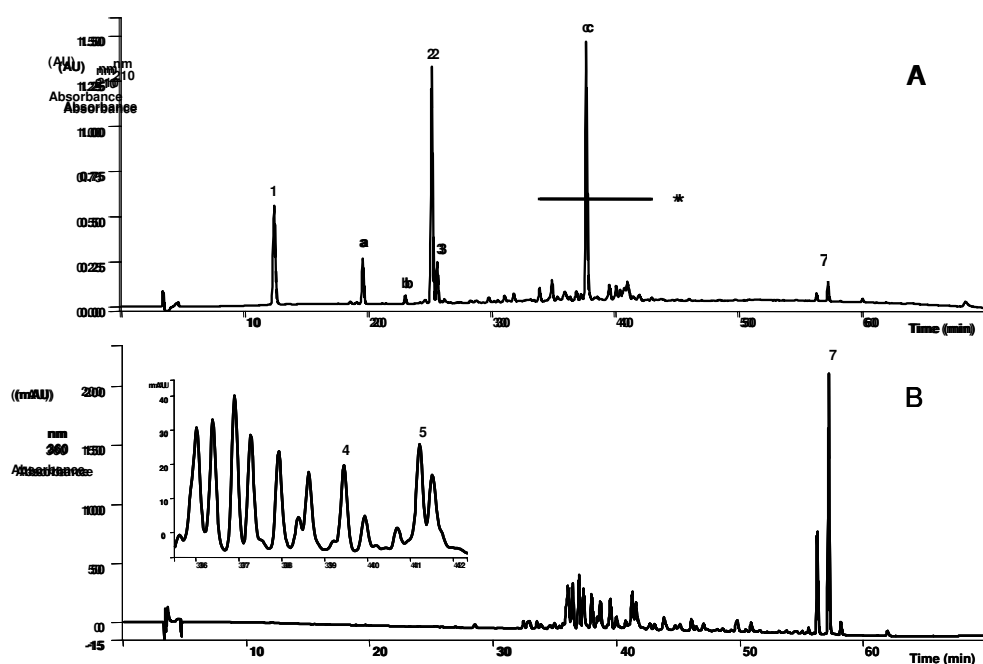
4.1 Descrição química da espécie em estudo

As folhas de *A. humile* St. Hil. são empregadas na medicina popular contra inflamações em geral e no tratamento de distúrbios gastrointestinais. Contudo, nada se conhecia sobre sua composição química podendo inclusive existir princípios ativos tóxicos, o que em plantas tidas como medicinais é muito mais comum do que se imagina (GAILLARD, 1999).

Investigações fitoquímicas levaram ao isolamento do ácido gálico, galato de metila, catequina e derivados da quercetina (relacionada com atividades benéficas sobre o trato gastrointestinal, uma vez que possui atividades antioxidantes (NARDINI et al., 2001; RICE-EVANS et al., 1996) e um biflavonóide, a amentoflavona, que em estudos realizados por GHAMBIR et al. (1987) e GOEL et al. (1988) mostrou-se um potente agente antiulcerogênico assim como um potente agente antiinflamatório. O perfil cromatográfico obtido por HPLC da FAc obtida de *A. humile* St. Hil. está

apresentado nas Ilustrações 7A e 7B. A quantidade de cada composto está apresentada na Tabela 1. Esse resultado é interessante, uma vez que flavonóides têm sido apontados como princípios ativos em processos antiulcerogênicos (YUNES et al., 2001; YESILADA et al., 2000). A presença de taninos também têm sido correlacionada à atividades antiúlceras (HASLAM, 1996).

Muitos estudos estão relacionando propriedades antiulcerogênicas com flavonóides (GRACIOSO et al., 2002). Os mecanismos para essa atividade antiulcerogênica têm sido sugeridos nesses compostos, incluindo aumento da barreira gástrica ou bloqueio da bomba prótonica (REPETTO e LLESUY, 2002).



Figuras 8A (acima) e 8B (abaixo) Perfil Cromatográfico HPLC da *A. humile* St. Hil.

Substâncias ou Classe	Concentração \pm SD ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
Derivados do ácido gálico	
Ácido gálico	103.08 \pm 0.64
Galato de metila	228.04 \pm 1.11
Derivados ácido gálicos desconhecidos	329.59 \pm 3.65

Total	728.71 ± 3.78
Catequinas	
(+)-Catequina	21.14 ± 0.45
Catequinas desconhecidas	4.34 ± 0.08
Total	29.70 ± 0.46
Flavonóides	
Amentoflavona	29.33 ± 0.82
Flavonóides desconhecidos	92.76 ± 0.75
Total	122.09 ± 1.07

Tabela 1. Concentração dos metabólitos secundários presentes na FAc de *A. humile* St. Hil.

4.2 Modelo de indução de úlcera gástrica pelo etanol em ratos

Os resultados do ILU no experimento de úlcera gástrica induzida por etanol, na ausência (solução NaCl 0,9 %) e na presença dos EMeOHs de *A. humile* St. Hil. (250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹) e da droga padrão lansoprazol (30 mg.kg⁻¹), estão apresentados na figura 9. Já os resultados obtidos utilizando as frações FAc e FAq obtidas a partir do EMeOH de *Anacardium humile* St. Hil. (50, 100 e 200 mg.kg⁻¹ para ambos) no modelo de úlcera induzida por etanol, na ausência (solução NaCl 0,9 % para a FAq e Tween 80 a 12 % para FAc) e na presença da FAc e FAq e da droga padrão lansoprazol (30 mg.kg⁻¹), são apresentados nas figuras 10 e 11, respectivamente.

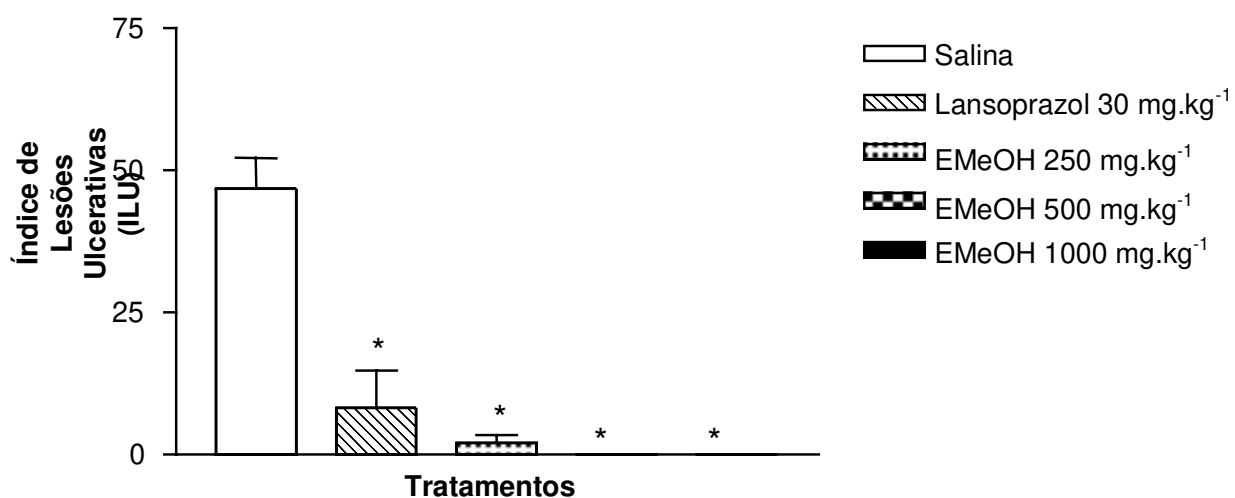


Figura 9. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por etanol em ratos após o tratamento com EMeOH de *A. humile* St. Hil. (N=5). ANOVA: $F_{(4,20)} = 137,2$ $p < 0,05$. Teste de Dunnett $*p < 0,01$

De acordo com estes resultados, o EMeOH de *A. humile* St. Hil. inibiu significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas por etanol. As doses de 500 e 1000 mg.kg⁻¹ inibiram 100 % das lesões gástricas. Mesmo na concentração de 250 mg.kg⁻¹ o EMeOH foi mais eficaz que o lansoprazol, sendo que aquele inibe 96% e este 82% a formação de lesões ulcerativas.

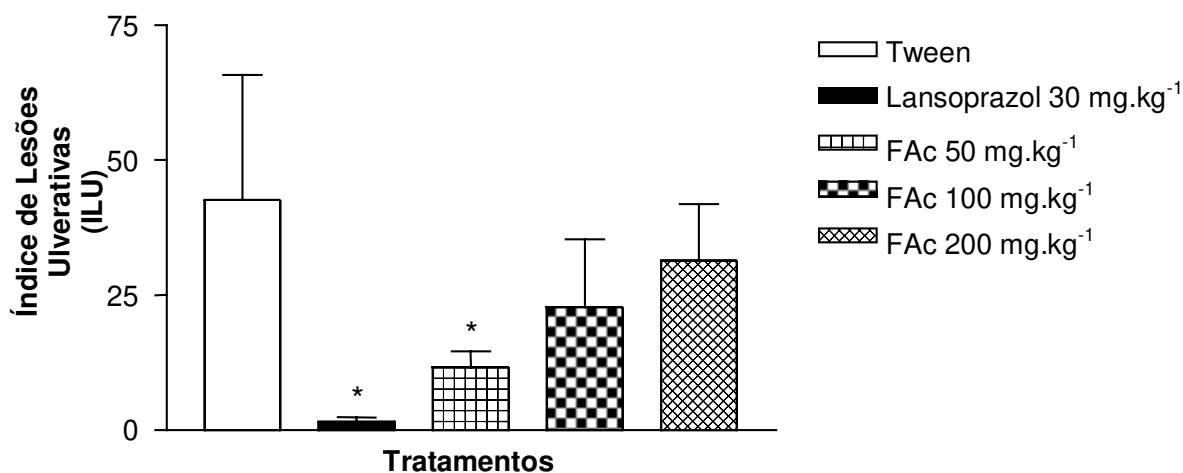


Figura 10. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por etanol em ratos após tratamento com FAc de *A. humile* St. Hil. (N=5). ANOVA: $F_{(4,22)} = 8,521$ $P < 0,05$. Teste de Dunnett: $*p < 0,01$

Os resultados obtidos nesse mesmo modelo, utilizando as Fac e Faq indicaram que ambas frações diminuíram significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas por etanol. Lansoprazol e FAc na dose 50 mg.kg^{-1} inibiram 96 e 73 %, respectivamente. Os resultados observados na dose de 100 e 200 mg.kg^{-1} não tiveram inibição significativa das lesões ulcerativas. Estas doses aumentaram as lesões ulcerativas de modo dose-dependente, comportamento característico de flavonóide que, em doses elevadas, tornam-se pró-oxidantes, auxiliando a formação de lesões ulcerativas.

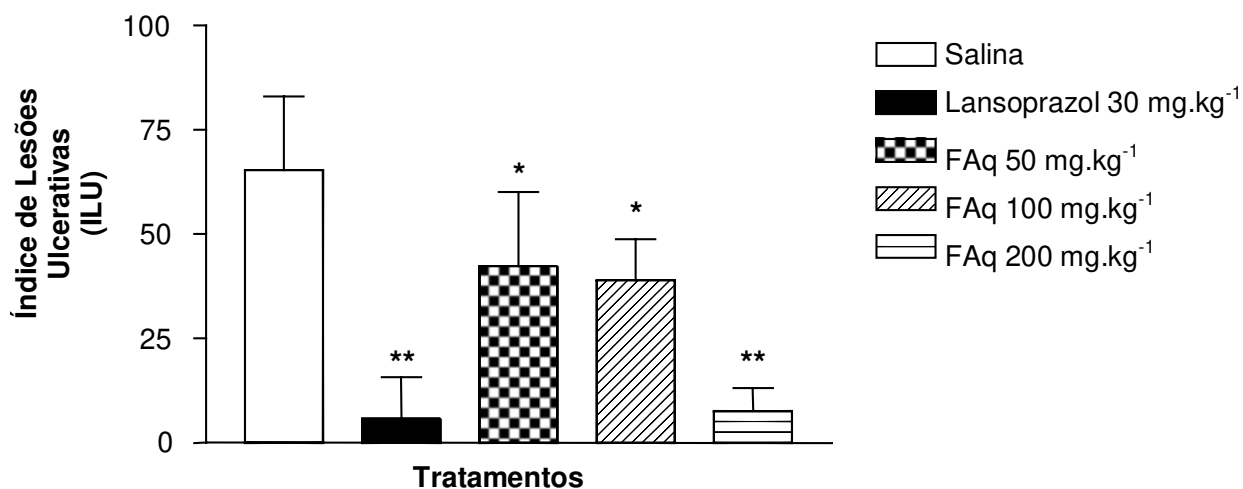


Figura 11. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por etanol em ratos após tratamento com FAq de *A. humile* St. Hil. (N=5). ANOVA: $F_{(4,20)} = 18,71$ $P < 0,05$. Teste de Dunnett: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Na mucosa gástrica de ratos pré-tratados com FAq de *A. humile* St. Hil. houve inibição significativa da formação de lesões ulcerativas induzidas por etanol. A FAq, nas doses de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹, produziram 35, 40 e 91 %, respectivamente, de inibição do ILU, sendo essa resposta dose-dependente. Ainda, a inibição da formação ulcerativa diferente estatisticamente que aquela promovida pelo lansoprazol (88 %).

4.3 Modelo de indução de úlcera gástrica pela droga antiinflamatória não-esteroidal (Piroxicam) em camundongos

Os resultados do ILU obtidos no experimento de úlcera gástrica induzida por piroxicam (30 mg.kg⁻¹ subcutânea), na ausência (solução NaCl 0,9 %) e na presença dos EMeOHs de *A. humile* St. Hil. (250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹) e da droga padrão cimetidina (100 mg.kg⁻¹), estão apresentados na figura 12.

As figuras 13 e 14 expressam, respectivamente, os resultados obtidos utilizando as frações FAc e FAq do EMeOH de *Anacardium humile* St. Hil. (50, 100 e 200 mg.kg⁻¹ para ambos) no modelo de úlcera induzida por piroxicam na ausência (solução NaCl 0,9 % para a FAq e Tween 80 a 12% para FAc) e na presença da FAc e FAq e da droga padrão cimetidina (100 mg.kg⁻¹), respectivamente.

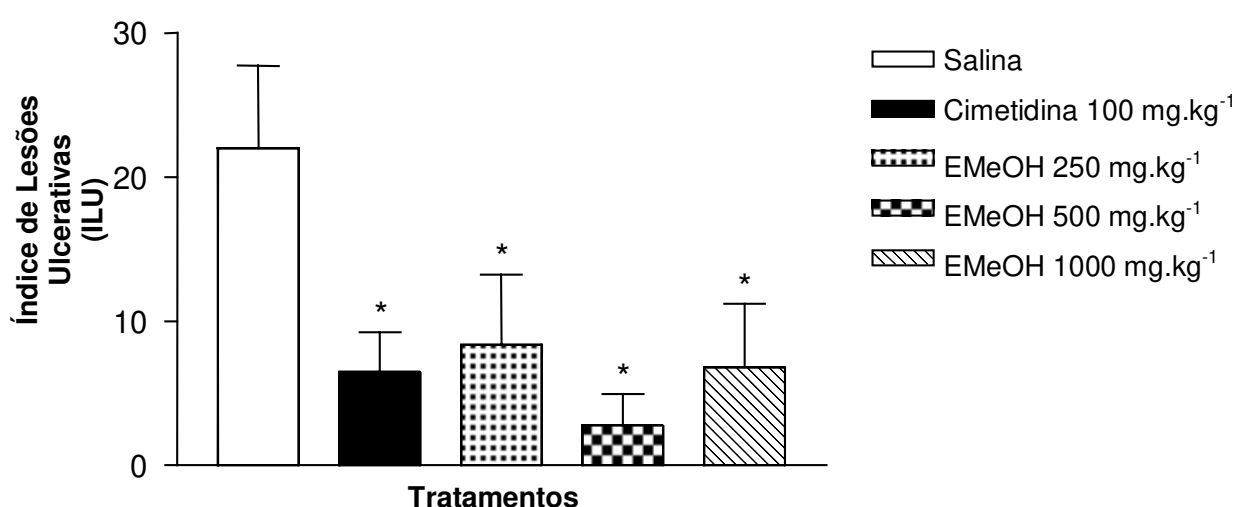


Figura 12. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por piroxicam em camundogos após tratamento com EMeOH de *A. humile* St. Hil. (N=6). ANOVA: F(4,22) = 17,63 P<0,05. Teste de Dunnett: *p<0,01

Os resultados obtidos nestes experimentos demonstram que o tratamento com o extrato EMeOH de *A. humile* St. Hil. preveniu significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas por piroxicam. EMeOH nas doses de 250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹ e cimetidina apresentaram inibição do ILU de 62, 87, 69 e 70 %, respectivamente, indicando que a dose de 500 mg.kg⁻¹ de EMeOH apresentou a maior eficácia.

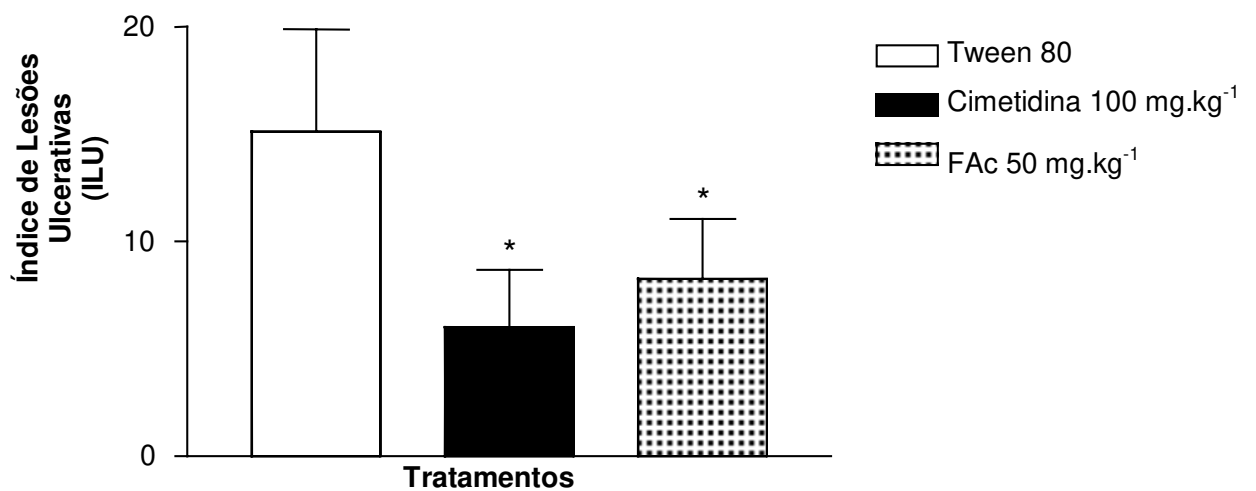


Figura 13. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por piroxicam em camundogos após tratamento com FAc de *A. humile* St. Hil. (N=8). ANOVA: $F(2,21) = 14,36$ $P < 0,05$. Teste de Dunnett: $*p < 0,01$

Na mucosa gástrica de ratos pré-tratados com FAc e submetidos à indução de úlcera por piroxicam houve diminuição da lesão ulcerativa quando comparados com ratos tratados apenas com o veículo Tween 80[®]. FAc na dose de 50 mg.kg⁻¹ e cimetidina na dose de 100 mg.kg⁻¹ promoveram inibição do ILU de 60 e 45 %, respectivamente.

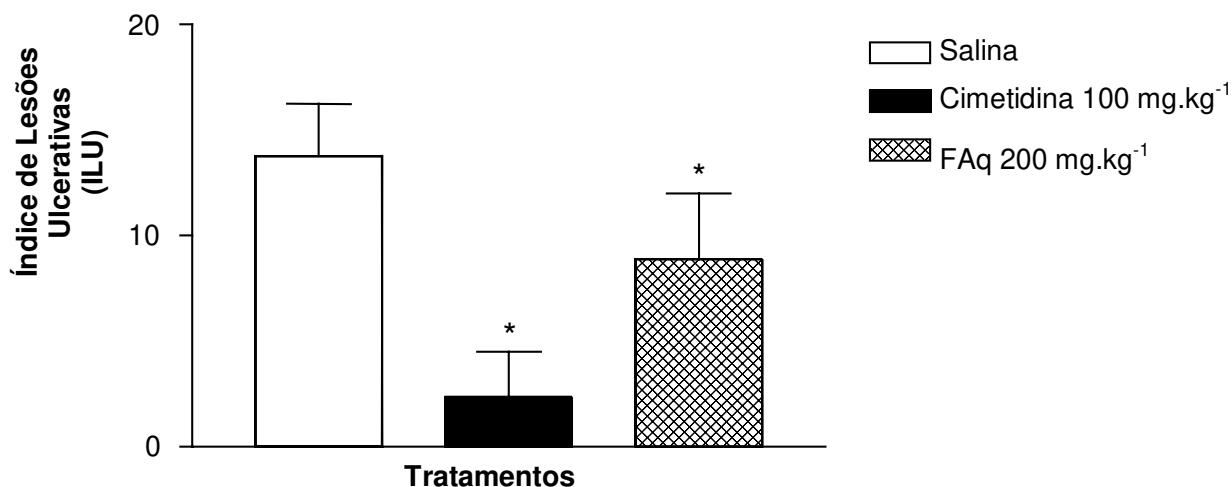


Figura 14. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por piroxicam em camundongos após tratamento com FAq de *A. humile* St. Hil. (N=8). ANOVA: $F(2,21) = 37,93$ $P < 0,05$. Teste de Dunnett: $*p < 0,01$

Já com animais pré-tratados com FAq também houve inibição da formação das lesões ulcerativas induzidas por piroxicam; porém a inibição ocorreu com FAc na dose de 200 mg.kg⁻¹ e cimetidina na dose 100 mg.kg⁻¹. A inibição do ILU foi de 83 e 35 %, respectivamente.

4.4 Modelo de indução de úlcera gástrica crônica pelo ácido acético em ratos

As figuras 15 e 16 indicam o percentual de cicatrização da mucosa gástrica no modelo de úlcera induzida por ácido acético promovido pelas frações FAc 50 mg.kg⁻¹ e FAq 200 mg.kg⁻¹, na ausência (solução NaCl 0,9 % para FAq e Tween 80 a 12 % para FAc) e na presença da FAq, FAc ou da droga padrão cimetidina (100 mg.kg⁻¹).

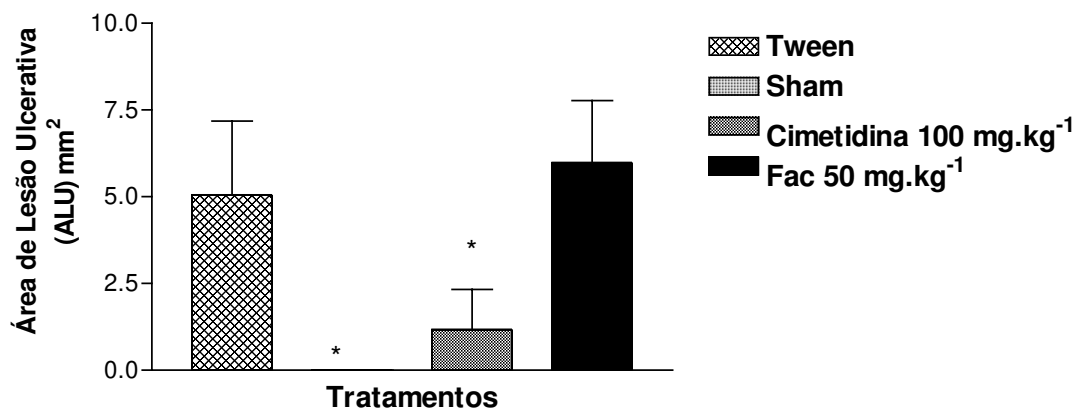


Figura 15. Área de Lesões Ulcerativas induzidas por ácido acético em ratos após tratamento com FAc de *A. humile* St. Hil. (N=5). ANOVA: $F_{(3,16)} = 7,765$ $P < 0,05$. Teste de Dunnett: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

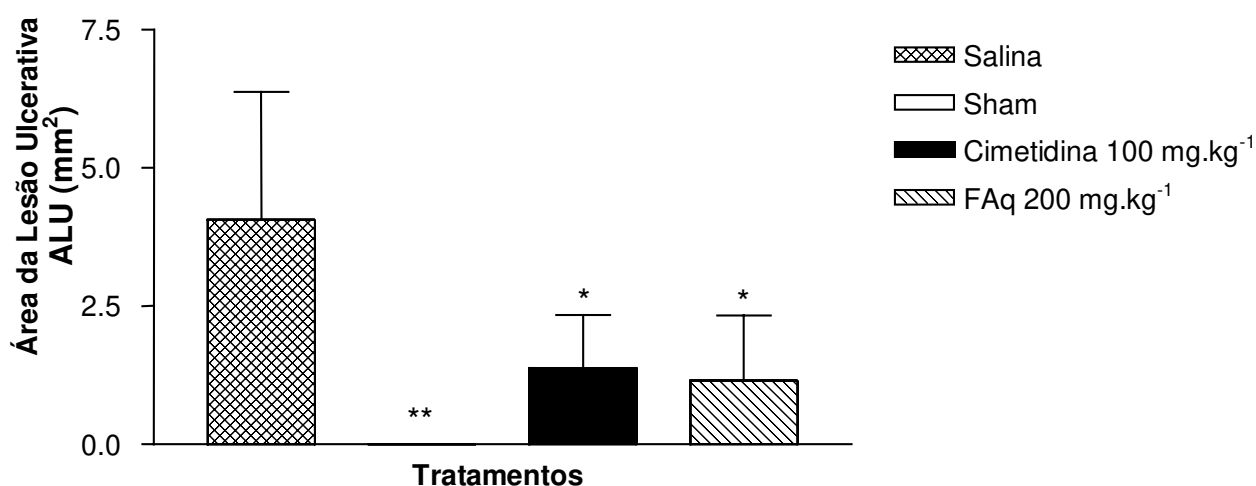


Figura 16. Área de Lesões Ulcerativas induzidas por ácido acético em ratos após tratamento com FAq de *A. humile* St. Hil. (N=5). ANOVA: $F_{(3,16)} = 7,765$ $P < 0,05$. Teste de Dunnett: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

De acordo com a Figura 15, a FAc não apresentou inibição da lesão ulcerativa, enquanto que a cimetidina mostrou-se bastante ativa.

Foi possível observar que a área média da lesão gástrica nos estômagos de animais controle (após 14 dias da injeção de ácido acético) foi de 4.1 mm²; já nos estômagos

de ratos tratados com a FAq de *A. humile* St. Hil., na dose de 200 mg.kg⁻¹ /dia, a área média da lesão foi de 1,2 mm². Este valor apresenta um percentual de inibição da lesão de 71 %. A droga padrão utilizada, cimetidina 100 mg.kg⁻¹ /dia, foi eficaz em promover a remissão da lesão em 66 %, o que correspondeu a uma área média de lesão de 1.4 mm².

O grupo denominado SHAM recebeu o mesmo procedimento cirúrgico dos outros grupos, diferenciando apenas na aplicação de salina no lugar do ácido acético. Os animais desse grupo não tiveram nenhuma lesão.

4.5 Determinação dos mecanismos de ação

4.5.1 Determinação da síntese de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos

Com a finalidade de avaliar o envolvimento da PGE₂ na citoproteção da FAc, verificamos a capacidade da FAc em modular a sua produção. Com base nos dados, apresentados na Figura 17, foi observado que a FAc (50 mg.kg⁻¹) aumentou os níveis de PGE₂ quando comparado com o grupo controle. A indometacina (30 mg.kg⁻¹), como esperado, reduziu em cerca de 50 % a produção de PGE₂ tanto no grupo controle, quanto no grupo tratado com FAc. FAc, portanto, apresentou efeito citoprotetor semelhante aqueles dos análogos de PGE₂.

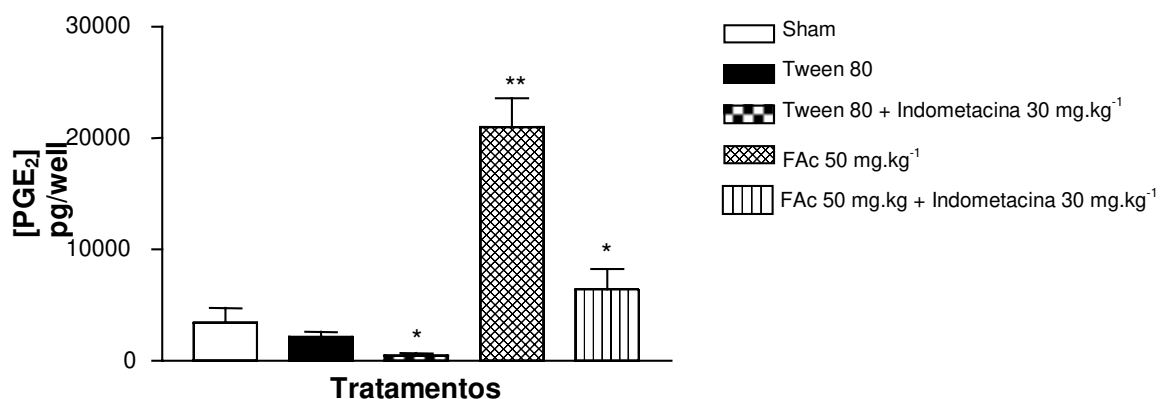


Figura 17. Efeito da administração da FAc de *A. humile* St. Hil. e da injeção subcutânea de indometacina na síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) em ratos. ANOVA: $F_{(4,20)} = 145,5$ $P < 0,05$. Teste de Dunnett: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

4.5.2 Determinação de muco aderido no estômago de ratos

De acordo com esse modelo, buscou-se verificar o envolvimento do muco na citoproteção obtida com o uso das frações. Os resultados obtidos para FAc e FAq do EMeOH de *Anacardium humile* St. Hil. (50 e 200 mg.kg⁻¹, respectivamente) na determinação de muco aderido no estômago na ausência (Tween 80 a 12 % para FAc e solução NaCl 0,9 % para FAq) e na presença da FAc, FAq ou da droga padrão carbenoxolona (200 mg.kg⁻¹), estão representados nas figuras 18 e 19, respectivamente.

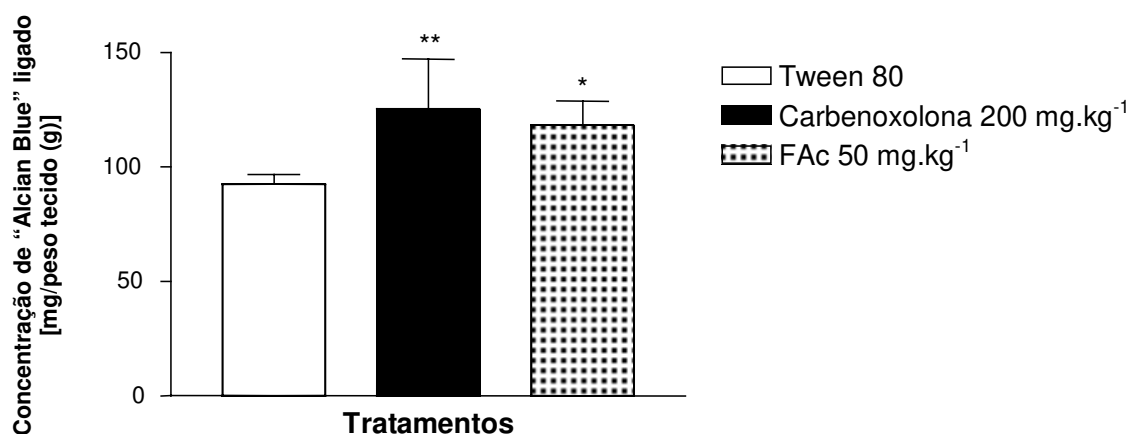


Figura 18. Efeito da carbenoxolona e FAc obtida de *A. humile* St. Hil. no muco gástrico aderido (quantidade de "Alcian Blue" ligado) em ligadura de piloro em ratos (N=5). ANOVA: $F_{(2,12)} = 7,445$ $p < 0,05$. Teste Dunnett: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

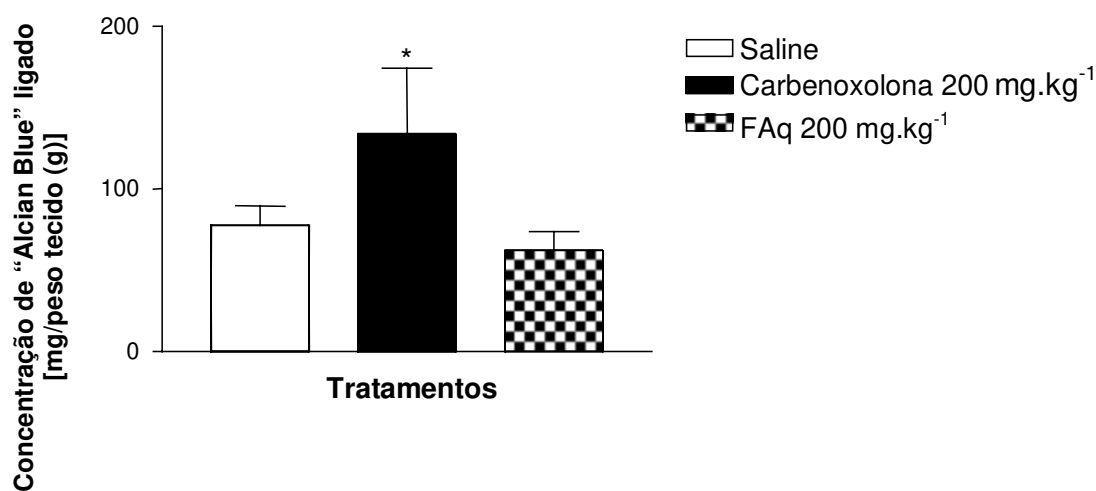


Figura 19. Efeito da carbenoxolona e FAq obtida de *A. humile* St. Hil. no muco gástrico livre (quantidade de "Alcian Blue" ligado) em ligadura de piloro em ratos (N=5). ANOVA: $F_{(11,55)} = 2,12$ $p < 0,05$. Teste Dunnett: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Esses dados sugerem que pré-tratamento com a FAc de *A. humile* St. Hil. (50 mg.kg^{-1}) aumenta significativamente o muco aderido no suco gástrico quando comparado com o grupo controle Tween 80[®], sugerindo o envolvimento do muco na citoproteção da FAc 50 mg.kg^{-1} . O mesmo resultado, entretanto, não foi observado com FAq.

4.5.3 Participação do Óxido Nítrico endógeno envolvido na proteção das frações FAc e FAq

Os resultados obtidos para as frações FAc (50 mg.kg^{-1}) e FAq (200 mg.kg^{-1}) do EMeOH de *A. humile* St. Hil no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME (70 mg.kg^{-1}) estão apresentados nas figuras 20 e 21, respectivamente.

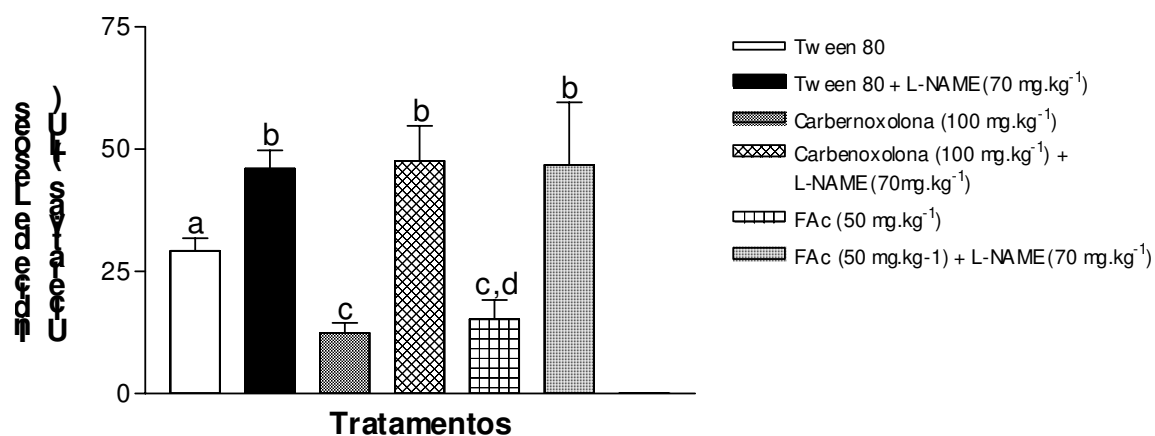


Figura 20. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME no efeito protetor da FAc de *A. humile* St. Hil. (N=6). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. ANOVA: $F_{(5,28)} = 18,89$ $P < 0,05$. Teste de Tukey:

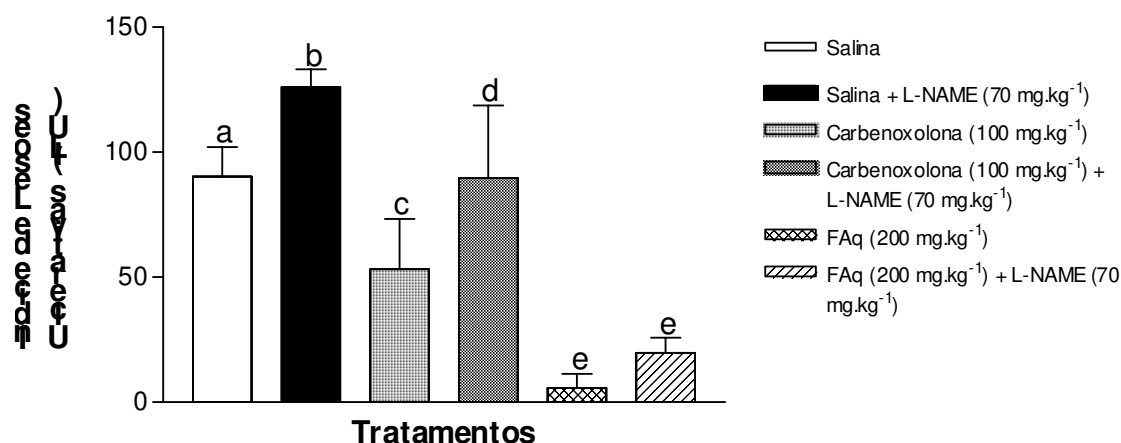


Figura 21. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME no efeito protetor da FAq de *A. humile* St. Hil. (N=6). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. ANOVA: $F_{(5,30)} = 51,16$ $P < 0,05$. Teste de Tukey:

Nesse modelo, foi possível verificar o envolvimento de NO endógeno na proteção da FAc (50 mg.kg⁻¹) em animais pré-tratados com L-NAME (70 mg.kg⁻¹), um inibidor da NO-sintase. Assim, verificou-se que o NO participa do mecanismo de proteção da FAc, já que quando administrou-se o L-NAME com a FAc, o índice de lesões ulcerativas foi superior ao grupo que recebeu apenas a fração. Isso ocorreu também com o controle negativo (Tween 80[®] a 12 %) e positivo (carbenoxolona 100 mg.kg⁻¹). O índice de lesões ulcerativas, quando administrada apenas FAq, não apresentou diferença significativa do mesmo tratamento antecedido pelo L-NAME. Esses dados sugerem que o NO não participa da proteção exercida pela FAq.

4.5.4 Participação dos Grupamentos Sulfidrila não protéicos (SHs) endógenos envolvidos na proteção das frações FAc e FAq

Os resultados obtido para as frações FAc (50 mg.kg⁻¹) e FAq (200 mg.kg⁻¹) do EMeOH de *A. humile* St. Hil no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados com NEM (10 mg.kg⁻¹) são apresentados nas figuras 22 e 23, respectivamente.

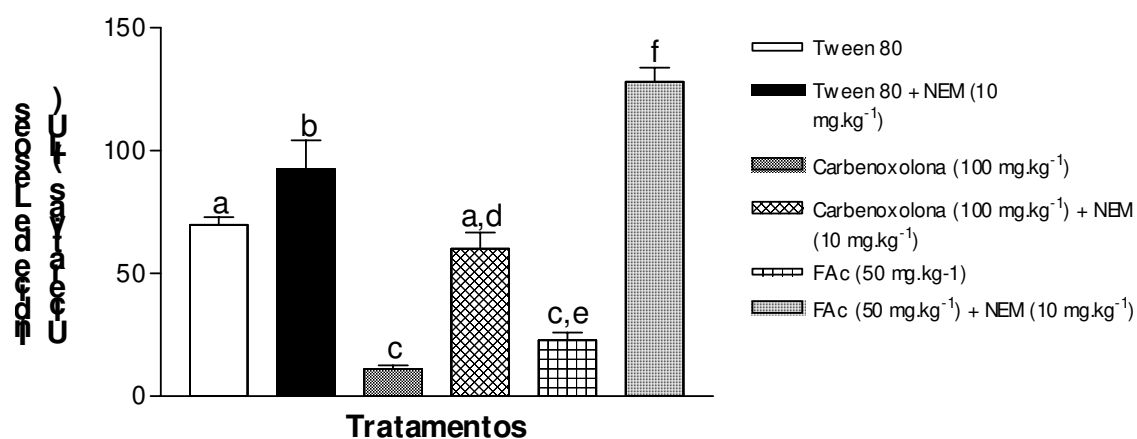


Figura 22. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM no efeito protetor da FAc de *A. humile* St. Hil. (N=5). Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas. ANOVA: $F_{(5,24)} = 40,63$ ($P < 0,05$). Teste de Tukey:

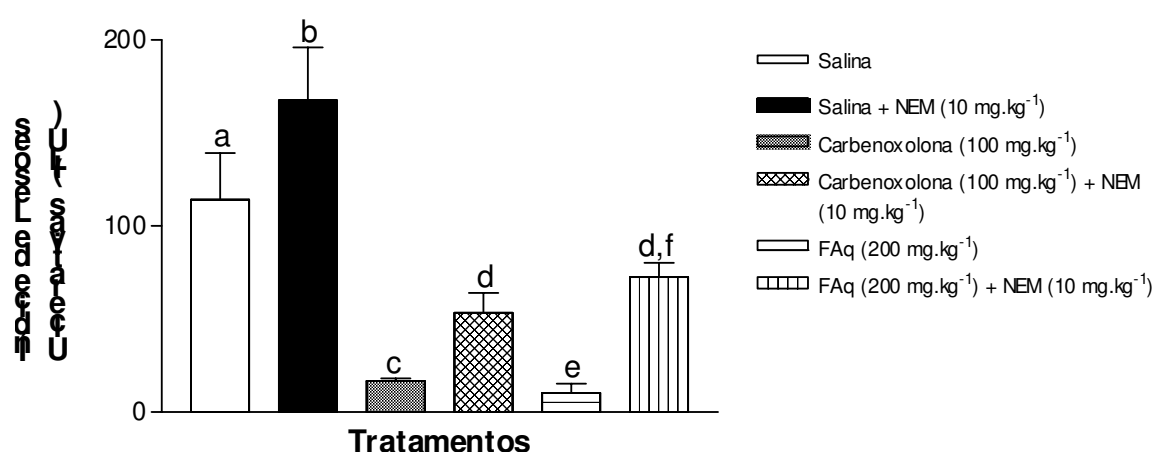


Figura 23. Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM no efeito protetor da FAq de *A. humile* St. Hil. (N=5). Letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas. ANOVA: $F_{(5,24)} = 70,60$ $P < 0,05$. Teste de Tukey:

De acordo com os resultados obtidos nesse modelo, pode-se verificar o envolvimento dos grupamentos SHs endógenos na gastroproteção da FAq (200 mg.kg⁻¹) em animais pré-tratados com NEM (10 mg.kg⁻¹), um bloqueador dos compostos sulfidrilas. Foi possível observar que as SHs também participam do mecanismo de proteção da FAq, já que quando administrou-se o NEM juntamente com a FAq, o índice de lesões ulcerativas foi superior ao grupo que recebeu apenas a fração. Isso também foi verificado com os controles negativo (solução NaCl 0,9 %) e positivo (carbenoxolona 100 mg.kg⁻¹).

4.5.5. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro

Os resultados obtidos pela FAc e FAq de *Anacardium humile* St. Hil. (50 e 200 mg.kg⁻¹) na análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico na ausência (Tween 80[®] a 12 % para FAc e solução NaCl 0,9 % para FAq) e na presença das frações FAc e FAq ou da droga padrão cimetidina (100 mg.kg⁻¹), estão expressos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Efeito da administração intraduodenal da cimetidina e FAc obtidas de *A. humile* St. Hil. nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica de ratos submetidos a ligadura do piloro.

Tratamentos (i.d)	Dose (mg.kg⁻¹)	N	pH (unidades)	Conteúdo Gástrico (mg)
Tween	-	6	3.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Cimetidina	100	6	3.6 ± 0.2*	0.5 ± 0.2
FAc	50	5	3.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1

Dados são média ± desvio padrão da média. (ANOVA: $F_{(2,14)} = 9.409$ para pH $p < 0,05$). Teste de Dunnett * $p < 0,01$) * indica diferença estatisticamente significativa.

Tabela 3. Efeito da administração intraduodenal da cimetidina e FAq obtidas de *A. humile* St. Hil. nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica de ratos submetidos a ligadura do piloro.

Tratamentos (i.d)	Dose (mg.kg⁻¹)	N	pH (unidades)	Conteúdo Gástrico (mg)
Salina	-	6	2.8 ± 0.2	0.6 ± 0.3
Cimetidina	100	6	3.3 ± 0.2*	0.5 ± 0.1
FAq	200	5	3.2 ± 0.3*	0.5 ± 0.2

Dados são média ± desvio padrão da média (ANOVA: $F_{(2,16)} = 5.662$ para pH, $F_{(2,14)} = 0.5132$ para volume gástrico ($p < 0,05$). Teste de Dunnett)* indica diferença estatisticamente significativa

Os resultados obtidos nesse experimento indicaram que FAq, mas não FAc, produziram um aumento nos valores de pH a exemplo da cimetidina. Como esta, FAq não modificou o volume da secreção gástrica.

V DISCUSSÃO

Conhecer a atividade farmacológica de constituintes químicos presentes em espécies vegetais selecionadas para estudo sempre foi objetivo de todo trabalho envolvendo plantas. Uma análise fitoquímica preliminar pode identificar grupos de metabólitos secundários relevantes que possam estar relacionados ou não às atividades biológicas encontradas, podendo direcionar a pesquisa para a obtenção de um fitoterápico eficaz e seguro, além de identificar possíveis princípios ativos tóxicos.

A fração AcOEt de *A. humile* St. Hil. obtida a partir do extrato metanólico resultou no isolamento de cinco substâncias e na identificação do ácido gálico, galato de metila, catequina, derivados de quercetina e amentoflavona.

A fração aquosa, que também foi obtida do extrato metanólico, revelou uma grande concentração de taninos.

A extração e o fracionamento das folhas de *Anacardium humile* St. Hil., bem como os experimentos realizados com o EMeOH, tiveram como objetivo confirmar a indicação popular da espécie para o tratamento de úlceras. Para determinar as doses mais eficazes para execução dos experimentos o modelo de etanol foi referência para ambas frações. Isso possibilitou uma otimização no processo de extração e fracionamento para um melhor rendimento e concentração do princípio ativo do vegetal.

Muitos aspectos podem estar envolvidos na patogênese da úlcera gástrica, incluindo predisposição genética, secreção ácida alterada, rápido esvaziamento gástrico, problemas com os mecanismos de defesa da mucosa, estresse psicológico e físico, além do tabagismo (QUAN e TALLEY, 2002).

Procedimentos cirúrgicos no tratamento da úlcera péptica foram substituídos por intervenções farmacológicas (utilização de antagonistas de receptor H₂ e de inibidores da bomba protônica) consideradas estratégias eficazes contra distúrbios gástricos (BRZOZOWSKI, 2003). Entretanto, esses agentes farmacêuticos não são completamente efetivos e podem provocar efeitos adversos (ALPER, 1993). Extratos e princípios ativos de planta serviriam como um guia para o desenvolvimento de novas drogas (GONZALES et al., 2000).

Na primeira etapa dos experimentos farmacológicos foram administrados aos animais o EMeOH de *A. humile* St. Hil. nas doses de 250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹, por via oral. Este experimento visou a comprovação dos dados etnofarmacológicos.

Quando testamos as frações obtidas a partir do EMeOH da *A. humile* St. Hil., as doses de 50 mg.kg⁻¹ para FAc e 200 mg.kg⁻¹ para FAq foram utilizadas, visto que essas doses foram as mais significativas na avaliação dose-efeito.

O estudo da atividade antiulcerogênica do extrato da planta foi baseado na utilização das amostras em diferentes modelos de indução de úlceras gástricas em animais, os quais atuam por diferentes mecanismos de ação e mimetizam a úlcera no homem.

A administração tópica do etanol absoluto causa edema no tecido, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias que podem contribuir para indução dos danos na mucosa e geração de espécies reativas de oxigênio (KOUNTOURAS et al., 2001). As úlceras aparecem devido à sua ação necrotizante na mucosa gástrica, com menor participação da secreção gástrica (LEWIS e HANSON, 1991; EVANS, 1996).

A menor participação da secreção gástrica é devido ao desaparecimento do ácido no lúmen gástrico (KIVILAAKSO et al., 1978). Esse desaparecimento tem sido atribuído a

uma contra-difusão do ácido direto na barreira gástrica rompida (DAVENPORT, 1972), o ácido no lume gástrico é um dos muitos fatores que levam ao rompimento celular (JACOBSON, 1992).

O efeito gastroprotetor apresentado pela FAc, pode ser atribuído ao aumento da liberação de fatores protetores. Agentes que aumentam fatores defensivos da mucosa, como prostaglandinas, protegem a mucosa gástrica contra danos induzidos pelo etanol (MORIMOTO et al., 1991).

O efeito protetor apresentado pela FAq pode ser devido à inibição da secreção ácida antes da administração do etanol, diminuindo assim a contra-difusão na barreira gástrica rompida e o rompimento celular. Ácidos fenólicos e ácidos tânicos reduzem a secreção ácida gástrica (EZAKI et al., 1985) pela inibição da bomba protônica (MURAKAMI et al., 1992), o que em parte seria suficiente para reduzir o número de lesões induzidas pelo etanol (MIZUI e DOUTEUCHI, 1981).

A mucosa gástrica está sujeita a contínuas mudanças de agentes agressores endógenos e exógenos. Para combater esse ataque, a mucosa possui mecanismos de defesa interativa que protegem o tecido de danos e eventuais ulcerações (WHITTLE, 2003). O piroxicam, assim como as maiorias das Drogas Antiinflamatórias Não Esteroidais (DAINEs), atua inibindo a síntese de prostaglandinas e, conseqüentemente, diminuindo os mecanismos de defesa da mucosa gástrica mediados por essas substâncias (LEWIS e HANSON, 1991; MORIMOTO et al., 1991; EVANS, 1996), sendo o mecanismo primário pelo qual essas classes de drogas produzem danos no trato gastrointestinal (WALLACE, 1997).

ANDERSON e GROSSMAN (1965) propuseram, com seus experimentos, que o contato direto das DAINEs com a mucosa quebra o gradiente de íons hidrogênio entre

o lume gástrico e o tecido da mucosa; essa interação é essencial para continuidade epitelial assim como para manutenção da sua integridade. Essa ação local sugere que danos na barreira superficial são resultado do contato das DAINES com o tecido da mucosa e não um reflexo de uma resposta bioquímica e farmacológica, como inibição da COX.

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

Camundongos pré-tratados com FAc (50 mg.kg⁻¹) e FAq (200 mg.kg⁻¹), submetidos a injeção subcutânea de piroxicam, tiveram significativa proteção de suas mucosas gástricas contra as lesões ulcerativas em todo segmento glandular do estômago. Portanto os resultados indicaram que os compostos ativos, presentes nessas frações FAc e FAq, podem agir, de algum modo, auxiliando a integridade da mucosa gástrica, seja aumentando a produção de muco e bicarbonato da mucosa ou regulando a produção excessiva de ácido gástrico, o que se constitui em ação gastroprotetora (PANDOLFINO et al., 2000).

A mucosa do trato gastrointestinal está exposta regularmente a substâncias potencialmente prejudiciais, incluindo aquelas que nós ingerimos ou exógenas (álcool, aspirina, etc.) e secreções endógenas (ácido, sais biliares) (WALLACE e DEVCHAND, 2005). Eventualmente, a mucosa não é capaz de resistir aos danos causados por essas substâncias, mas tem uma notável capacidade reparativa quando o dano é produzido (WALLACE e DEVCHAND, 2005). Prostaglandinas, particularmente PGE₂ e PGI₂, tem um papel muito importante modulando a defesa e reparo na mucosa (WALLACE e MA, 2001).

Prostaglandinas endógenas são geradas a partir do ácido aracdônico. Três isoenzimas de ciclooxigenase COX, COX-1 (VANE, 1994), COX-2 (XIE et al., 1991) e, recentemente, COX-3 (CHANDRASEKHARA et al., 2002) têm sido descritas como catalisadores da conversão do ácido aracdônico para o prostaglandina endoperóxido H₂ (PGH₂), a reação chave para biossíntese da prostaglandina. COX-1 é expressa, constitutivamente, em muitos tecidos (O'NEIL e FORD-HUTCHINSON, 1993) e foi sugerido que sua origem relaciona-se às funções “house keeping”. Por outro lado, níveis de COX-2 são usualmente baixos ou não-detectados em condições basais (KARGMAN et al., 1996), mas aumentam rapidamente sob influência de estímulos pró-inflamatórios ou mitogênicos (KUJUBU et al., 1991).

Entre os muitos efeitos importantes dessas prostaglandinas, com respeito à defesa da mucosa, estão à estimulação da secreção de muco e bicarbonato e manutenção do fluxo sangüíneo (HAWKEY 2000). Pré-tratamento com FAc aumentou em torno de 10 vezes a PGE₂, ao passo que o tratamento com indometacina (30 mg.kg⁻¹ s.c.) reduziu a biossíntese de prostaglandina na mucosa. Avanços recentes na via enzimática do metabolismo do aracdonato revelaram que a síntese da PG depende de uma elevação da atividade da ciclooxigenase (COX). Esses resultados sugerem que a ação citoprotetora da FAc pode estar relacionada ao aumento da prostaglandina, via ciclooxigenase. Possivelmente, esse aumento se deve à ação da FAc na isoenzima COX-1, já que prostaglandina derivada de COX-2 representa uma pequena porção do pool total de prostaglandina na mucosa gástrica não ulcerada (EHRlich et al., 2003).

O epitélio gástrico é coberto por uma camada contínua de muco que adere na mucosa (JOHANSSON et al. 2000). Esse gel mucoso, juntamente com o bicarbonato

secretado pelo epitélio, serve como uma barreira tamponante contra o ácido no lume (LYN e BROOKS 1991).

Pré-tratamento com FAc obtida do EMeOH de *A. humile* St. Hil. aumentou significativamente o muco aderido ao epitélio gástrico quando comparado ao grupo controle. Esse aumento na barreira mucosa possivelmente contribui para a citoproteção da FAc. O gel do muco contém numerosos fosfolípidos, cobrindo a superfície do lume com um filme de fosfolipídios (GODDARD et al., 1990). Esses mesmo autores relataram que esta camada surfactante causa uma importante e notável superfície hidrofóbica natural gástrica, que proporciona proteção contra agentes lesivos. Possivelmente, o aumento proporcionado pela FAc é via prostaglandina, já que a mesma foi capaz de aumentar a produção de prostaglandina. Prostaglandina endógena tem um papel importante na secreção do muco gástrico (HAWKEY 2000). A grande diferença entre o aumento da síntese de prostaglandina e a secreção de muco pode ser devido a um possível sistema regulatório, que previne a produção excessiva do muco e pode operar na mucosa gastrointestinal (TANI et al., 2002).

Por outro lado, esse aumento não foi observado na FAq; MITJAVILA et al. (1977) mostraram que a interação dos taninos com mucina tira sua propriedade protetora, diminuindo a quantidade de muco, justificando a diminuição do muco na mucosa tratada com FAq.

O óxido nítrico (NO) é um importante transmissor endógeno que é formado no tecido vascular e exerce um papel chave de vasodilatação que pode prevenir adesão celular no endotélio (GRANGER et al., 1994). Semelhante às prostaglandinas, NO é também formado em outras células mucosas incluindo o epitélio, onde pode estimular

muco e secreção eletrolítica. O perfil da potente ação protetora do NO assemelha-se aos obtidos pela prostaglandina (WHITTLE, 1994).

Agentes que incluem o NO ou outros doadores exercem ações protetoras contra danos da mucosa em modelos experimentais (BARROCHINO et al., 1995). Mudanças vasculares na mucosa gástrica parecem ser o mais pronunciado aspecto de danos induzidos pelo etanol absoluto. O fluxo normal é, por sua vez, o maior mecanismo de citoproteção (MATSUDA et al., 1999). NO participa no mecanismo de defesa gástrica regulando o fluxo sanguíneo e a secreção de muco (BROWN et al., 1993). NO endógeno tem um papel efetivo importante juntamente com prostaciclina e neuropeptídeos sensoriais, na modulação da integridade da mucosa gástrica (EHRlich et al., 2003).

Estudos recentes demonstram que o pré-tratamento com L-NAME, um inibidor da NO-sintase, aumentou as lesões induzidas por etanol absoluto. No presente estudo, a inibição da NO-sintase pelo L-NAME atenuou a gastroproteção da FAc e FAq, sugerindo que o NO participa da gastroproteção oferecidas por essas frações.

Evidências emergentes indicam que COX-2 tem um papel estimulatório na resistência moduladora contra irritantes luminiais, enquanto outros mediadores de defesa da mucosa, como o NO, são farmacologicamente ou geneticamente depressores (WALLACE e DEVCHAND, 2005). Óxido nítrico é um importante mediador de muitos componentes de defesa da mucosa (WALLACE e MILLER, 2000). Estudos em ratos demonstraram que quando a síntese do óxido nítrico é inibida, a administração de agentes inibidores seletivos de COX-2 resulta em aumento de danos gástricos significativos (EHRlich et al., 2004). Amentoflavona, biflavonóide majoritário na FAc, promove inibição da biossíntese de expressão de COX-2

(BANERJEE et al., 2002). Essa supressão pode explicar o aumento exacerbado das lesões quando os animais foram pré-tratados com L-NAME e FAc, já que o L-NAME inibe a NO sintase.

Compostos sulfidrilas estão significativamente implicados na manutenção da integridade gástrica, particularmente quando espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na patofisiologia do tecido lesado (KIMURA et al., 2001; TEPPERMAN e JACOBSON, 1994). Danos induzidos por etanol foram associados com uma significativa redução dos níveis de SHs na mucosa em humanos (LOGUERCIO et al., 1991) e animais experimentais (VICTOR et al., 1991). A administração de SHs preveniu danos induzidos pelo etanol em humanos (LOGUERCIO et al., 1991), e tratamentos com doadores de SHs protegeram a mucosa gástrica contra danos por agentes necrotizantes, estresse ou isquemia (TEPPERMAN e JACOBSON, 1994). Neste estudo o pré-tratamento com NEM, um bloqueador de SHs, aboliu a gastroproteção obtida com o emprego das frações FAc e FAq. Isto indica que os grupamentos SH endógena estão envolvidos no mecanismo de proteção oferecido pelo emprego dessas frações contra o agente necrotizante empregado, o etanol absoluto.

Com a finalidade de avaliar os mecanismos envolvidos no efeito protetor da espécie estudada, o passo seguinte consistiu em investigar, através do modelo de ligadura do piloro, a atividade sistêmica das frações (FAc e FAq) através da administração intraduodenal. Esta forma de administração pressupõe absorção intestinal evitando contato direto das substâncias com a mucosa e com suco gástrico, como acontece com as drogas administradas por via oral. Assim, uma análise bioquímica dos parâmetros do suco gástrico foi investigada sob efeito das frações FAc e FAq, a saber: pH e volume da secreção gástrica, em animais submetidos a ligadura de piloro. Não foi

observada nenhuma alteração no pH e nem no volume da secreção nos estômagos dos animais tratados com FAc. A FAq, entretanto, diminuiu o pH da secreção. Essa diminuição indica um mecanismo anti-secretório, provavelmente mediado pelos taninos (OKUDA et al., 1992; EZAKI et al., 1985) existentes nesta fração, os quais estão ausentes na FAc.

É bem conhecido que em muitos modelos de úlcera as erosões são muito pequenas e diferentes histologicamente da úlcera péptica crônica humana, com relação a patomorfologia e características de cura (BRZOZOWSKI, 2003). Um dos únicos modelos reais de úlcera péptica para avaliar o processo de cicatrização é o modelo introduzido por TAKAGI et al. (1969), o da úlcera induzida por ácido acético em ratos.

Nesse modelo, houve uma cicatrização significativa quando se utilizou FAq, apresentando um percentual de diminuição da úlcera induzida mais eficaz do que aquele obtido com o controle positivo cimetidina. Esse processo de cura é acompanhado de aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera e de aumento significativo da gastrina plasmática e citocinas pró-inflamatórias, como $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ (BRZOZOWSKI et al., 2001). Com a progressão do processo curativo da úlcera, o fluxo sanguíneo na margem da úlcera e os elevados níveis de $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e gastrina, decaem gradualmente (BRZOZOWSKI et al., 2001). Durante o período inicial de cura da úlcera ocorre uma supressão notável da acidez gástrica e expressão de fatores como EGF, $TFG\alpha$ e HGF, que controlam a proliferação celular, além de apresentarem atividade anti-secretória (KONTUREK et al., 1992). Considerando que a FAq tem a presença de taninos e que uma de suas atividades biológicas é a de efeitos anti-

secretórios (OKUDA et al., 1992; EZAKI et al., 1985) pode-se explicar como essa fração obteve um percentual de cicatrização significativo.

Foi recentemente descrito por SZABO e VINCZE (2000), que os fatores de crescimento estão presentes no processo de cura das úlceras crônicas. Esses fatores estimulam importantes elementos celulares da cura da úlcera, como angiogênese, granulação da formação tecidual, e re-epitelização. EGF foi o primeiro fator relatado que possui ação na cura de úlcera, o qual também demonstrou atividades anti-secretórias. Os fatores de crescimento também estimulam elementos celulares necessários ao processo de cura, migração e proliferação celular, que pode exercer um efeito citoprotetor pela liberação de prostaglandina. Possivelmente, o percentual de cura obtido pela FAq foi devido sua atividade anti-secretória, pois a mesma não foi capaz de aumentar a síntese de EGF (dados não apresentados).

A FAc não apresentou um percentual de cura significativo nesse modelo. Como a substância majoritária da FAc é o biflavonóide amentoflavona e esse, por sua vez, promove uma queda na síntese de COX-2, isoenzima mediadora de reações pró-inflamatórias, é possível explicar, ao menos em parte, a não efetividade de FAc no percentual de cicatrização da lesão. Inibidores de COX-2 retardam o processo de cura de úlcera crônica em camundongos (MIZUNO et al., 1997) e ratos (SCHMASSMAN et al., 1998).

VI CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com o extrato e as frações obtidas da *A. humile* St. Hil. foi possível concluir que:

- As substâncias majoritárias presentes nas amostras vegetais da espécie em estudo são flavonóides derivados da quercetina, um biflavonóide amentoflavona, derivados do ácido gálico e taninos.

- Todas as doses empregadas dos extratos EMeOH (250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹) apresentaram atividade farmacológica antiulcerogênica. Já para as frações, a dose de 50 mg.kg⁻¹ para FAc e 200 mg.kg⁻¹ para FAq foram aquelas que apresentaram melhor atividade farmacológica nos ensaios de indução de úlcera aguda e crônica;

- Os mecanismos envolvidos na citoproteção da FAc são de natureza citoprotetora dependente do óxido nítrico e grupamentos sulfidrilas. Já com a FAq esses mecanismos são de natureza anti-secretória dependente apenas de grupamentos sulfidrilas.

O extrato de *A. humile* St. Hil. apresentou a atividade antiulcerogênica que lhe foi atribuída popularmente; provavelmente essa atividade, está relacionada à presença dos flavonóides e taninos presentes na FAc e FAq, respectivamente.

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. Carbon 13 NMR of Flavonoids. In: Agrawal PK, Bansal MC. Other Flavonoids. Amsterdam: Elsevier, p. 236-282, 1989.

ALONSO, J. Bases Clínicas y Farmacológicas In: Tratado de Fitomedina. Buenos Aires, Argentina: ISIS, p.198-735, 1998.

ALPER, J. Ulcers as an infectious disease. *Science*. 260(9): 159-160, 1993.

ANDERSON, S., GROSSMAN, M.I. Profile of pH, pressure and potential difference at gastroduodenal junction in man. *Gastroenterol*. 49: 364-371, 1965.

BATISTA, L.M., ALMEIDA, A.B.A., MAGRI, L.P., TOMA, W., CALVO, T.C., VILEGAS, W., SOUZA BRITO, A.R.M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 328-332, 2004.

BANERJEE, T., VAN DER VLIET, A., ZIBOH, V.A. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids*. 66: 485-492, 2002.

BROWN, J.F., KEATES, A.C., HANSON, P.J., WHITTLE, B.J. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.* 265: 418-422, 1993.

BARROCHINO, M.D., CALATAYUD, S., CANET, A., ESPULGUES, J.V. Transdermal nitroglycerin prevents nonsteroidal anti-inflammatory drugs gastropathy. *Eur. J. Pharmacol.* 281: R3-4, 1995.

- BORRELI, F., IZZO, A.A.. Review article: The plant Kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother. Res.* 14: 581-591, 2000.
- BRZozowski, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – Polish achievements. *J. Physiol. Pharmacol.* 54 Suppl 3: 99-126, 2003.
- BRZozowski, T., KONTUREK, P.C., KONTUREK, S.J. SLIWOWSKI, Z., PAJDO, R., DROZDOWICZ, D., PTAK, A., HAHN, E.G. Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and (COX)-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. *Microsc. Res. Tech.* 53: 343-353, 2001.
- CHANDRASEKHARAN, N.V., DAI, H., ROOS, K.L., EVANSON, N.K., TOMSIK, J., ELTON, T.S., SIMMONS, D.L. COX-3, a variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13926-13931, 2002.
- CHAVEZ, R.R. Gastric acid. *Rev. Gastroenterol. Peru*, 16(3): 249-253, 1996.
- CODE, C.F., WATKINSON, G. Importance of vagal innervation in the regulatory effect of acid in the duodenum on gastric secretion of acid. *J. Physiol.* 130(1): 233-52. 1955.
- CURTIS, G.H., MACNAUGHTON, W.K., GALL, D.G., WALLACE, J.L. Intraluminal pH modulates, gastric prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 130-134, 1995.
- DAVENPORT, H. The gastric mucosal barrier. *Digestion.* 5: 162-165, 1972.

- DERRY, S., LOKE, Y.K. Risk of gastrointestinal haemorrhage with long term use of aspirin: meta-analysis. *BMJ*. 321: 1183-1187, 2000.
- DI STASI, L.C. Plantas Mediciniais: Arte e Ciência – Um guia de estudo interdisciplinar, São Paulo: ed. Unesp. 230, 1996.
- DOCKRAY, G.J., VARRO, A., DIMALINE, R. Gastric endocrine cells: gene expression, processing and targeting of active products. *Physiol. Reviews* 76(3): 767-798, 1996.
- EBERHART, C.E., DUBOIS, R.N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 109: 285-301, 1995.
- EHRlich, K., SICKING, C., RESPONDEK, M., PESKAR, B.M. Interaction of cyclooxygenase isoenzymes, nitric oxide, and afferent neurons in gastric mucosal defense in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308: 277-283, 2003.
- EVANS, F. The gastro-intestinal Tract. Selection, *Preparation and Pharmacological Evaluation of plant Material*. 25-45, 1996.
- EZAKI, N., KATO, M., TAKIZAWA, N., MORIMOTO, S., NONAKA, G., NISHIOKA, L. Pharmacological studies on *Lindare umbellatae* Ramus IV: Effects of condensed tannin related compounds on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. *Planta Med.* 1: 34-38, 1985.
- FRANÇA, S.D.C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. *Farmacognosia – Da Planta ao Medicamento*, ed. da UFSC, SC. Cap. 7, p. 101-121, 1999.

- GAILLARD, Y., PEPIN, G.J. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high-performance liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. *J. Chrom. B.* 733: 181-229, 1999.
- GAMBHIR, S.S, GOEL, R.K., DAS GUPTA, G. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activity of amentoflavone, *Indian J Méd Res.* 85: 689, 1978.
- GARNER, A., FLEMSTROM, G., ALLEN, A. Current concepts of gastroduodenal mucosal protection. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 92: 78-80, 1984.
- GISLASON, H., SORBYE, H., ABDI-DEZFULI, F., WALDUM, H.L., SVANES, K., Role of prostaglandins and histamine in hyperemic response to superficial and deep gastric mucosal injury and H⁺ back-difusion in cats. *Dig. Dis. Scie.* 40(8): 1669-1678, 1995.
- GODDARD, P.J., KAO Y-C., LICHTENBERGER L.M. Luminal surface hydrophobicity of canine gastric mucosa is dependent on a surface mucus gel. *Gastroenterol.* 98: 361-370, 1990.
- GOEL, R.K., GAMBHIR, S.S., DAS GUPTA, G. Mechanism of anti-ulcerogenic effect of amentoflavone. *Indian J Med Res.* 88: 192-196, 1988.
- GONZALES, E, IGLESIAS, I, CARRETERO, E, VILLAR, A. Gastric cytoprotection of bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 70: 329-333, 2000.
- GRACIOSO, J.S., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C.A., SOUZA BRITO, A.R.M. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. On mouse gastric mucosa support the Turnaraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 487-491, 2002.

- GRAHAM, D.Y., LIDSKY, M.D., COX, A.M., EVANS, D.J JR., EVANS, D.G., ALPERT, L., KLEIN, P.D., SESSOMS, S.L., MICHALETZ, P.A., SAEED, Z.A. Long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug use and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 100: 1653-1657, 1991.
- GRANGER D.N., KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of the leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 55: 662-675, 1994.
- GURBUS, I., AKYUZ, C., YESILADA, E., SENER, B. Anti-ulcerogenic effect of *Mormodica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. *J. Ethnopharmacol.* 71: 77-82, 2000.
- HAMBURGER, M., HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.* 30: 3864-3874, 1991.
- HARBORNE, J. B. The Flavonoids: Advances in Research since 1986. In: Geiger H. Biflavonoids and triflavonoids. New York: Chapman & Hall, p. 95-115, 1993.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59: 205-215, 1996.
- HASLAM, E. Chemistry of vegetable tannin. New York: Academic Press. 79p, 1967.
- HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics.* 96: 67-2002, 2002.
- HAWKEY, C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology.* 119: 521-535, 2000.

- HAWKEY, C.J., RAMPTON, D.S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology* 89: 1162-1188, 1985.
- HAYDEN, L.J., THOMAS, G., WEST, G. B. Inhibitors of gastric lesions in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 30: 244-246, 1978.
- HERGERT, H.J. Condensed tannic in adhesives: introduction and historical perspectives. In: HEMINGWAY, R.W. e tal. (Ed.). Adhesives from renewable resources. Whashington: American Chemical Society. 155-171, 1989.
- HIRSCHOWITZ, B.I., KEELING, D., LEWIN, M., OKABE, S., PARSONS, M., SEWING, K., WALLMARK, B., SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. *Dig. Dis. Sci.* 40: 3S-23S, 1995.
- JACOBSON, E. Circulatory mechanism of gastric mucosal damage and protection. *Gastroenterol.* 102: 1778-1800, 1992.
- JOHANSSON, M., SYNNERSTAND, I., HOLM, L. Acid transport through channels in the mucous layer of rat stomach. *Gastroenterol.* 119: 1297-1304, 2000.
- KAHYAL, M., EL-GHAZALY, M., KENAWY, S., SEIF-EL-NASR, M., MAHRAN, L. KAFABI, Y., OKPANYI, S. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extract and their combination. *Arzneimforsch.* 51: suppl7 545-553, 2001.
- KARGMAM, S., CHARLESON, S., CARTWRIGHT, M., FRANK, J., RIENDEAU, D., MANCINI, J., EVANS, J., O'NEIL, G. Characterization of prostaglandin G/H

- synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*. 111: 445-454, 1996.
- KAWANO, S., TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: D1-6, 2000
- KHENNOUF S, GHARZOULI K, AMIRA S, GHARZOULI A. Effects of *Qercus ilex* L. And *Punica granatum* L. Olyphenols against ethanol induced gastric damage in rat. *Pharmazie* 54: 75-76, 1999.
- KIMURA, M., GOTO S., IHARA, Y., WADA, A., YAHIRO, K., NIIDOME, T., AOYAGI, H., HIRAYAMA, T., KONDO, T. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microb. Pathol.* 31: 29-36, 2001.
- KIVILAAKSO, E., FROM, D., SILEN, W. Relationship between ulceration and intramural pH on gastric mucosa during haemorrhagic shock. *Surgery*. 84: 70-78, 1978.
- KONSTANTOPOULOU, I., VASSILOPOULOU, L., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P., SCOURAS, Z.G. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. *Experientia*. 48: 616-619, 1992.
- KONTUREK, S.J. BRZOZOWSKI, T., MAJKA J., DEMBINSKI, A., SLOMIANY, A., SLOMIANY, B.L. Transforming growth factor and epidermal growth factor in protection and healing of gastric mucosal injury. *Scand. J. Gastroenterol.* 27: 649-655, 1992.

- KOUNTOURAS, J., CHATZOPOULOS, D., ZAVOS, C. Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. *Hepatogastroenterology*. 48: 743-751, 2001.
- KUJUBU, D.A., FLETCHER, B.S., VARNUM, B.C., LIM, R.W., HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* 266: 12866-12872, 1991.
- KURATA, J.H., NOGAWA, A.N., ABBEY, D.E., PETERSEN, F. A prospective study risk for peptic ulcer disease in Seventh-Day Adventists. *Gastroenterology*. 102: 902-909, 1992.
- KURATA, J.H. Ulcer epidemiology: an overview and proposed research framework. *Gastroenterology*. 96: 569-580, 1989.
- KUTCHAI, H.C. Gastrointestinal secretions. In: principles of Physiology. Ed. By R.M. Berne and M.N. Levy, 2nd Edition, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, Missouri, 516-589, 1996.
- LEWIS, D.A., SHAW, G.P. A natural flavonóide and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J. Nutr. Biochem.* 12: 92-100, 2001.
- LEWIS, D.A., HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin In: G. P. Ellis; G. B. West. *Progress Medicinal Chemistry*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 28: 201-231, 1991.
- LIND, T., CEDERBERG, C., EKENVED, G., HAGLAND, U., OLBE, L. Effect of omeprazole (a gastric proton pump inhibitor) on pentagastrin stimulated acid secretion in man. *Gut* 24: 270-276, 1983.

- LOEB, D.S., TALLEY, N.J., AHLQUIST, D.A., CARPENTER, H.A., ZINSMEISTER, A.R.. Long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug use and gastroduodenal injury: the role of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 102: 1899-1905, 1992.
- LOGUERCIO, C., ROMANO, M., DI SAPIO, M., NARDI, G., TARANTO, D., GREELLA, A. Regional variations in total and nonprotein sulfhydryl compounds in the human gastric mucosa and effects of ethanol. *Scand. J. Gastroenterol.* 26: 1042-1048, 1991.
- LYNN, R.B., BROOKS, F.P. "Ulcer Disease: Investigation and Basis for Therapy," edited by E. A. Swabb, S. Szabo. Marcel Dekker, New York. pp. 3-29, 1991.
- MATSUDA H, LI Y, YOSHIKAWA M. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci* 1999; 65: 27-32.
- MCINTOSH, J.H., BYTH, K., PIPER, D.W. Causes of death among a population of gastric ulcer patients in New South Wales, Austrália. *Scand. J. Gastroenterol.* 26: 806-811, 1991.
- MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G. Desenvolvimento de fitoterápicos. Brasil: Robe Editorial. 11-26, 2000.
- MIZUI T., DOUTECHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-unduced gastric lesions in rat. *Jap. J. Pharmacol.* 33: 939-945, 1983.

- MIZUNO, H., SAKAMOTO, C., MATSUDA, K., WADA, K., UCHIDA, T., NOGUCHI, H., AKAMATSU, T., KASUGA, M. Induction of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology*. 112: 387-397, 1997.
- MITJAVILA S, LACOMBE C, CARRERA G, DERACHE R. Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. *J. Nutr.* 107: 2113-2121, 1977.
- MONTANARI, A., CHEN, J., WIDMER, W. Citrus flavonoids: a review of past biological activity against disease. Discovery of the new flavonoids from Dancy tangerine cold pressed peel oil solids and leaves. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439: 103-116, 1998.
- MORIMOTO, Y., OSHIMA, S., HARA, H., SUKAMOTO, T. Effects of Kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jap. J. Pharmacol.* 57: 495-505, 1991.
- MUKOHATA, Y., NAKABAYASHI, S., HIGASHIDA, M. Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett.* 85: 215-218, 1978.
- MURAKAMI, S., MURAMATSU, M., OTOMO, S. Inhibitory effect of tannic acid on gastric H⁺,K⁺-ATPase. *J. Nat. Prod.* 55: 513-516, 1992.
- NARDINI, M., LEONARDI, F., SCACCINI, C., VIRGILI, F. Modulation of ceramide-induced NF- κ B binding activity and apoptotic response by caffeic acid in

- U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 30: 722-733, 2001.
- OLBE, L., CARLSSON, E., LINDBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 132-139, 2003.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants. *Basic Life Sci.* 59, 539-569, 1992.
- O'NEIL, G.P., FORD-HUTCHINSON, A.W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in humans tissues. *FEBS Lett.* 330: 156-160, 1993.
- PAIMELA, H., GODDARD, P.J., SILEN, W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Dig. Dis. Sci.* 40: 2495-2496, 1995.
- PANDOLFINO, J.E., HOWDEN, C.W., KAHRILAS, J.P. Motility-modifying agents and manegent of disordens of gastrointestinal motility. *Gastroenterol.* 118: s32—s47, 2000.
- PAWLIK, T., KONTUREK, P.C., KONTUREK, J.W., KONTUREK, S.J., BRZOZOWSKI, T., CZESNIKIEWICZ, M., PLONKA, M., BIELANSKI, W., ARENY, H. Impact of *Helicobacter pylori* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on gastric ulcerogenesis in experimental animals and in humans. *Euro. J. Pharmacol.* 449: 1-15, 2002.

- PETERSEN, H., KRISTENSEN, P., JOHANNESSEN, T., KLEVELAND, P.M.
DYBDAHL, J.H., MYRVOLD, H. The natural course of peptic ulcer disease and its predictors. *Scand. J. Gastroenterol.* 30 : 17-24, 1995
- PEZARD, C. Le cancer de l'estomac, une maladie infectieuse?. *La Recherche.* 26: 570-571, 1995.
- PIZZI, A. Tanin-Based adhesives. In: PIZZI, A. (ed) wood adhesives. Chemistry and technology, New York, Maecel Dekker. 177-246, 1993.
- POHLE, T., DOMSCHKE, W. Gastric function measurements in drug development. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56(2): 156-164, 2003.
- PORTER, L.J. Flavans and proanthocyanidins. In: HARBONE, J.B. Ed. The flavonoides: advances in reaserch since 1980. New York: Chapman and Hall, 621p, 1998.
- POTT, A., POTT, V.J. Plantas do Pantanal. *Embrapa.* Brasilia. P.29, 1994
- PUSCAS, I., PUSCAS, C., COLTAU, M., PASCA, R., TORRES, J., MÁRQUEZ, M., HERRERO, E., FILLAT, O., ORTIZ, J.A. Comparative study of the safety of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxican-induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung.* 47 (4 A): 568-572, 1997.
- QUAN, C., TALLEY, N.J. Management of peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or NSAIDs. *Am. J. Gastroenterol.* 97 (12): 2950-61, 2002.
- RAFATULLAH S., TARIQ, M., AL-YAHYA, M.A., MOSSA, J.S., AGEEL, A.M. Evaluation of Turmeric (*CURCUMA LONGA*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *J Ethnopharmacol.* 29: 25-34, 1990.

- REPETTO, M.G., LLESUY, S.L. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 523-534, 2002.
- RICE-EVANS CA, MILLER, NJ, PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* 20: 933-956, 1996.
- RICHARDSON, C.T. Úlcera péptica. Em: Tratado de Medicina Interna. Ed. J.C. Wyngaarden, L.H. Smith and J.C. Bennett. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, p. 663-667, 1993.
- SANIOTO, D.L. Sistema digestivo: secreção e digestão. In: Fisiologia, Ed. Por M. Mello Aires, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.
- SANNOMIYA, M., FONSECA, V.B., DA SILVA, M.A., ROCHA, L.R.M., DOS SANTOS, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A., SOUZA BRITO, A.R.M., VILEGAS, W. Flavonoids and ulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J. Ethnopharmacol.* 97: 1-6, 2005.
- SCHAUF, C.L., MOFFETT, D.F., MOFFETT, S.B. O Trato Gastrintestinal. In: Fisiologia Humana, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993.
- SCHENKEL, E.P., GROSMANN, G., PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. IN: Farmacognosia da planta ao medicamento. Rio Grande do Sul e Santa Catarina: Editora da UFSC e UFRS 1ª edição, 1999.

- SHAY, H., KOMAROV, S.A., FELS, S.S., MERANZE, D., GRUENSTEIN, M., SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*. 5: 43-61, 1945.
- SHELDON, J.W., BALICK, M.J., LAIRD, S.A. Ed. New York Botanical Garden, New York. 87-92, 1997.
- SCHMASSMANN, A., PSKAR, B.M., STETTLER, C., NETZER, P., STROFF, T., FLOGERZI, P., HALTE, F. Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br. J. Pharmacol.* 123: 795-804, 1998.
- SCHULTES, R. E.; REIS, S. V.. Ethnobotany – Evolution of a Discipline. Part 8, 285-288, 1995.
- SHIOTANI, A., GRAHAM, D.Y., Pathogenesis and therapy of gastric and duodenal ulcer disease. *Med Clin N Am.* 86: 1447-1466, 2002.
- SILVA, R.S., SILVA, A.P., MUNHOZ, C.B., SILVA. M.C.J., MEDEIROS, M.B. Guia de plantas do cerrado: utilizada na chapada dos veadeiros. *WWF*, Brasília: p.118, 2001.
- SOUZA BRITO, A.R.M. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. *J.Ethnopharmacol.* 54: 131-138, 1996.
- SOUZA BRITO, A.R.M., NUNES, D.S. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. *Ciência e Cultura*, 49(5-6), 402-408, 1997.

- SZABO, S., VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *J Physiol Paris*. 94(2): 77-81, 2000.
- SZELENYI, I., THIEMER, K. Distentions ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Arch. Toxicol*. 41: 99-105, 1978.
- TABATA, M., TOMOMASA, T., ITOH, K., MORIKAWA, A. Effect of 10% ethanol and sofalcone on prostaglandin E₂ content, mucus gel thickness, and experimental ulcers in the stomach of developing rats. *Digestion* 57: 47-53, 1996.
- TAKAGI, K., OKABE, S., SAZIKI, R., A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *J. Pharmac.* 19: 418-426, 1969.
- TANI, S., SUZUKI, T., KANO, S., TANAKA, T., SUNAGA, K., MORISHIGE, R., TSUDA, T. Mechanisms of gastric mucus secretion from cultured rat gastric epithelial cells induced by carbachol, cholecystokinin octapeptide, secretin, and prostaglandin E₂. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 14-18, 2002.
- TEPPERMAN, B.L., JACOBSON, E.D. Circulatory factors in gastric mucosal defense and repair. In: L.R. Johnson, L.R. (Ed), *Physiology of the Gastrointestinal Tract* 3rd ed. Raven Press, New York, 488-493, 1994.
- TSUKIMI, Y., OKABE, S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol. Pharm. Bull.* 24(1):1-9, 2001.
- VANE, J. Towards a better aspirin. *Nature (Lond)* 367: 215-216, 1994.

- VICTOR, B.E., SCHMIDT, K.L., SMITH, G.S., MILLER, T.A. Protection against ethanol injury in the canine stomach: role of mucosal glutathione. *Am. J. Physiol.* 261: 966-973, 1991.
- WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKY, E. M. Plant Drug Analysis. In: A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin: Springer, p. 163 – 192, 1984.
- WALLACE, J.L., DEVCHAND, P.R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. *Br. J. Pharmacol.* 1-8, 2005.
- WALLACE, J.L., MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense e injury. *Exp. Biol. Med.* 226: 1003-1115, 2001.
- WALLACE, J.L, MILLER, M.J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology.* 119: 512-520, 2000.
- WALLACE, J.L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology.* 112: 1000-1016, 1997.
- WALLACE, J.L., GRANGER, D.N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J.* 10: 731-740, 1996.
- WATANABE, Y., KURATA, J.H., KAWAMOTO, K., KAWAI, K. Epidemiological study of peptic ulcer disease among Japanese and Koreans in Japan. *J. Clin. Gastroenterol.* 15: 68-74, 1992.
- WHITTLE, B.J. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fudam. Clin. Pharmacol.* 17: 301-313, 2003.

- WHITTLE, B.J. Nitric oxide in gastrointestinal physiology and pathology, in: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3rd edn, Raven Press, New York. 267-294, 1994.
- WHITTLE, B.J.R., VANE, J.R. Prostanoids as regulators of gastrointestinal function. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, ed. By L.R. Johnson, 2nd ed., Raven Press, New York, 143-180, 1987.
- WOLFE, M.M., SOLL, A.H. The physiology of gastric acid secretion. *N. Engl. J. Med.* 319 (26): 1707-1715, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva. 71 p, 2000.
- YAMADA, C.S.B. Fitoterapia - Sua história e importância. *Revista Racine*. n.6, São Paulo, 1998.
- YAO, X., FORTE, J.G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu. Ver. Physiol.* 65: 103-131, 2003.
- YESILADA, E. Isolation and characterization of free radical from the flowers of *Spartium junceum* by activity-guided fractionation. *J Ethnopharmacol.* 73: 471-478, 2000.
- YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicina moderna. Brasil: Argos – Editora Universitária, 2001.
- XIE, W.L., CHIPMAN, J.G., ROBERTSON, D.L., ERIKSON, R.L., SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase in regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2692-2696, 1991.

ZAVROS, Y., RIEDER, G., FERGUSON, A., SAMUELSON, L.C., MERCHANT, J.L. Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. *Gastroenterology* 122: 119-133, 2002.

ZAYACHKIVSKA, O.S., KONTUREK S.J., DROZDOWICZ, D., KONTUREK, P.C., BRZOZOWSKI, T., GHEGOTSKY, M.R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *J. Physiol. Pharmacol.* 56 Suppl 1: 219-231, 2005.

Mechanisms involved in the gastric antiulcer activity of *Anacardium humile* St. Hil.

Anderson Luiz-Ferreira¹, Clenilson Martins Rodrigues², Adriana Mendes Vinagre³,
Maíra Cola-Miranda¹, Victor Barbastefano³, Elisângela Farias-Silva³, Clélia Akiko
Hiruma-Lima⁴, Lourdes Campaner Santos², Miriam Sannomiya², Wagner Vilegas² and
Alba Regina Monteiro Souza Brito^{3,*}

¹Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brazil

³Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

⁴Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Botucatu, SP, Brazil

Correspondence to: Dr. Souza Brito ARM, Departamento de Fisiologia e Biofísica,
Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109,
CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. abrito@unicamp.br

Telephone: 55- 19- 3788-6192 Fax: 55- 19- 3788-6185

Abstract

Plants extracts are among the most attractive sources for developing new drugs, shown to produce promising results in the treatment of gastric ulcers. To investigate the gastroprotection of an Acetate Fraction (AcF) from *Anacardium humile* St. Hil. and the mechanisms involved. AcF was investigated on ethanol-induced ulcers in rats (50, 100, 200 mg.kg⁻¹ p.o.) and on piroxicam-induced ulcers in mice (50 mg.kg⁻¹ p.o.). Lansoprazole (30 mg.kg⁻¹) or cimetidine (100 mg.kg⁻¹) was used as a positive control. PGE₂, gastric adherent mucous and gastroprotection obtained with AcF (50 mg.kg⁻¹ p.o.) in ethanol-induced lesions in rats pretreated with L-NAME or NEM were also analysed. TLC and NMR were used to elucidate the phytochemistry constituents. Ethanol-induced ulcers, AcF protected gastric mucosal injury by 73% when compared to the vehicle. Piroxicam-induced ulcers, AcF inhibited gastric ulcer action by 45%. AcF increased the production of PGE₂ by 10-fold and the gastric mucous production. The gastroprotection by AcF in ethanol-induced gastric lesions was completely abolished by pretreatment with L-NAME or NEM. The major compounds are gallic acid derivatives, flavonoids and catechins. Nitric oxide and sulfhydryl compounds release, besides an increase in gastric mucous and in prostaglandin, are involved in the gastroprotection of AcF.

Key words: *Anacardium humile*; acetate fraction; antiulcer activity; gastroprotection

Introduction

Gastric hyperacidity and ulcer action are common causes of suffering in humans. Gastric ulcers result from an imbalance between damaging factors and protective mechanisms in the mucosal barrier (Rao et al 2000). Several factors may be involved in the pathogenesis of ulcers, including a genetic predisposition, altered acid secretion, rapid gastric emptying, defective mucosal defense mechanisms, psychological and physical stress, and smoking (Quan & Talley 2001).

Early surgical advances in the management of peptic ulcers have largely been replaced by treatment with histamine H₂-receptor antagonists and proton pump inhibitors, which are currently the major therapeutic strategy against acid disorders (Brzozowski 2003) and gastric ulcers. However, these drugs are not completely effective and may cause adverse effects (Alper 1993). Extracts and active principles of plants may serve as a source for the development of new drugs (Gonzales et al 2000).

Anacardium humile St. Hil. (Anacardiaceae), popularly known as “cajueiro-do-campo”, is a shrub (≅ 30 cm tall), with very long roots, small flowers, a greenish calyx, and red petals with white stripes. This species occurs in the Cerrado, savannah-like vegetation with a xeromorphic tree and scrub woodland (Lorenzi & Abreu Matos 2002). *Anacardium* species are known for their high content of tannins that have anti-inflammatory and adstringent effects (Mota et al 1985). In addition to tannins, *Anacardium* species also produce anacardic acids, which are active against cancer cells (De Souza et al 1992; Laurens et al 1987; Mendes et al 1990; Kubo et al 1993), cinnamic acid derivatives (Bicalho et al 2000) and biflavonoid C-glycosides (Murthy et al 1982). Some of these classes of compounds have beneficial effects on

gastrointestinal ulcers Nardini et al 2001). Considering the limited amount pharmacological and ethnopharmacological data available for *A. humile* St. Hil., and based on previous phytochemical results (unpublished data), the goal of this work was to investigate the antiulcerogenic action of an acetate fraction obtained from the leaves of this species. Gastric ulcers induced by different agents in mice and rats were used to examine the possible mechanisms involved in this action.

Materials and Methods

Plants

Anacardium humile St. Hil. was collected along Monte do Carmo road, in Porto Nacional in Tocantins state, Brazil. The plants were identified by Marcos Alves and Eduardo Ribeiro of the University of Tocantins and a voucher specimen was deposited (accession number 1922) in the University of Tocantins Herbarium.

Preparation of Acetate Fraction (AcF)

Air-dried and powdered leaves (650 g) of *A. humile* St. Hil. were exhaustively extracted with 5 L dichloromethane (DCM) and 5 L of methanol (MeOH), successively, at room temperature (one week for each solvent). Solvents were evaporated at 60°C under reduced pressure to yield the DCM (6 g) and MeOH (193 g) extracts. A portion of the MeOH extract (80 g) was partitioned between 5 L of a mixture of EtOAc/water to yield 3.4 g of the EtOAc fraction and 74 g of the aqueous fraction (AqF). Flavonoids were detected in AcF as described elsewhere (Wagner et al 1984).

A portion (1 g) of the MeOH extract of *A. humile* St. Hil. was fractionated by gel permeation chromatograph on a Sephadex LH-20 (Pharmacia) column (5 cm x 100 cm) and eluted with MeOH (flow rate 0.5 ml.min⁻¹). One hundred fractions (5 mL each) were collected and checked by Thin Layer Chromatography (TLC) on silica gel plates eluted with a mixture of CHCl₃/MeOH/n-PrOH/H₂O (5:6:1:4; lower phase) and developed either with Natural Products - Polyethlenglycol Reagent or with anisaldehyde/sulfuric acid solution (Wagner et al 1984). The fractions were subsequently combined and further purified by HPLC using a Knauer Chance system equipped with a Waters R401 refractive index detector, a Phenomenex Luna reverse-phase RP 18 column (25 cm X 1 cm X 10 μm) and a Rheodyne injector with a 100 μl sample loop. MeOH-H₂O (8:2, v/v) was used as the eluent (flow rate 2 ml.min⁻¹). Fractions 64-72 (150 mg) yielded gallic acid 1 (50 mg) and methyl gallate 2 (75 mg); fractions 98-103 (75 mg) yielded (+)-catechin 3 (50 mg); fractions 119-124 (35 mg) yielded quercetin-3-*O*-β-D-allopyranoside 4 (5 mg) and quercetin-3-*O*-β-D-galactopyranoside 5 (8 mg); fractions 144–149 (35 mg) yielded quercetin-3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (rutin, 8 mg) 6; and fraction 178–200 (200 mg) yielded the biflavonoid amentoflavone 7 (165 mg) (Fig. 1). All of the isolated substances were analyzed by NMR and their spectral data were compared to those reported in the literature (Harbone 1993; Agrawal 1989).

The chromatographic profile of AcF was obtained using an HPLC system (ProStar, Varian) equipped with a ProStar 330 photodiode-array ultraviolet detector (PDA), a Rheodyne injector (20 μl), a Phenomenex Luna RP-18 column (250 x 4.6 mm i.d. 5 μm) and a RP-18 Phenomenex guard column (4 x 4.6 mm, i.d. 5 μm). Elution was

performed with a linear gradient of water (A) and acetonitrile (B) (with 0.05% of trifluoroacetic acid) from 23 to 30% of B in 5 min, then from 30 to 48% of B in 40 min and then from 48 to 100% of B in 65 min. Flow rate was 1.0 ml.min⁻¹ and effluent was monitored at 210 nm and at 360 nm.

The determination of the concentration of the metabolites present in AcF was performed using external calibration. Flavonoids were expressed based on rutin, in the calibration range between 5 - 500 µg.ml⁻¹ ($y = -4,81.10^5 + 1,91.10^5 x$, R = 0,9999, N = 6); gallic acid derivatives were expressed based on gallic acid, in the calibration range between 2 - 200 µg.ml⁻¹ ($y = -9,69.10^4 + 2,38.10^5 x$, R = 0,9998, N = 9); catechins were expressed in terms of (+)-catechin, in the calibration range between 1 - 70 µg.ml⁻¹ ($y = 1,40.10^5 + 8,93.10^5 x$, R = 0,9999, N = 6).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra in DMSO-d₆ were obtained using a Varian INOVA 500 spectrometer operated at 500 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C. The 2D analyses included ¹H-¹H-COSY (chemical shift correlation spectroscopy), inverse-detected ¹H-¹³C HSQC (heteronuclear single quantum coherence) and HMBC (heteronuclear multiple bond connectivity).

Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) was done using a Fisons VG Platform instrument operating in the positive mode (70 V). Samples were dissolved in methanol and injected directly into the mass spectrometer through a Rheodyne injector. Acetonitrile was used as solvent and nitrogen gas was used as the drying gas and for nebulization.

Animals

Male Swiss albino mice (30-40 g) and male Wistar rats (180-250 g) obtained from the breeding colony at the Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) were used. The animals were housed on a 12 h light/dark cycle, at a humidity of $60 \pm 10\%$ and a temperature of 21.5 ± 1.0 °C and were fed a certified Nuvilab CR-a[®] (Nuvital) diet, with free access to tap water. All of the experiments were done in the morning. The experimental protocols were approved by the Committee for Ethics in Animal Research (CEEA/IB/UNICAMP, protocol number 538–1).

Drugs

Lansoprazole (Medley, Campinas, SP, Brazil), cimetidine, indomethacin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.) and Tween 80[®] (Synth, São Paulo, Brazil) were used in this study. The reagents for buffers and other solutions were all of analytical grade. All drugs and reagents were prepared immediately before use. The acetate fraction (AcF) obtained from the leaves of *A. humile* St. Hil. was dissolved in 12% Tween 80[®]. Drugs such as cimetidine and lansoprazole and the plant AcF were always given orally by gavage.

Ethanol-induced Gastric Lesions

The assay was done according to (Morimoto et al 1991). Rats were fasted for 24 h before the experiment, but had free access to water. One milliliter of absolute ethanol was administered orally to rats treated 1 h previously with 12% Tween 80[®] (vehicle, 10 ml.kg⁻¹), lansoprazole (30 mg.kg⁻¹) or AcF (50, 100 and 200 mg.kg⁻¹). One hour

after the administration of ethanol, the rats were killed and the stomachs were removed for examination. The damaged area (mm^2) was measured under a dissection microscope (x10) fitted with an ocular micrometer. The sum of the area of all lesions in the corpus for each rat was calculated and used as the ulcerative index. Gastroprotection (%) was calculated as $\% \text{ gastroprotection} = (\text{UIC} - \text{UIT}) \times 100/\text{UIC}$, where UIC and UIT are the ulcer indices in control and treated rats, respectively (Szelenyi & Thiemer 1978).

Piroxicam-induced Gastric Lesions

These experiments were done according to (Hayden et al 1978) with the modifications described by (Puscas et al 1997). Gastric lesions were induced with piroxicam (30 mg.kg^{-1} , s.c.) administered to mice after a 36 h fast. AcF (50 mg.kg^{-1}), cimetidine (100 mg.kg^{-1}) or 12% Tween 80[®] (vehicle 10 ml.kg^{-1}) was given orally 30 min before the induction of gastric lesions. The mice were killed by cervical dislocation 4 h after treatment with the ulcerogenic agents and the stomachs were removed, and the gastric damage was assessed as described above.

Assessment of prostaglandin production

Rats were deprived of food for 12 h prior to the experiments, which were done between 9:00 and 11:00 a.m. Groups of rats received 12% Tween 80[®] (vehicle, p.o.), indomethacin (30 mg.kg^{-1} , s.c., positive control), or AcF (50 mg.kg^{-1} , p.o.). Indomethacin was dissolved in 5% sodium bicarbonate solution (pH 8.3). Other rats were pretreated with indomethacin 30 min before the administration of AcF (50

mg.kg⁻¹). Thirty minutes after receiving AcF, the rats were killed by cervical dislocation and the abdomen was opened. The gastric mucus was excised, weighed and placed in 1 ml of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4).

After homogenizing with a Polytron[®] PT 10-35 homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland), the homogenate was incubated in a Dubnoff water-bath (Tecnal, Piracicaba, Brazil) at 37°C for 20 min and the amount of PGE₂ in the buffer was measured by enzyme immunoassay using a commercial kit (RPN222, Amersham). The absorbance was read at 450 nm and the amount of PGE₂ expressed as pg/wet weight of tissue, was determined from a standard curve of PGE₂ (Curtis et al 1995), with minor modifications.

Determination of Mucus in the Gastric Content

This assay was done as described by (Rafatullah et al 1990) with some modifications. Rats were fasted for 24 h and, under anesthesia, the abdomen was incised and the pylorus ligated, after which 12% Tween 80[®] (vehicle 10 ml.kg⁻¹), carbenoxolone (200 mg.kg⁻¹) or AcF (50 mg.kg⁻¹) was given orally. The rats were killed by cervical dislocation 4 h after ligation and the glandular segments of the stomachs were removed and weighed. Each glandular segment was immediately immersed in 10 ml of 0.1% alcian blue solution (0.16 M sucrose/0.05 M sodium acetate, pH 5.8). After immersion for 2 h, excess dye was removed by two successive rinses with 10 ml of 0.25 M sucrose, first for 15 min and then for 45 min. The glandular segments were sequentially transferred to 0.5 M magnesium chloride solution and shaken for 2 h. Four milliliters of the blue extract was then shaken vigorously with an equal volume

of ether. The resulting emulsion was centrifuged at 3600 rpm and the absorbance of the aqueous layer was read at 580 nm. The amount of alcian blue extracted per gram of wet glandular tissue was then calculated.

Ethanol-induced Gastric Lesions in N^G-nitro-L-arginine methyl ester-pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous nitric oxide (NO) in the protective effects of AcF (50 mg.kg⁻¹), carbenoxolone (100 mg.kg⁻¹) and 12% Tween 80[®] (vehicle, 10 ml.kg⁻¹) administered orally, the nitric oxide synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 70 mg.kg⁻¹, dissolved in saline solution), injected intraperitoneally 30 min before the oral treatments (Matsuda et al 1999). The stomachs were subsequently removed and the gastric damage was assessed as described above.

Ethanol-induced Gastric Lesions in N-ethylmaleimide pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous sulfhydryl in the protective effects of AcF (50 mg.kg⁻¹), carbenoxolone (100 mg.kg⁻¹) and 12% Tween 80[®] (vehicle 10 ml.kg⁻¹) administered orally, a blocker of sulfhydryl compounds, the N-ethylmaleimide (NEM, 70 mg.kg⁻¹, dissolved in saline solution) injected intraperitoneally 30 min before the administration the oral treatments (Matsuda et al 1999). The stomachs were subsequently removed and the gastric damage was assessed as described before.

Statistical Analysis

The results were expressed as the mean \pm S.D. Statistical significance among groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey tests, with $p < 0.05$ indicating significance. All statistical analyses were done using Prism software (GraphPad, San Diego, California, USA).

Results

The ethanol-induced gastric ulcer model was used to select the best dose for testing the antiulcerogenic activity of AcF. As shown in Fig. 2, the greatest gastroprotection was obtained with an AcF dose of 50 mg.kg^{-1} , and this dose was used in all subsequent experiments. In piroxicam-induced gastric ulcers, AcF (50 mg.kg^{-1}) and cimetidine (100 mg.kg^{-1}) inhibited gastric ulcers by 45% and 60%, respectively (Fig. 3). In the Fig. 4 shows the PGE_2 levels in rat gastric tissue. Treatment with AcF (50 mg.kg^{-1}) significantly increased the production of PGE_2 by the glandular cells by about 10-fold. As expected, indomethacin (30 mg.kg^{-1} , s.c.) markedly decreased the basal prostaglandin synthesis and abolished the increase caused by AcF. The AcF (50 mg.kg^{-1}) and carbenoxolone (200 mg.kg^{-1}) significantly increased the amount of alcian blue bound to the gastric mucous (Fig. 5). The gastroprotection provided by AcF (50 mg.kg^{-1}) or carbenoxolone (100 mg.kg^{-1}) in ethanol-induced gastric lesions in rats was completely inhibited by pretreatment with L-NAME (Fig.6) and NEM (Fig 7).

The chromatographic profile obtained by HPLC-UV-PDA analysis and detection at 210 nm (Fig. 8a) led to the recognition of three classes of secondary metabolites in AcF: gallic acid derivatives, catechins and flavonoids (flavonoid glycosides and

biflavonoid). Flavonoid glycosides were better detected at 360nm (Fig. 8b). Determination of each class was accomplished using HPLC analyses and external calibration (Table 1). The most abundant classes of compounds were gallic acid derivatives ($728.71 \pm 3.78 \text{ mg.g}^{-1}$ of AcF) and flavonoids ($122.09 \pm 1.07 \text{ mg.g}^{-1}$ of AcF). Methyl gallate ($228.04 \pm 1.11 \text{ mg.g}^{-1}$ of AcF), gallic acid ($103.08 \pm 0.64 \text{ mg.g}^{-1}$ of AcF), amentoflavone ($29.33 \pm 0.82 \text{ mg.g}^{-1}$) and (+)-catechin ($21.14 \pm 0.45 \text{ mg.g}^{-1}$ of AcF) were the most abundant substances.

Discussion

Ulcers are caused by an imbalance between damaging factors within the lumen and protective mechanisms within the gastroduodenal mucosa (Brzozowski 2003). In this study, we examined the antiulcerogenic activity of an acetate fraction (AcF) from *A. humile* St. Hil. An oral dose of 50 mg.kg^{-1} of AcF provided 73% protection against gastric ulcers induced by ethanol. The oral administration of ethanol causes progressive disruption of gastric cell membranes and rapid cellular exfoliation with exposure of the lamina propria. Ethanol produces numerous gastric mucosal lesions, decreases gastric blood flow, and increases the expression of inflammatory mediators such as IL-1 β and TNF α and the generation of reactive oxygen species (Kwiecien et al 2002). The repair of macroscopic gastric lesions mediated by changes in gastric mucosal blood flow, prostaglandin synthesis, growth factor formation, mucus layer and secretion acid has been studied (Murai et al 1996). Ethanol-induced ulcers ulceration is inhibited by anti-secretory agents such as cimetidine and by agents that enhance mucosal defensive factor (Wolfe & Sachs 2000). As shown here, AcF (50

mg.kg⁻¹) significantly protected against ethanol-induced ulcers in rats, perhaps through an ability to increase the release of protective substances. Agents that enhance mucosal defense factors, such as prostaglandins, protect the gastric mucosa against ethanol-induced injury (Morimoto et al 1991).

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induce gastric mucosal damage, including bleeding, ulceration and perforation, in humans and animals (Villegas et al 2004; Hawkey 2000). NSAIDs, such as aspirin, cause mucosal damage by inhibiting prostaglandin synthesis and increasing the acid secretion and back diffusion of H⁺ ions (Rao et al 2000). In piroxicam-induced gastric ulcers, the protection offered by AcF (50 mg.kg⁻¹) was not completely abolished by an inhibitor of cyclooxygenase, the enzyme that converts arachidonic acid to prostaglandins. In the stomach, prostaglandin synthesis protects against damage by enhancing mucosal blood flow and stimulating the release of mucous and bicarbonate secretion (Hawkey 2000). AcF (50 mg.kg⁻¹) increased PGE₂ formation by 10-fold, and this was inhibited by indomethacin (30 mg.kg⁻¹ s.c.). Prostaglandin synthesis depends on the activity of cyclooxygenase (COX), a rate-limiting enzyme in the synthesis of eicosanoids (Brzozowski 2003). Our data suggest that the cytoprotective action of AcF on the gastric mucosa may be related to an increase in cyclooxygenase activity, although this enzyme activity was assessed only indirectly. The protective action of prostaglandins involves enhanced mucosal blood flow and the stimulation of mucous and bicarbonate secretion (Hawkey 2000), as well as the inhibition of TNF formation in human macrophages (Dooper et al 2002).

The gastric epithelium is covered by a continuous mucous layer that adheres to the mucosa surface (Johansson et al 2000). This adherent mucous gel, together with

bicarbonate secreted by the epithelium, serves as an unstirred buffering barrier against damage by luminal acid (Lynn & Brooks 1991). Endogenous prostaglandins play an important role in stimulating gastric mucous secretion (Hawkey 2000). Pretreatment with AcF (50 mg.kg^{-1}) and carbenoxolone (200 mg.kg^{-1}) significantly increased the adherent mucous in the gastric juice compared to the control group. This increase probably contributed to the cytoprotective effects of AcF in the mucosal barrier. The mucous gel contains numerous phospholipids (Goddard et al 1990), which represents a surfactant layer that accounts for the strong hydrophobic nature of the gastric luminal surface and provides protection against damaging agents. The marked difference between the increase in prostaglandin synthesis and mucus secretion suggests that there may be a regulatory system to prevent exhaustion of the mucus supply in the gastrointestinal mucosa (Tani et al 2002).

Nitric oxide (NO) released from endogenous sources or from glyceryl trinitrate (Brzozowski et al 1996) is gastroprotective and accelerates healing, mainly by maintaining the blood flow around ulcers and enhancing angiogenesis. As shown here, prior administration of L-NAME, an NO-synthase inhibitor, completely inhibited the antiulcerogenic activity of AcF (50 mg.kg^{-1}) and of the positive control carbenoxolone (100 mg.kg^{-1}), suggesting that NO formation had a central role in the gastroprotection by AcF. NO participates in gastric defense by regulating the gastric mucosal blood flow and gastric mucous secretion; consequently, the inhibition of NO biosynthesis can adversely affect gastrointestinal motility and blood flow (Wallace & Miler 2000).

Sulfhydryl compounds (SH) have been extensively implicated in the maintenance of gastric integrity, particularly when reactive oxygen species are involved in the pathophysiology of tissue damage (kimura et al 2001). Indeed, the tripeptide GSH

participates in many aspects of oxidative metabolism, including the removal of hydroperoxides, the protection from ionizing radiations, the maintenance of the physiological sulfhydryl status of proteins, and the condensation with xenobiotics or endogenous reactive compounds, to aid their detoxification and excretion (Hayes & McLellan 1999). In this respect, the present increase of tissue damage, evoked by ethanol in the rats pretreated with N-ethylmaleimide (NEM), was expected because ethanol-induced gastric damage was associated with a significant reduction of mucosal GSH levels in both humans (Loguercio et al 1991) and experimental animals (Victor et al 1991). Moreover, the administration of GSH prevents the ethanol-induced gastric injury in humans (Loguercio et al 1991) and treatment with sulfhydryl donor drugs protects the gastric mucosa against injuries evoked by necrotizing agents, stress, or ischemia (Tepperman & Jacobson 1994). In this context, the antiulcerogenic activity of AcF (50 mg.kg⁻¹) may depend on mucosal GSH levels, and it is likely that an increase of endogenous sulfhydryl compounds has important role in the gastroprotective properties of this fraction. Proving this, NEM, a potent blocker of sulfhydryl compounds, fully prevented the protective effects of AcF (50 mg.kg⁻¹) and positive control carbenoxolone (100 mg.kg⁻¹) against ethanol.

Phytochemical studies have shown that gallic acid derivatives, flavonoids and catechins are present in the AcF of *A. humile* St. Hil. These substances are secondary metabolites present in plants and have attracted the attention of many researches because the broad range of their biological activities (Harbone 1993).

There are many studies related to the antiulcerogenic properties of flavonoids (Gracioso et al 2002). Several mechanisms have already been suggested for the effect of antiulcerogenic compounds, including increase the gastric hexosamine level and

enhancing the strength of the gastric barrier either physically or by blocking the H⁺, K⁺-ATP-ase pump (Repetto & Llesuy 2002) Probably, the compounds present in the tested plant might exert their activities by one or more of these proposed mechanisms. Recently, the generation of oxygen derived free radicals was implicated with lipid peroxidation and consequent decrease of protecting factors as one of the most important mechanisms involved in the pathogenesis of gastric ulcer.

The presence of catechins **3** in the AcF may contribute for the gastroprotective activity observed in *Anacardium humile* St. Hil. since this class of compounds was reported to inhibit lipid peroxidation due to its very potent antioxidant activity (Iwai et al 2001). Moreover, flavonoids, mainly those derived from quercetine like **4** and **5**, possess antioxidant activity (Rice-Evans et al 2002). Despite the glycosylation of flavonoids reduced their activity when compared to the corresponding aglycones (Makris & Rossiter, 2001), literature also reports that rutin **6** and amentoflavone **7** displays both antioxidant and antiulcer activities (La Casa et al 2000; Goel et al 1988; Ghambir et al 1987; Cholbi et al 1991). Thus, the high quantity of amentoflavone could explain the observed anti-ulcer activity.

Regarding phenolic substances like gallic acid derivatives, literature describes that additional hydroxyl groups make phenols better antioxidants (Lien et al 2004). In fact, gallic acid and methyl gallate present antioxidant activity higher than those of (+)-catechin and flavonol glycosides (Rice-Evans et al 2002). Moreover, galloyl derivatives were described as a potent inhibitor of H⁺, K⁺-ATPase and may be responsible for inhibition of acid secretion by *Paeoniae radix*. Therefore, the high amount of these phenolic acids might explain the activity of AcF against gastric ulcers.

In conclusion, this study showed that the acetate fraction obtained from the leaves of *A. humile* St. Hil. has gastroprotective activity. Phytochemical evaluation carried out on the AcF afforded catechins, quercetin derivatives, rutin and amentoflavone. Since phenolic acids, catechins and flavonoids were the secondary metabolites found in the active fractions of *Anacardium humile* St. Hil., we suggest that these substances are related to the observed defense against gastric ulcers. This protection also involves enhanced prostaglandin synthesis, mucous production as well as NO and endogenous sulfhydryl compounds formation.

Acknowledgements

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support, to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for a fellowship to ALF and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for grants to ARMSB and WV.

References

- Alper, J. (1993) Ulcers as an infectious disease. *Science* **260**: 159-160.
- Agrawal, P. K. (1989) Carbon 13 NMR of Flavonoids. In: Agrawal PK, Bansal MC. Other Flavonoids. Amsterdam: Elsevier, 236-282.
- Bicalho, B., Pereira, A. S., Aquino Neto, F. R., Pinto, A. C., Rezende, C. M. (2000) Application of high-temperature gas chromatography-mass spectrometry to the investigation of glycosidically bound components related to cashew apple (*Anacardium occidentale* L. Var. nanum) volatiles. *J. Agr. Food Chem.* **48**: 1167-1174.
- Brzozowski, T. (2003) Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – Polish achievements. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**: 99-126.
- Brzozowski, T., Konturek, S. J., Liwowski, Z., Pytko-Polonczyk, J., Szlachcic, A., Drozdowicz, D. (1996) Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection against acid-independent and acid-dependent ulcerogens. *Digestion* **57**: 424-428.
- Cholbi, M. R., Paya, M., Alcaraz, M. J. (1991) Inhibitory effects of phenolic-compounds on CCl₄-induced microsomal lipid-peroxidation. *Experientia* **47**: 195-199.
- Curtis, G. H., MacNaughton, W. K., Grant, G. D., Wallace, L. (1995) Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**: 130-134.

- De Souza, C. P., Mendes, N. M., Jannotti Passos, J. K., Pereira, J. P. (1992) The use of the shell of the cashew nut, *Anacardium occidentale*, as an alternative molluscicide. *Rev. Inst. Med. Trop.* **34**: 459-466.
- Dooper, M. M., Wassink, L., M'Rabet, L., Graus, Y. M. (2002) The modulatory effects of prostaglandin-E on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells are independent of the prostaglandin subtype. *Immunology* **107**: 152-159.
- Gambhir, S. S., Goel, R. K., Das Gupta, G. (1987) Anti-inflammatory and antiulcerogenic activity of amentoflavone. *Indian J. Med. Res.* **85**: 689-693.
- Goddard, P. J., Kao, Y. C., Lichtenberger, L. M. (1990) Luminal surface hydrophobicity of canine gastric mucosa is dependent on a surface mucus gel. *Gastroenterology* **98**: 361-370.
- Goel, R. K., Gambhir, S. S., Das Gupta, G. (1988) Mechanisms of antiallergenic effect of amentoflavone. *Indian J. Med. Res.* **88**: 192-196.
- Gonzales, E., Iglesias, I., Carretero, E., Villar, A. (2000) Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **70**: 329-333.
- Gracioso, J. S., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C. A., Souza Brito, A. R. (2002) Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 487-491.
- Harborne, J. B. (1993) The Flavonoids: Advances in Research since 1986. In: Geiger H. Biflavonoids and triflavonoids. New York: Chapman & Hall, pp. 95-115.
- Hawkey, C. J. (2000) Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* **119**: 521-535.

- Hayden, L. J., Thomas, G., West, G. B. (1978) Inhibitors of gastric lesions in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **30**: 244-246.
- Hayes, J. D., McLellan, L. I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stresses. *Free Radical Res.* **31**: 273-300.
- Iwai, K., Onodera, A., Matsue, H. (2001) Antioxidant activity and inhibitory effect of Gamazumi (*Viburnum dilatatum* Thumb.) on oxidative damage induced by water immersion restrain stress in rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **52**: 443-451.
- Johansson, M., Synnerstand, I., Holm, L. (2000) Acid transport through channels in the mucous layer of rat stomach. *Gastroenterology* **119**: 1297-1304.
- Kimura, M., Goto, S., Ihara, Y., Wada, A., Yahiro, K., Niidome, T, Aoyagi, H., Hirayama, T., Kondo, T. (2001) Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microb. Pathol.* **31**: 29-36.
- Kubo, I., Ochi, M., Vieira, P. C., Komatsu, S. (1993) Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *J. Agr. Food Chem.* **41**: 1012-1015.
- Kwiecien, S., Brzozowski, T., Konturek, S. J. (2002) Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J. Physiol. Pharmacol.* **53**: 39-50.
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcón de la Lastra, C., Motilva, V., Martín Calero, M. J. (2000) Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 45-53.
- Laurens, A., Belot, J., Delorme, C. (1987) Molluscicidal activity of *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). *Ann. Pharm. Fr.* **45**: 471-473.

- Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., Wang, R. (2004) Antioxidant phenolic constituents in roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: structure-radical scavenging activity relationships. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 7884-7890.
- Loguercio, C., Romano, M., Di Sapia, M., Nardi, G., Taranto, D., Grella, A. (1991) Regional variations in total and nonprotein sulfhydryl compounds in the human gastric mucosa and effects of ethanol. *Scand. J. Gastroenterol.* **26**: 1042-1048.
- Lorenzi, H., Abreu Matos, F. J. (2002) Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas. São Paulo: *Instituto Plantarum*.
- Lynn, R. B., Brooks, F. P. (1991) Ulcer Disease. In: Investigation and Basis for Therapy. New York, pp. 3-29.
- Makris, D. P., Rossiter, J. T. (2001) Comparison of quercetin and a non-ortho dihydroxyl-flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidations reactions. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 3370-3377.
- Matsuda, H., Li, Y., Yoshikawa, M. (1999) Role of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci.* **65**: 27-32.
- Mendes, N. M., de Oliveira, A. B., Guimaraes, J. E., Pereira, J. P., Katz, N. (1990) Molluscicide activity of a mixture of 6-n-alkyl salicylic acids (anacardic acid) and 2 of its complexes with copper (II) and lead (II). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **23**: 217-224.
- Morimoto, Y., Oshima, S., Hara, H., Sukamoto, T. (1991) Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal

- defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jpn. J. Pharmacol.* **57**: 495-505.
- Mota, M. L., Thomas, G., Barbosa Filho, J. M. (1985) Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J. Ethnopharmacol.* **13**: 289-300.
- Murai, T., Watanabe, S., Hiroshi, M., Miwa, H., Miyazaki, A., Sato, N. (1996) Ethanol retards gastric epithelial restoration in monolayer cultures. *Dig. Dis. Sci.* **41**: 2062-2069.
- Murthy, S. S. N., Anjaneyulu, A. S. R., Ramachandra, R. L., Pelter, A., Ward, R. S. (1982) Chemical examination of *Anacardium occidentale* - isolation and structure determination of a novel biflavonoid-c-glycoside. *Planta Med.* **45**: 3-10.
- Nardini, M., Leonardi, F., Scaccini, C., Virgili, F. (2001) Modulation of ceramide-induced NF-kappa β binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 722-733.
- Puscas, I., Puscas, C., Coltau, M., Paşca, R., Torres, J., Márquez, M. Herrero, E., Fillat, O., Ortiz, J. A. (1997) Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung* **47**: 568-572.
- Quan, C., Talley, N. J. (2002) Management of peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or NSAIDs. *Am. J. Gastroenterol.* **97**: 2950-2961.
- Rafatullah, S., Tariq, M., Al-Yahya, M. A., Mossa, J. S., Ageel, A. M. (1990) Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *J. Ethnopharmacol.* **29**: 25-34.

- Rao, C. V., Saïram, K., Goel, R. K. (2000) Experimental evaluation of *Bocopa monniera* on rat gastric ulceration and secretion. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **44**: 435–441.
- Repetto, M. G., Llesuy, S. F. (2002) Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**: 523-534.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, (1996) G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* **20**: 933-956.
- Szelenyi, I., Thiemer, K. (1978) Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Arch. Toxicol.* **41**: 99-105.
- Tani, S., Suzuki, T., Kano, S., Tanaka, T., Sunaga, K., Morishige, R., Tsuda, T. (2002) Mechanisms of gastric mucus secretion from cultured rat gastric epithelial cells induced by carbachol, cholecystokinin octapeptide, secretin, and prostaglandin E₂. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 14-18.
- Tepperman, B. L., Jacobson, E. D. (1994) Circulatory factors in gastric mucosal defense and repair. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, pp. 1331-1351.
- Victor, B. E., Schmidt, K. L., Smith, G. S., Miller, T. A. (1991) Protection against ethanol injury in the canine stomach: role of mucosal glutathione. *Am. J. Physiol.* **261**: G966-G973.
- Villegas, I., La Casa, C., de la Lastra, C. A., Motilva, V., Herrerias, J. M., Martin, M. J. (2004) Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: role of prostaglandins and inflammatory response. *Life Sci.* **74**: 873-884.

Wagner, H., Blatt, S., Zgainsky, E. M. (1984) Plant Drug Analysis. In: A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin: Springer, pp. 163 – 192.

Wallace, J. L., Miler, M. J. (2000) Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* **119**: 512-520.

Wolfe, M. M., Sachs, G. (2000) Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. *Gastroenterology* **118**: 9-31.

Table 1. Concentration of the secondary metabolites present in the AcF from *A. humile* St. Hil.

Figure 1 – Compounds found in the leaves of *Anacardium humile* St. Hil.

Figure 2. Effects of orally administered acetate fraction (AcF; 50, 100 and 200 mg.kg⁻¹) obtained from the leaves of *A. humile* St. Hil. and of lansoprazole on ethanol-induced gastric ulcers in rats. The columns are the mean±S.D. of 5 rats. Different letters indicate significant differences. ANOVA: $F_{(4,22)} = 8.521$ ($p < 0.05$, Tukey test).

Figure 3. Effects of orally administered acetate fraction (AcF; 50 mg.kg⁻¹) obtained from the leaves of *A. humile* St. Hil. and of cimetidine on piroxicam-induced gastric ulcers in mice. The columns are the mean±S.D. of 8 mice. Different letters indicate significant differences. ANOVA: $F_{(2,21)} = 14.36$ ($p < 0.05$, Tukey test).

Figure 4. Effects of orally administered acetate fraction (AcF; 50 mg.kg⁻¹) obtained from the leaves of *A. Humile* St. Hil. and of indomethacin on gastric prostaglandin E₂ (PGE₂) production in rats. The columns are the mean±S.D of 5 rats. Different letters indicate significant differences. ANOVA: $F_{(4,20)} = 144.6$ ($p < 0.05$, Tukey test).

Figure 5. Effects of orally administered acetate fraction (AcF; 50 mg.kg⁻¹) obtained from the leaves of *A. humile* St. Hil. and of carbenoxolone on adherent gastric mucous (measured as the amount of alcian blue bound) in pylorus-ligated rats. The columns

are the mean±S.D. of 5 rats. Different letters indicate significant differences. ANOVA: $F_{(2,12)} = 7.455$ ($p < 0.05$, Tukey test).

Figure 6. Effects of orally administered acetate fraction (AcF; 50 mg.kg⁻¹) obtained from the leaves of *A. humile* St. Hil. and of carbenoxolone on ethanol-induced gastric ulcers in rats pretreated with L-NAME. The columns are the mean±S.D. of 5 rats. Different letters indicate significant differences. ANOVA: $F_{(5,28)} = 18.89$ ($p < 0.05$, Tukey test).

Figure 7. Effects of orally administered acetate fraction (AcF; 50 mg.kg⁻¹) obtained from the leaves of *A. humile* St. Hil. and of carbenoxolone on ethanol-induced gastric ulcers in rats pretreated with NEM. The columns are the mean±S.D. of 5 rats. Different letters indicate significant differences. ANOVA: $F_{(5,24)} = 242.6$ ($p < 0.05$, Tukey test).

Figure 8. A) HPLC chromatographic profile of the AcF from *A. humile* St. Hil. monitored at 210 nm. **1.** Gallic acid, **a.** Unknown, **b.** Unknown catechin, **2.** Methyl gallate, **3.** (+)-catechin, **c.** Gallic acid derivative, **6.** Amenthoflavone, * Flavonoid glycosides and gallic acid derivatives. **B)** Elution monitored at 360 nm for flavonol glycosides. For conditions, see text.

Substance or class	Concentration \pm SD (mg.g ⁻¹)
Gallic acid derivatives	
Gallic acid	103.08 \pm 0.64
Methyl gallate	228.04 \pm 1.11
Unknown gallic acid derivatives	329.59 \pm 3.65
Total	728.71 \pm 3.78
Catechins	
(+)-Catechin	21.14 \pm 0.45
Unknown catechins	4.34 \pm 0.08
Total	29.70 \pm 0.46
Flavonoids	
Amenthoflavone	29.33 \pm 0.82
Unknown flavonoids	92.76 \pm 0.75
Total	122.09 \pm 1.07

Table 1

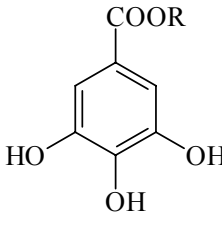
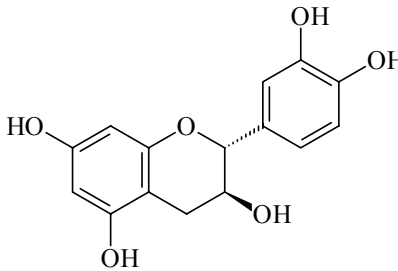
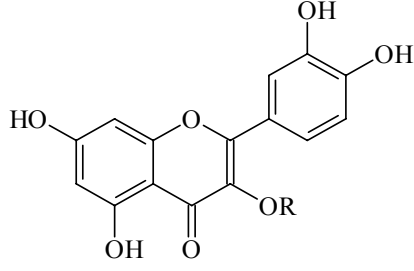
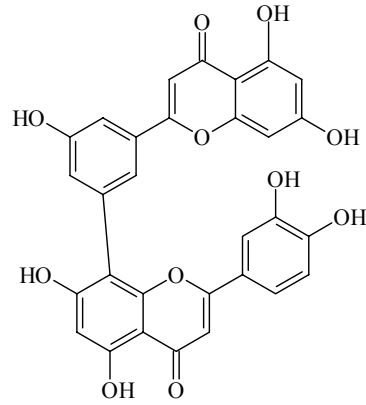
			
	R	<u>3</u>	
<u>1</u>	H		
<u>2</u>	CH ₃		
			
	R	<u>7</u>	
<u>4</u>	O-allo		
<u>5</u>	O-gal		
<u>6</u>	O-glc (1→6) rha		

Figure 1

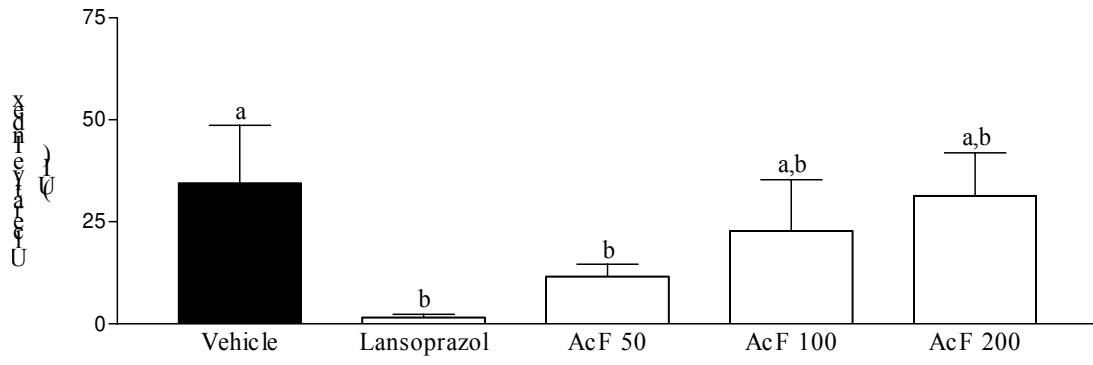


Figure 2

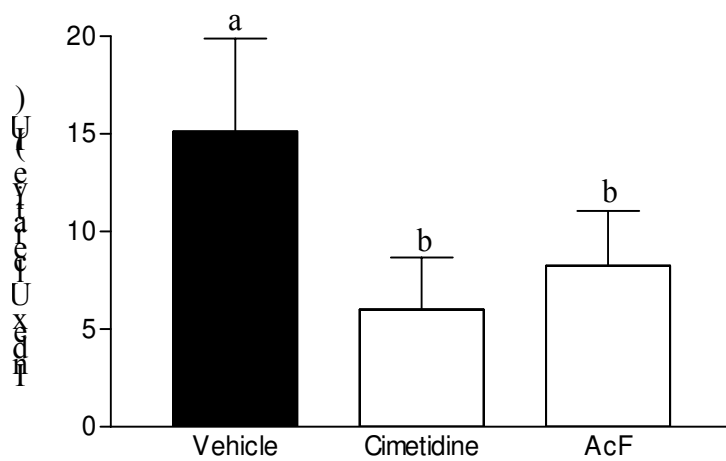


Figure 3

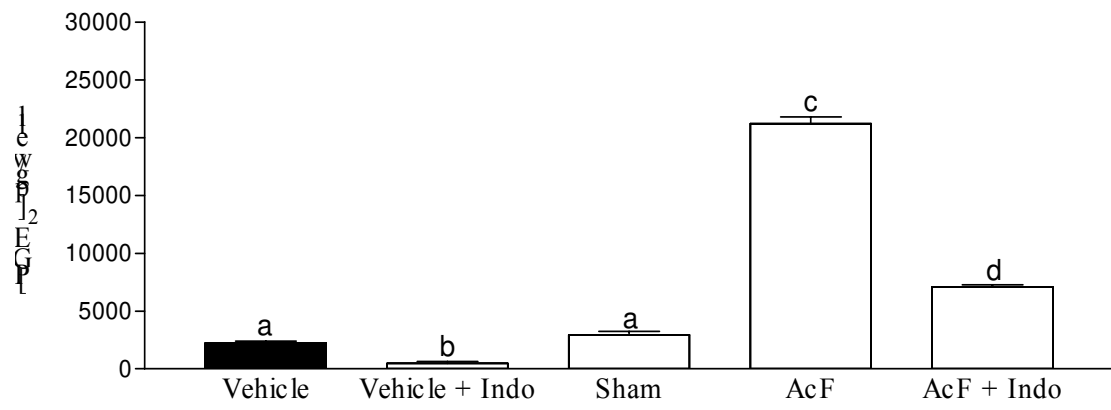


Figure 4

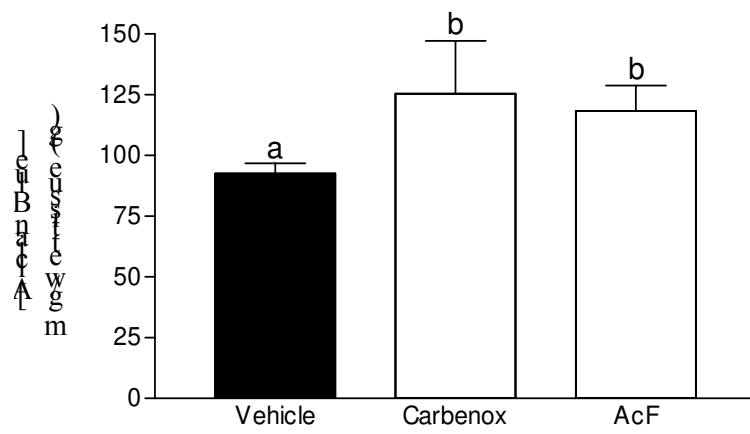


Figure 5

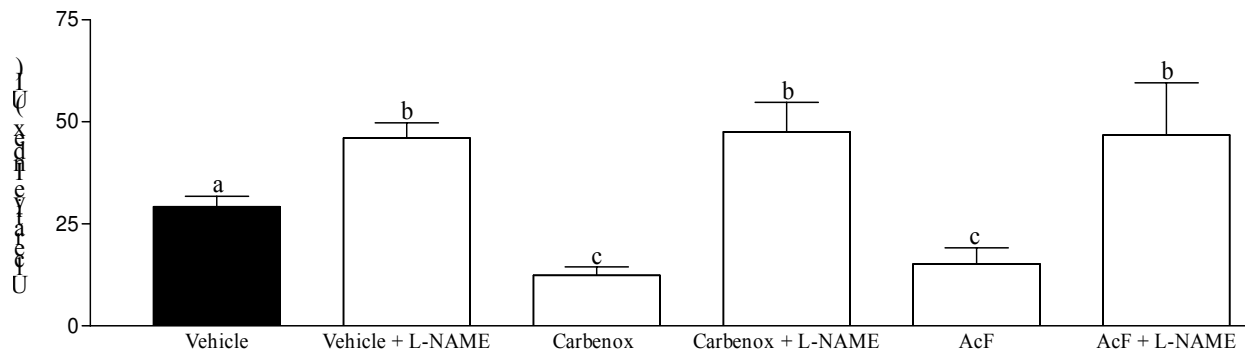


Figure 6

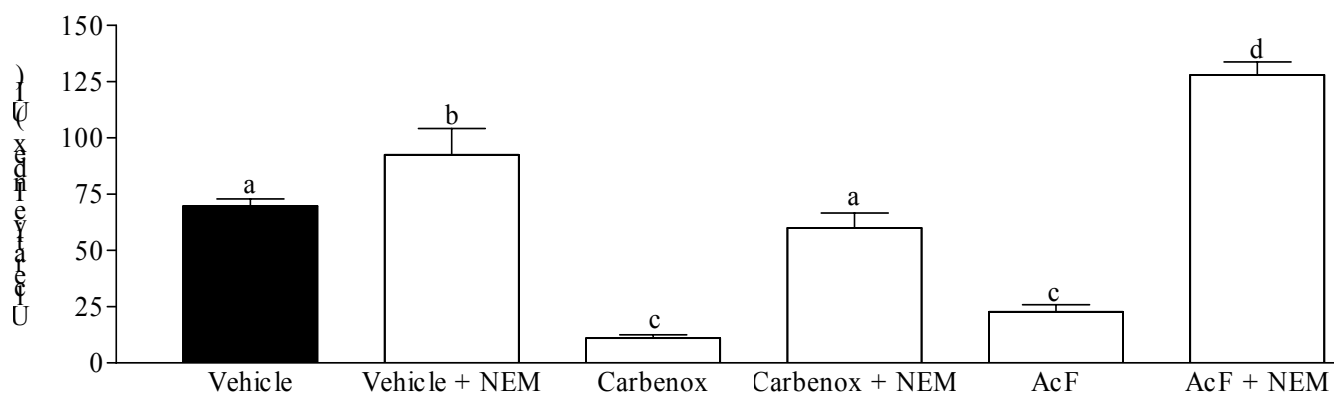


Figure 7

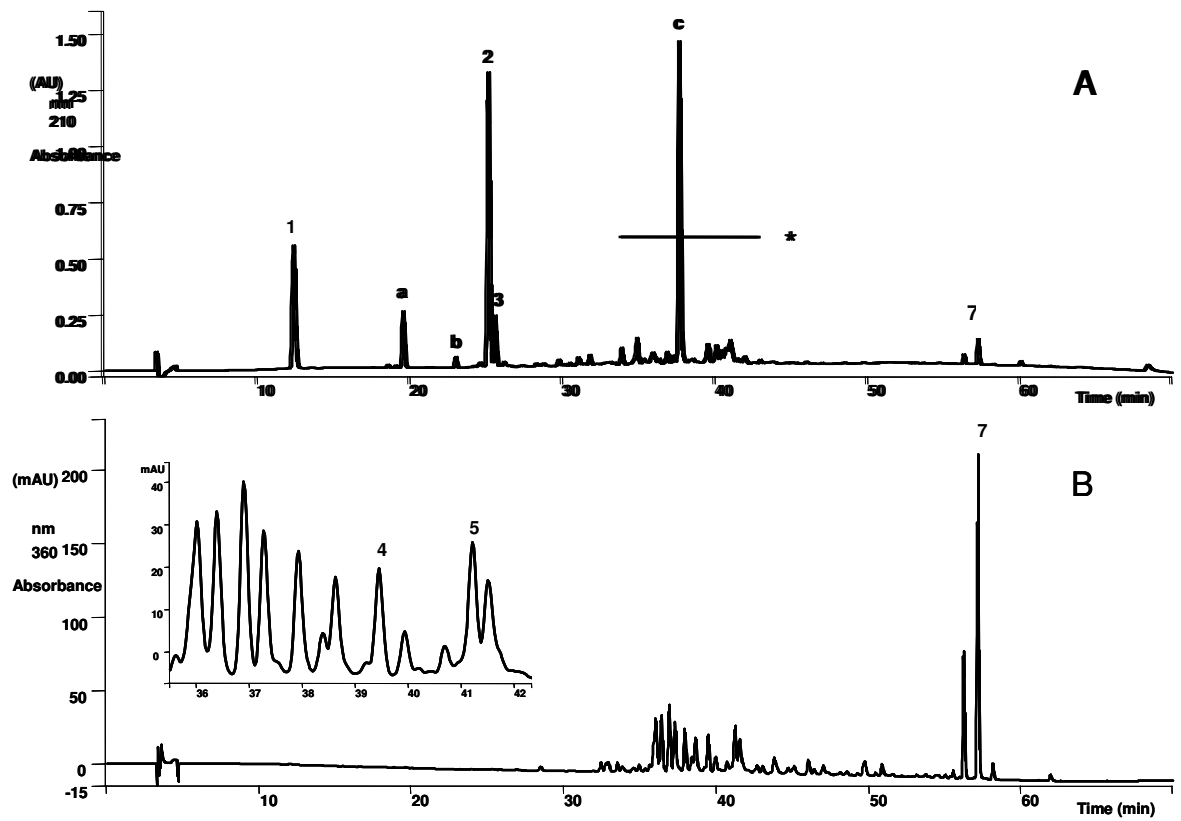


Figure 8a (above) and 8b (bellow)