

MÁRCIA APARECIDA ANTÔNIO

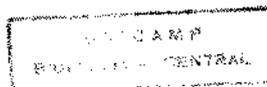
**AÇÕES FARMACOLÓGICAS GERAIS DA
Turnera ulmifolia L. SOBRE A
RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora
Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

11/11/96

CAMPINAS - 1996



| | |
|----------|---------------------|
| UNIDADE | BC |
| FARMADA: | UNICAMP |
| | An 88 a |
| V. | |
| T. | 27.865 |
| | 667.196 |
| | |
| | 48.11,00 |
| | 03.107.196 |
| N.º | 080 C.M.000892.19-6 |

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

An 88 a Antônio, Márcia Aparecida
Ações farmacológicas gerais da *Turnera ulmifolia* L. sobre a resposta inflamatória. / Márcia Aparecida Antônio. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito
Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Turnera ulmifolia*. 2. Antinflamatórios. 3. Plantas medicinais.
I. Alba Regina Monteiro Souza Brito. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

MÁRCIA APARECIDA ANTÔNIO

AÇÕES FARMACOLÓGICAS GERAIS DA
Turnera ulmifolia L. **SOBRE A**
RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Márcia Aparecida Antônio.

Campinas, 29 de abril de 1996


Prof. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito
- Orientadora -

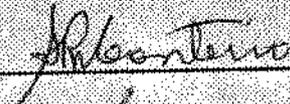
CAMPINAS - 1996

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:

1. Profa. Dra. Alba Regina M. Souza Brito 

2. Profa. Dra. Elfriedi Mariani Bacchi 

3. Prof. Dr. Edison Antunes 

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/04/96

Em verdade, o que proporciona o máximo de prazer, não é o conhecimento e sim a aprendizagem; não é a posse, mas a aquisição; não é presença, mas o ato de atingir a meta.

Carl Fridrich Gauss

A Deus,
por conceder-me a vida e permitir
a realização deste trabalho.

Aos meus pais,
pelo amor e carinho sempre constantes e
confiança que sempre depositaram em mim.

Ao Sidemar,
pelo seu amor e apoio, incentivando-me a prosseguir
a jornada, quais fossem os obstáculos, dedico este trabalho.

À Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação e, sobretudo, pelo constante incentivo, dedicação e confiança demonstrados durante o desenvolvimento desta dissertação.
Por tudo, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Wilton Viana, pelas informações etnofarmacológicas e fornecimento da espécie vegetal estudada.

Ao Prof. Dr. Paulo Araújo, pela acolhida no Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia, assim como pelas valiosas sugestões no decorrer deste trabalho.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP por proporcionar condições ao pleno desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, coordenador da Área de Ensaios Biológicos, pela cooperação na execução desta dissertação e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Rui Rogero Bosshard, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho fitoquímico realizado.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, que direta ou indiretamente contribuíram para a obtenção deste título.

Às funcionárias do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, Solange A. S. Basso e Gislaine E. Alípio, pela colaboração e dedicação a todos nós, alunos deste departamento.

À amiga Maria Susana C. A. da Cunha, bioterista do CPQBA, pelo carinho e amizade demonstrados no decorrer desses anos, assim como pelo imprescindível apoio técnico.

À amiga Patrícia C. Dias, contemporânea no curso de pós-graduação, pelo auxílio nos testes farmacológicos e pelo incentivo e apoio sempre constantes.

À Mirtes Costa, pela colaboração na execução da análise estatística dos dados.

Ao Alexandre Dias Carvalho, pelo apoio funcional que prestou durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas, Ana Possenti, Cláudia Picoli, Débora Fachim Nogueira, Luciana K. Kohn, Mary Ann Foglio e Paulo E. Pizão, pela convivência agradável do dia-a-dia.

A todos aqueles que, à sua maneira, colaboraram no desenvolvimento deste trabalho, gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| Lista das Tabelas | x |
| Lista das Figuras | xi |
| Resumo | xii |
| | |
| I. Introdução | 01 |
| 1. Considerações Gerais | 01 |
| 2. Objetivos | 09 |
| | |
| II. Material e Métodos | 10 |
| A. Animais | 10 |
| B. Material Vegetal | 10 |
| C. Protocolos Experimentais | 11 |
| 1. Modelos de Toxicidade | 11 |
| 1.1. Determinação da Dose Letal 50% - DL ₅₀ | 11 |
| 1.2. Teste de Viabilidade Celular | 11 |
| 2. Modelos de Inflamação | 12 |
| 2.1. Edema de Pata Induzido por Carragenina | 12 |
| a) Monitoramento da Resposta Inflamatória | 13 |
| b) Decurso Temporal da Resposta Antiinflamatória | 14 |
| c) Curva Dose-Efeito e Determinação da DE ₅₀ | 14 |
| 2.2. Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton | 15 |
| 2.3. Granuloma <i>Cotton Pellet</i> | 16 |
| 2.4. Permeabilidade Vascular | 17 |
| 2.5. Estudo do Exsudato Peritoneal e Sangue Periférico | 18 |

| | |
|---|----|
| 3. Modelo de Potência Antiinflamatória x Atividade Ulcerogênica | 19 |
| 4. Modelos de Úlcera Gástrica | 20 |
| 4.1. Indometacina | 20 |
| 4.2. Etanol | 21 |
| 4.3. Estresse por Imobilização e Frio | 21 |
| 4.4. Ligadura do Píloro | 22 |
| 4.5. Determinação do Muco da Barreira Gastroprotetora | 23 |
| 5. Modelo de Algesia por Ácido Acético | 24 |
| 6. Análise Estatística | 25 |
| | |
| III. Resultados | 26 |
| 1. Modelos de Toxicidade | 26 |
| 1.1. Determinação da Dose Letal 50% - DL ₅₀ | 26 |
| 1.1.1. Via oral | 26 |
| 1.1.2. Via Intraperitoneal | 27 |
| 1.2. Teste de Viabilidade Celular | 27 |
| 2. Modelos de Inflamação | 30 |
| 2.1. Edema de Pata Induzido por Carragenina | 30 |
| a) Monitoramento da Resposta Antiinflamatória | 30 |
| b) Decurso Temporal da Resposta Inflamatória | 30 |
| c) Curva Dose-Efeito e Determinação da DE ₅₀ | 33 |
| 2.2. Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton | 33 |
| 2.3. Granuloma <i>Cotton Pellet</i> | 36 |
| 2.4. Permeabilidade Vascular | 36 |
| 2.5. Estudo do Exsudato Peritoneal e Sangue Periférico | 39 |

| | |
|---|----|
| 3. Modelo de Potência Antiinflamatória x Atividade Ulcerogênica | 45 |
| 4. Modelos de Úlcera Gástrica | 47 |
| 4.1. Indometacina | 47 |
| 4.2. Etanol | 49 |
| 4.3. Estresse por Imobilização e Frio | 51 |
| 4.4. Ligadura do Píloro | 53 |
| 4.5. Determinação do Muco da Barreira Gastroprotetora | 58 |
| 5. Modelo de Algesia por Ácido Acético | 59 |
| | |
| IV. Discussão | 60 |
| V. Conclusões | 69 |
| | |
| VI. Apêndice | 70 |
| 1. Coleta da Amostra Vegetal | 70 |
| 2. Monitoramento da Atividade Farmacológica | 71 |
| 3. Preparação dos Extratos Brutos | 71 |
| 4. Fracionamento dos Extratos Brutos | 75 |
| 5. Isolamento do(s) Princípio(s) Ativo(s) | 79 |
| | |
| VII. Referências Bibliográficas | 81 |
| VIII. Summary | |

Lista das Tabelas

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 01. | Efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e da dexametasona no edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. | 33 |
| Tabela 02. | Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EHB) de <i>Turnera ulmifolia</i> e do diclofenaco sódico sobre as fases transudativa e proliferativa do ensaio de granuloma <i>cotton pellet</i> em ratos. | 37 |
| Tabela 03. | Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EHB) de <i>Turnera ulmifolia</i> e diclofenaco sódico no aumento da permeabilidade vascular induzida por diferentes mediadores: bradicinina, histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) e prostaglandina E ₂ (PGE ₂) em ratos. | 38 |
| Tabela 04. | Efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e do lipopolissacarídeo (LPS) sobre a contagem diferencial de células do sangue periférico. | 42 |
| Tabela 05. | Efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e do lipopolissacarídeo (LPS) sobre a contagem diferencial de células do exsudato peritoneal. | 44 |
| Tabela 06. | Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) de <i>Turnera ulmifolia</i> na mucosa gástrica de ratos. | 46 |
| Tabela 07. | Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e da cimetidina na úlcera induzida por indometacina em ratos. | 48 |
| Tabela 08. | Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e do omeprazol na úlcera induzida por etanol em ratos. | 50 |
| Tabela 09. | Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e do omeprazol na úlcera induzida por estresse por imobilização e frio em ratos. | 52 |
| Tabela 10. | Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e da cimetidina na úlcera induzida por ligadura do piloro em ratos. | 53 |
| Tabela 11. | Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e da cimetidina sobre o pH, volume e concentração de ácido total estomacal na úlcera induzida por ligadura do piloro ratos. | 54 |
| Tabela 12. | Efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e de carbenoxolona sobre a formação do muco da barreira gastroprotetora em ratos submetidos a estresse por imobilização e frio. | 58 |
| Tabela 13. | Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de <i>Turnera ulmifolia</i> e da dipirona magnésiana no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. | 59 |

Lista das Figuras

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 01. | Exemplar de <i>Turnera ulmifolia</i> . | 06 |
| Figura 02. | Determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀) de EHB de <i>Turnera ulmifolia</i> administrado por via intraperitoneal . | 28 |
| Figura 03. | Determinação da Concentração Inibitória 50% (CI ₅₀) de Fr.EtOH de <i>Turnera ulmifolia</i> . | 29 |
| Figura 04. | Efeito de EHB de <i>Turnera ulmifolia</i> , administrado oralmente, sobre o decurso temporal da resposta inflamatória no edema de pata de rato por carragenina. | 31 |
| Figura 05. | Efeito de Fr.EtOH de <i>Turnera ulmifolia</i> , administrado oralmente, sobre o decurso temporal da resposta inflamatória no edema de pata de rato por carragenina. | 32 |
| Figura 06. | Curva dose-efeito de EHB de <i>Turnera ulmifolia</i> , administrado oralmente, no edema de pata de rato por carragenina. | 34 |
| Figura 07. | Curva dose-efeito de Fr.EtOH de <i>Turnera ulmifolia</i> , administrada oralmente, no edema de pata de rato por carragenina. | 35 |
| Figura 08. | Efeito de Fr.EtOH de <i>Turnera ulmifolia</i> , administrada intraperitonealmente, sobre a contagem total de eritrócitos e leucócitos do sangue periférico. | 41 |
| Figura 09. | Efeito de Fr.EtOH de <i>Turnera ulmifolia</i> , administrada intraperitonealmente, sobre a contagem total de leucócitos do exsudato peritoneal. | 43 |
| Figura 10. | Potência relativa de EHB de <i>Turnera ulmifolia</i> , administrado oralmente, em diferentes modelos de úlcera gástrica em ratos. | 56 |
| Figura 11. | Potência relativa de Fr.EtOH de <i>Turnera ulmifolia</i> , administrada oralmente, em diferentes modelos de úlcera gástrica em ratos | 57 |

RESUMO

Resumo

A *Turnera ulmifolia* L. pertence à família Turneraceae e é popularmente conhecida como chanana. É um subarbusto de flores amareladas, comum no nordeste do Brasil. Devido ao seu uso popular em distúrbios inflamatórios, foram estudadas as propriedades antiinflamatórias do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) e de sua fração ativa (Fr.EtOH) em modelos de inflamação, com o objetivo de fornecer subsídios para seu uso tradicional. Em ensaios de toxicidade aguda, verificou-se que EHB não foi tóxico aos animais quando administrado pelas vias oral ($DL_{50} > 15$ g/kg) e intraperitoneal ($DL_{50} = 7.8$ g/kg), demonstrando ser praticamente inócuo. EHB (1g/kg, po) e Fr.EtOH (100 mg/kg, po) mostraram efeito antiedematogênico dose-dependente em ensaios de edema de pata induzido por carragenina. As respostas máximas de ambos ocorreram 3 horas após o tratamento com o agente flogístico, com porcentagens de inibição de 30%. A DE_{50} de Fr.EtOH foi de 150 mg/kg. EHB (1g/kg, po) reduziu o aumento de permeabilidade vascular induzido por PGE_2

(34%), histamina (54%) e 5-hidroxitriptamina (79%), mas não aquele aumento induzido por bradicinina, enquanto que o diclofenaco sódico (5 mg/kg, po) diminuiu a permeabilidade vascular induzida por todos estes mediadores, com porcentagens de inibição de 46, 63, 88 e 61%, respectivamente. No teste de granuloma *cotton pellet*, EHB (1 g/kg, po) e diclofenaco sódico (5 mg/kg, po) mostraram ser equivalentes em inibir a fase transudativa do granuloma (57 e 54%, respectivamente), mas somente o diclofenaco sódico inibiu a fase proliferativa (64%). Foi avaliada a influência de Fr.EtOH (5 mg/kg, ip) sobre os parâmetros hematológicos do sangue periférico e do exsudato peritoneal. Nenhuma alteração relativa aos perfis numéricos totais eritrocitário e leucocitário do sangue periférico foi evidenciada; entretanto, na contagem diferencial dos leucócitos foi detectado um aumento do número de basófilos (80%). A análise dos dados obtidos no estudo do exsudato peritoneal demonstrou que Fr.EtOH (5 mg/kg, ip) inibiu, de modo dose-dependente, a migração de leucócitos para o peritônio. Esta diminuição ocorreu principalmente devido a uma redução no número de linfócitos (78%) e neutrófilos (57%) que migraram para a cavidade peritoneal. Por outro lado, em estudo de potência antiinflamatória versus atividade ulcerogênica, EHB (1g/kg, po) não potencializou as lesões gástricas induzidas pelo ácido acetilsalicílico, pelo contrário, produziu uma redução de 67% do índice de lesões ulcerativas (ILU). EHB (1 g/kg, po) e Fr.EtOH (100 mg/kg, po) reduziram as lesões gástricas induzidas por ligadura do piloro, inibindo o ILU em 79 e 82%, respectivamente; etanol (1 ml/animal, po) inibindo o ILU em 60 e 55%, respectivamente; assim como aquelas induzidas por indometacina (30 mg/kg, sc) inibindo o ILU em 51 e 57%, respectivamente; entretanto, ambos não foram capazes de produzir inibição sobre as lesões gástricas produzidas por estresse. A Fr.EtOH (100 mg/kg, po) produziu um aumento (38%) da

formação de muco da barreira gastroprotetora; já a carbenoxolona (200 mg/kg, po) também aumentou o muco em cerca de 42%. Adicionalmente, Fr.EtOH (100 mg/kg, po) não produziu inibição do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0.6%, ip), enquanto que a dipirona magnésiana (200 mg/kg, po) foi capaz de reduzir cerca de 90% dessas contorções. Assim, nos modelos de inflamação utilizados, EHB e Fr.EtOH apresentaram marcada atividade antiinflamatória, não acompanhada de danos gástricos; ao contrário, ambos apresentaram ações antiulcerogênicas em vários modelos experimentais de úlcera gástrica. Deste modo, foi possível confirmar, ainda que preliminarmente, as informações populares do uso em inflamação da espécie vegetal *Turnera ulmifolia*.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

Capítulo I

Introdução

1. Considerações Gerais

A inflamação pode ser caracterizada como um processo protetor em muitas patologias; entretanto, em seu decurso, podem ocorrer efeitos deletérios para o organismo.

Ao menos em parte, a regulação da resposta inflamatória é feita via liberação de diferentes mediadores endógenos solúveis como histamina (Falus & Merétey, 1992), prostaglandinas e leucotrienos (Cotran et al., 1989), entre outros.

O exsudato inflamatório, que aparece com o aumento da permeabilidade vascular, desempenha um importante papel no processo inflamatório. Água, sais minerais e proteínas plasmáticas formam o componente fluido do exsudato; o infiltrado de leucócitos, que migra para o local da injúria, constitui o componente celular. Durante a resposta inflamatória mais intensa, os leucócitos polimorfonucleares podem constituir-se na maior parte do infiltrado celular

(Popper & Watnick, 1974). No estágio tardio da inflamação aguda e na crônica, predominam os leucócitos mononucleares (Di Rosa et al., 1971; Brown & Collins, 1978).

O exsudato inflamatório líquido contém vários mediadores que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos. Estes incluem os componentes das cascatas enzimáticas dos sistemas complemento, fibrinolítico e da coagulação. A ativação da cascata do sistema complemento pode gerar componentes que promovem a liberação de mediadores inflamatórios de mastócitos (Coltren, 1992) e/ou fatores quimiotáticos para leucócitos (Nossal, 1987). A ativação dos sistemas da coagulação e fibrinolítico promovem liberação de trombina e fibrina, respectivamente, envolvendo três fenômenos principais: contração vascular, adesão e ativação de plaquetas. A conjunção destes fenômenos resulta na interrupção da perda sanguínea, com formação de um tampão hemostático que bloqueia a saída de sangue (Nemerson, 1988).

O modo pelo qual os leucócitos, incluindo linfócitos, monócitos e neutrófilos, migram da circulação para os sítios de inflamação aguda e crônica, com alta especificidade e sem afetar os tecidos não lesados, parece estar relacionado à aderência de populações específicas destas células ao endotélio vascular, a qual é mediada por glicoproteínas ou lecitinas para adesão celular, as LEC/CAMs. Estas moléculas coordenam a cascata celular de ativação, adesão e migração de leucócitos (Lasky, 1991). A resposta inflamatória resultante pode, então, aparecer através de uma variedade de alterações funcionais e estruturais do endotélio (Cotran & Pober, 1990; Hogg, 1992; Mantovani & Dejana, 1989).

Outras substâncias como as citocinas têm sido caracterizadas também como potentes mediadores das respostas inflamatória e imunológica, as quais podem ser produzidas por uma grande variedade de tipos celulares (Chatenoud & Bach, 1990). O papel de uma série de citocinas como as interleucinas (IL) e os

fatores ativador da quimiotaxia de monócitos, estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, ativador de neutrófilos e de necrose tumoral (TNF), na coordenação das interações celulares que ocorrem na inflamação tem sido descrito. Estas citocinas seriam responsáveis por ambos, regulação da migração celular para os sítios alvo e para produção de efetores, que resultam nos sinais clássicos da inflamação (Dinarello, 1991; Jastela, 1991).

A lipocortina é outra substância de interesse no processo inflamatório (Goulding & Guyre, 1992). Ela é um importante mediador da ação dos glicocorticóides cuja ação principal consiste na inibição dos efeitos da IL-1 liberada de macrófagos e da IL-2 liberada do linfócito T ativado (Perretti & Flower, 1993).

Em adição, respostas celulares inflamatórias envolvem a formação e acumulação de mediadores bioativos, sendo o fator de ativação plaquetária (PAF) um dos mais potentes. Um excesso deste mediador tem sido implicado numa variedade de patologias que vão desde a isquemia por reperfusão até a necrose enterocolítica da asma (Bazan, 1995). O PAF é produzido e liberado pela maioria das células inflamatórias quando estas são estimuladas, como por exemplo neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e basófilos e por plaquetas (Braquet et al., 1987). Dentre as ações farmacológicas do PAF destacam-se vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, indução de hiperalgesia e agregação plaquetária. O PAF é tido também como um potente agente quimiotático para eosinófilos durante a reação brônquica da fase tardia da asma. Ele estimula ainda a ativação da fosfolipase A₂ com consequente produção de eicosanóides (Morley et al., 1989).

Mais recentemente, demonstrou-se que o óxido nítrico (NO) possui importante papel em muitas funções biológicas. Essa substância é gerada a partir do aminoácido l-arginina por uma enzima denominada óxido nítrico

sintetase (iNO), enzima esta ativada por vários estímulos imunológicos que levam à produção de grandes quantidades de NO que possui atividade citotóxica. Em estudos com camundongos mutantes, os quais não são capazes de produzir a enzima iNO, demonstrou-se uma redução não específica da resposta inflamatória à carragenina e também uma resistência à mortalidade induzida por lipopolissacarídeo, evidenciando um envolvimento do NO nas respostas imunológica e inflamatória (Wel et al., 1995).

Assim, várias informações novas surgiram e o processo inflamatório passou a apresentar diferentes elementos com os quais as substâncias antiinflamatórias podem interagir.

Plantas medicinais tem sido implicadas como importantes fontes de novas drogas e apresentam-se praticamente intocadas neste sentido. No Brasil existem cerca de 120 mil espécies vegetais das quais acredita-se que 20% sejam medicinais. Destas, apenas cerca de 3 mil espécies foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e/ou farmacológico (Barata, 1991; Souza Brito & Souza Brito, 1993).

A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população utilize plantas para o tratamento de doenças primárias (WHO, 1993). A investigação de plantas medicinais utilizadas popularmente resultou em alguns avanços terapêuticos, como por exemplo a introdução do primeiro tranquilizante, a reserpina, obtida da planta *Rauwolfia serpentina*, usada na Índia para tratamento de insanidade mental, a pilocarpina extraída da planta brasileira *Pilocarpus jaborandi* e a aspirina, um antiinflamatório extraído da casca do salgueiro, a *Salix alba*. Novas substâncias químicas obtidas de plantas medicinais com uso tradicional continuam a ser descobertas, como por exemplo, aquelas extraídas da planta *Allium sativum*, que apresentam efeitos cardiovasculares benéficos (Warshafsky et al., 1993).

Existe eficácia clínica comprovada para muitos produtos extraídos de plantas medicinais. Alguns exemplos são a vincristina e a vinblastina, agentes antitumorais derivados da *Catharanthus roseus*, o atracurium, uma substância relaxante muscular obtida do *Chondrodendron tomentosum*, o valpotriato, um agente ansiolítico extraído da *Valeriana officinalis* (Houghton, 1988) e os ginkgolídeos, obtidos a partir de folhas da árvore chinesa *Ginkgo biloba*, agentes antagonistas específicos do PAF, utilizados no tratamento de trombose (Kleijnen & Knipschild, 1992).

O taxol, obtido do *Taxus brevifolia*, é outra droga que foi recentemente incorporada ao arsenal terapêutico do câncer (Cragg et al., 1993). Outros compostos recentes são forskolina, isolada de *Coleus forskolii*, a única substância com propriedade ativadora da enzima adenilciclase que está sendo investigada para o tratamento do glaucoma (Kinghorn & Balandrin, 1993) e a artemisina, uma substância antimalárica, obtida da *Artemisia annua* (Phillipson et al., 1993).

Plantas brasileiras também têm originado substâncias com potencial uso na terapêutica. Alguns exemplos são a artemetina, isolada da *Cordia verbenaceae* (Mazella, 1991), a norcurcubitacina, extraída da *Wilbrandia verticillata* (Teixeira, 1994), ambas com atividade antiinflamatória e a yangambina, obtida da *Ocotea duckei* Vattimo (Pereira, 1995), um antagonista seletivo do PAF.

A *Turnera ulmifolia* L. é uma erva ou subarbusto silvestre encontrada principalmente em terrenos arenosos, frequentemente cultivada em pátios e jardins. Apresenta diversas formas que variam no tamanho e na cor das flores, na forma das folhas e na pubescência. É uma planta arbustiva, erecta, ramificada, de 30 a 90 cm de altura. As folhas são lanceoladas a ovado-oblongas, delgadas, curtamente pecioladas, de 1 a 11 cm de longitude, aserradas, agudas ou acuminadas no ápice e, em sua maioria, estreitas na base glandular. As flores

são axilares, os pedúnculos curtos e as brácteas podem ter a mesma largura ou serem mais largas que o cálice, lanceoladas e serradas. O cálice é 5-lobado, com 6 segmentos lanceolados, agudos ou acuminados. As pétalas são oblongas (1 a 3 cm), inseridas no meio do cálice. Os estambres são quintuplos, as anteras alargadas e erectas. Os ovários são sésseis com estilos duplos, multifidos no ápice. As placentas são triplas com cápsula (6 a 10 mm) (Roig, 1988).

Na família Turneraceae são encontradas espécies e variedades do gênero *Turnera* com importância medicinal. No México e em Cuba, os índios utilizam o extrato aquoso da planta inteira de *T. diffusa* como expectorante, diurético, afrodisíaco e no tratamento de espermatorréia, otites e nefrites (Fryer, 1965; Perez et al., 1984). O decocto de folhas de *T. diffusa* é usado para distúrbios digestivos (Weniger et al., 1986; Ishikura, 1982; Krag, 1976). Na Bolívia, o extrato aquoso das folhas é usado no tratamento da gonorréia (Koch, 1936).



Figura 1 - Exemplar de *Turnera ulmifolia*

O chá de *T. ulmifolia*, preparado utilizando-se a planta inteira, é indicado para mulheres em período de pós-parto e para aquelas que apresentam amenorréia (Ayensu, 1978). Em Cuba, o extrato aquoso à quente das flores é utilizado para o alívio de cólicas menstruais (Roig & Mesa, 1945). Na Jamaica, o extrato aquoso das folhas é utilizado como antipirético (Asprey & Thornton, 1955) e na Colômbia, o decocto de folhas é utilizado como abortivo (Garcia-Barriga, 1975).

Algumas atividades farmacológicas do gênero *Turnera* foram cientificamente comprovadas anteriormente. Os extratos etanólico e aquoso de raízes secas de *Turnera* sp apresentaram atividade hipotensora, sendo que apenas o extrato etanólico demonstrou ação relaxante muscular lisa em duodeno de coelho e estimulante no útero de rata (Vieira et al., 1968).

O extrato diclorometano, obtido a partir de folhas secas de *T. acuta*, apresentou atividade antimutagênica na concentração de 600 µg/placa (Wall et al., 1988), enquanto que o etanólico obtido a partir de raízes secas de *T. blanchetiana* apresentou atividade citotóxica em cultura celular (Nascimento et al., 1990).

O extrato etanólico obtido a partir das folhas de *T. diffusa* mostrou-se citotóxico apresentando uma inibição do crescimento celular em torno de 30% (Nascimento et al., 1990), além de uma atividade estimulante uterina (Barros et al., 1970).

A DL₅₀ em camundongos do extrato metanólico, administrado por via intraperitoneal, de *Turnera ulmifolia* foi de 375 mg/kg (Nakanishi et al., 1965); o extrato etanólico obtido a partir de folhas e caules frescos, mostrou ações espasmogênica, em íleo de cobaio, e vasodilatadora, em ratos, na concentração de 3.3 ml/l (Nakanishi et al., 1965).

Em relação ao estudo fitoquímico realizado com o gênero e/ou espécie envolvido neste trabalho verificou-se que da folhas e caule da *Turnera* sp isolou-se 0.08% de deidaciclina alicíclica (Spencer & Seigler, 1980); 2.4 $\mu\text{mol/g}$ de ciclopentanil glicina (Tober & Conn, 1985); do óleo extraído das sementes detectou-se grandes quantidades de lipídios tais como 1.0% de ácido láurico, 25.5% de ácido linolêico, 5.6% de ácido malvático, 1.0% de ácido mirístico, 13.8% de ácido olêico, 18.4% de ácido palmítico, 2.4% de ácido palmitolêico, 5.6% de ácido esteárico, 4.3% de ácido esterculínico e 22.3% de ácido vernólico (Hosamani, 1993).

Em um estudo fitoquímico da espécie *T. diffusa* detectou-se 0.15 a 0.17% de arbutina benzenoide nas folhas (Tantisewie et al., 1969), 0.16% de flavonoide gonçalitosina, 0.008% do alceno hexacosano-1-ol, 0.0033% do esteróide β -sitosterol e 0.013% do alceno triacontano nas partes aéreas (Dominguez & Hinojosa, 1976); o alceno tricosano-2,1 foi isolado da planta inteira (Fryer, 1965), enquanto que do óleo essencial extraído das folhas isolou-se 11 % do monoterpene cineol-1,8 (Auterhoff & Haeufel, 1968a), 1.8% do monoterpene p-cimeno, 2.0% do monoterpene (-) α -pineno, 1.0% de monoterpene (-) β -pineno (Auterhoff & Haeufel, 1968b).

Foi detectada também a presença de 1.0 a 1.2% do alcalóide cafeína em sementes de *T. ulmifolia*, variedade *angustifolia* (Tarab & Patil, 1979); da variedade *elegans* isolou-se 0.1 a 0.22% do mesmo alcalóide (Freise, 1935).

Não foi encontrado ácido hidrociânico nas folhas de *T. grandidentata*, *T. krapovickasii*, *T. orientalis* e na *T. ulmifolia* variedade *elegans*; já nas variedades *angustifolia* e *velutina* (Shore & Obrist, 1992) e nas sementes desta última o ácido hidrociânico foi detectado (Tober & Conn, 1985).

Deste modo, apesar de estudos químico e farmacológicos terem sido realizados com o gênero e/ou com a espécie utilizada neste trabalho, não há

registros de investigação da atividade antiinflamatória de *Turnera ulmifolia*, apesar de existirem informações populares a este respeito.

2. Objetivos

A pesquisa de plantas medicinais visando obter agentes terapeuticamente úteis estimulou o interesse acadêmico em estudar novas plantas, particularmente aquelas de ampla utilização na medicina tradicional. Considerando esse fato e a grande utilidade das plantas medicinais, o presente trabalho teve como objetivo fornecer subsídios para o uso tradicional da *Turnera ulmifolia* como agente antiinflamatório.

Deste modo, foram estudadas as ações farmacológicas do extrato vegetal bruto e/ou frações obtidas através de processamento fitoquímico, da *Turnera ulmifolia* sobre o processo inflamatório. Estes estudos vão desde o aparecimento dos sinais cardinais até as fases inicial e tardia de migração celular, utilizando-se vários modelos experimentais de inflamação.

CAPÍTULO II
MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo II

Material e Métodos

A. Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($19 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração (Nuvilab[®]) "ad libitum". Foram utilizados camundongos albino *Swiss* e *Balb/C* machos, com peso corporal variando entre 25 a 30 g e ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 120 a 250 g, aclimatados às condições do laboratório por 07 dias, sendo agrupados, ao acaso, em grupos de 10, 7 ou 5 animais, submetidos a jejum de 12, 24 ou 48 horas, dependendo do tipo de experimento.

B. Material Vegetal

Foram utilizados dois tipos de preparação a partir das partes aéreas secas de *Turnera ulmifolia*: extrato hidroalcoólico bruto (EHB) 70% e fração de

polaridade intermediária e/ou etanólica (Fr.EtOH). Os métodos de obtenção de ambos, assim como os resultados do monitoramento farmacológico para a realização do trabalho fitoquímico encontram-se descritos detalhadamente, no capítulo VI relativo ao apêndice.

C. Protocolos Experimentais

1. Modelos de Toxicidade

1.1. Determinação da Dose Letal 50% - DL₅₀

Foram utilizados camundongos albinos Swiss com peso corporal variando entre 25 a 30 g, separados em grupos de 10 animais, aos quais foram administradas doses crescentes da amostra, conforme metodologia descrita por Souza Brito (1994).

Após administração oral ou intraperitoneal das substâncias, os animais dos grupos controle e tratado foram observados diariamente por um período de 14 dias, quanto a alterações de peso corporal, pêlo e mucosas, presença de diarreia e convulsões, estados de depressão e excitação, estereotipia, entre outros. A mortalidade para cada uma das doses foi anotada e, por regressão linear, o valor da DL₅₀ foi determinada (Litchfield & Wilcoxon, 1949).

1.2. Teste de Viabilidade Celular

Foram utilizadas células epidermais de Hamster Chinês da linhagem V 79. Estas células foram mantidas em cultura de monocamada em meio essencial mínimo de Dulbecco com 10% de soro fetal bovino (DMEM/SFB), numa concentração de 20000 células/ml de meio, numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar

a uma temperatura de 37°C, segundo metodologia descrita por Cingi et al. (1991).

A cada um dos 24 compartimentos de uma placa de cultura celular foi adicionado 1 ml de DMEM/SFB contendo as células. As placas foram incubadas por 48 horas em estufa de CO₂ a 37° C. Após este período, o meio foi removido e foi feita a adição de um novo DMEM/SFB com diferentes concentrações de Fr.EtOH (150, 300, 450, 600 e 750 mg/ml de meio). Após 24 horas de incubação foram feitas duas lavagens sucessivas com solução tampão de fosfato e cálcio (PBS-Ca⁺²). Posteriormente, a cultura de célula foi fixada com ácido tricloroacético a 5% por 5 minutos (TCA 5%), após os quais o TCA foi retirado e acrescentado 1 ml de etanol absoluto a 4°C. Após 5 minutos o etanol foi retirado para a secagem dos compartimentos. Após a secagem, foi acrescentado 1 ml de NaOH 0.5 M e a placa foi incubada por 1 hora a 37° C em estufa de CO₂.

Decorrido este período, foi procedida a leitura espectrofotométrica da concentração de ácido desoxiribonucléico (DNA) a 260 nm. O resultado foi expresso em mg/ml de DNA e o gráfico foi traçado com valores da porcentagem do controle. O cálculo da Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) foi feito por regressão linear.

2. Modelos de Inflamação

2.1. Edema de pata induzido por carragenina

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 120 a 180 g, submetidos a jejum de 12 horas antes do início do ensaio, separados em grupos de 10 animais cada, por tratamento.

Com este experimento foram avaliados três parâmetros distintos, ou seja, o monitoramento da resposta antiinflamatória com diferentes preparações

fitoquímicas da planta, o decurso temporal da resposta inflamatória e a determinação da DE₅₀, conforme metodologia descrita por Winter et al. (1962).

a) Monitoramento da Resposta Antiinflamatória

Todos os extratos brutos e as frações obtidas por processamento fitoquímico da *Turnera ulmifolia* foram submetidos a monitoramento farmacológico para a determinação da atividade antiinflamatória em ensaio de edema de pata induzido por carragenina. Assim, os grupos foram tratados oralmente, por gavagem, com diclofenaco sódico na dose de 5 mg/Kg (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo), com os extratos brutos na dose de 1 g/kg e com as frações na dose de 100 mg/kg, 30 minutos antes da injeção subcutânea de 0,05 ml de solução de carragenina a 1% na região subplantar da pata posterior direita e 0.05 ml de solução fisiológica na pata posterior esquerda.

Após 3 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram suas duas patas posteriores amputadas na altura da articulação tibio-társica (Gilligan et al., 1994). Cada uma das patas foi pesada separadamente e a diferença de peso entre elas foi considerada como o edema produzido pela carragenina. Esta diferença de peso foi transformada em porcentagem, através da equação:

% de aumento da pata = $\frac{Ppt - Ppc}{Ppc} \times 100$, onde:

Ppc

Ppt: peso da pata tratada com carragenina

Ppc: peso da pata tratada com solução fisiológica

Já a porcentagem de inibição de edema foi calculada através da equação:

% de inibição do edema = $\frac{Vc - Vt}{Vc} \times 100$, onde:

Vc

Vc - Valor médio de edema do grupo controle

Vt - Valor médio de edema do grupo tratado

b) Decurso Temporal da Resposta Inflamatória

Para avaliação deste parâmetro os grupos foram tratados oralmente, por gavagem, com diclofenaco sódico na dose de 5 mg/Kg (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo), com o extrato hidroalcoólico bruto (EHB) na dose de 1 g/kg e com a fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) na dose de 100 mg/kg, 30 minutos antes da injeção subcutânea de 0,05 ml de solução de carragenina a 1% na região subplantar da pata posterior direita e 0.05 ml de solução fisiológica na pata posterior esquerda. Foram utilizados os grupos acima descritos para cada um dos quatro diferentes tempos de sacrifício.

Após 1, 2, 3 ou 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o procedimento adotado foi o mesmo descrito no item anterior.

c) Curva Dose-Efeito e Determinação da DE₅₀

Foram utilizados vários níveis de dose para a determinação das DE₅₀ de EHB e Fr.EtOH. Assim, os grupos foram tratados oralmente por gavagem com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo), com EHB nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg e com Fr.EtOH nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg, 30 minutos antes da injeção subcutânea de 0,05 ml de solução de carragenina a 1% na região subplantar da pata posterior direita e 0.05 ml de solução fisiológica na pata posterior esquerda.

Após 3 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o restante do experimento foi conduzido como descrito anteriormente.

2.2. Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton

Nestes experimentos foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, com peso corporal variando entre 25 a 30 g, separados em grupos de 8 animais, não submetidos a jejum prévio. Os animais tiveram as superfícies internas e externas de suas orelhas limpas com acetona. Em seguida foram aplicados 20 μ l de uma solução de óleo de cróton a 5% em acetona p.a. na superfície interna da orelha direita; já na orelha esquerda foi aplicado volume equivalente do solvente. Decorridos trinta minutos os animais foram tratados, topicamente, na orelha direita com dexametasona (0.2mg/orelha - controle positivo), com uma solução acetona / água 7:3 (20 μ l/orelha - controle negativo) e com Fr.EtOH (2 mg/orelha). Tanto a dexametasona quanto Fr.EtOH foram dissolvidos em 20 μ l da mesma solução de acetona 70%, sendo que na orelha contralateral foi aplicado apenas esta solução, em conformidade com o método descrito por Schiantarelli (1982).

Após 6 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e porções padronizadas (8 mm) das duas orelhas foram retiradas. Cada uma delas foi pesada separadamente e a diferença de peso foi considerada como o edema produzido pelo óleo de cróton. A diferença de peso entre as porções de orelha foi transformada em porcentagem, através da equação:

% de aumento da porção de orelha = $\frac{P_{pt} - P_{pc}}{P_{pc}} \times 100$, onde:

P_{pc}

P_{pt} - peso da porção da orelha tratada com óleo de cróton

P_{pc} - peso da porção da orelha tratada com acetona

A partir dos pesos individuais foram calculados os valores médios para cada um dos grupos de tratamento e a porcentagem de inibição de edema foi obtida através da equação:

% de inibição do edema = $\frac{V_c - V_t}{V_c} \times 100$, onde:

V_c

V_c - Valor médio da porção de orelha do animal controle

V_t - Valor médio da porção de orelha do animal tratado

2.3. Granuloma Cotton Pellet

Ratos albinos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 a 250 g, foram separados, ao acaso, em grupos de 07 animais, submetidos a jejum de 12 horas antes do início do ensaio, de acordo com a metodologia descrita por Swingle & Shideman (1972). Estes animais foram tratados oralmente, por gavagem, com diclofenaco sódico na dose de 5 mg/Kg (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e com EHB na dose de 1 g/kg. Decorridos trinta minutos, os animais foram anestesiados com éter etílico e submetidos à adrenalectomia. Imediatamente após a cirurgia foi implantado, no dorso do animal, subcutaneamente, um pellet de fio de algodão de aproximadamente 40 mg. Após 3 horas este *pellet* foi retirado e determinado seu peso total, sendo que este valor foi considerado como relativo à fase transudativa da resposta inflamatória.

O restante dos animais só teve o *pellet* retirado 6 dias após a implantação. Durante este período, todos grupos de animais receberam diariamente administrações das substâncias citadas anteriormente. Um dia após o último tratamento, o *pellet* foi retirado e seco a 70°C por 18 horas e, então, determinado

seu peso seco. Deste valor subtraiu-se o peso inicial do *pellet* e o valor obtido foi considerado como relativo à fase proliferativa da resposta inflamatória.

2.4. Permeabilidade Vascular

Foram utilizados ratos albinos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 250 a 300 g, separados em grupos de 7 animais, submetidos a jejum por um período de 12 horas. O dorso dos animais foi depilado 24 horas antes do início do ensaio, de acordo com a metodologia descrita por Spector (1956). Os animais foram tratados oralmente, por gavagem, com diclofenaco sódico na dose de 5 mg/Kg (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e com EHB na dose de 1 g/kg.

Após 30 minutos, os animais foram anestesiados com éter e foram feitos "botões" intradérmicos de bradicinina (1 µg/ml), histamina (25 µg/ml), 5-hidroxitriptamina - 5-HT (250 µg/ml) e prostaglandina E₂ (350 ng/ml). Estas doses foram selecionadas anteriormente a partir dos resultados obtidos do conteúdo de tinta extravasada em curvas dose-resposta. Imediatamente após este procedimento o corante azul de Evans, na concentração de 20 mg/ml, foi administrado por via endovenosa no volume de 1 ml/kg, utilizando-se a veia peniana.

Trinta minutos depois da injeção do corante os animais foram sacrificados e a pele do dorso retirada para que os "botões" fossem uniformemente recortados, com aproximadamente 2 cm de diâmetro. Os tecidos foram cortados em pequenos fragmentos (mínimo de 10) e o corante foi extraído utilizando-se uma mistura 3 : 7 de Na₂SO₄ a 0,5% e acetona, em um volume constante de 10 ml. Vinte e quatro horas após foi feita a leitura da quantidade de corante extravasado utilizando-se um fotolorímetro modelo Beckman DU-70 a 620 nm.

A quantidade de proteínas correspondente, em cada uma das leituras, foi avaliada sobre uma curva padrão de azul de Evans previamente determinada.

2.5. Estudo do Exsudato Peritoneal e Sangue Periférico

Neste ensaio utilizou-se a metodologia descrita por Popper & Watnick (1974). Foram utilizados camundongos albinos Balb/c machos, com peso corporal variando entre 25 a 30 g, separados em grupos de 05 animais, não submetidos a jejum prévio. Os animais foram tratados intraperitonealmente com lipopolissacarídeo (LPS) na dose de 0.4 ng/kg (agente quimiotático), com o veículo utilizado para a dissolução das amostras - tampão solução de fosfato (PBS) - no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e com Fr.EtOH nas doses de 50, 500 e 5000 µg/kg (agente supostamente inibidor da quimiotaxia). Após 72 horas, os animais foram anestesiados com éter e foi feita a punção ocular para a retirada do sangue periférico.

O esfregaço sanguíneo foi feito imediatamente após a punção ocular. Este esfregaço foi corado com Leishman, com tempo de fixação de 5 minutos e tempo de coloração de 15 minutos. A contagem diferencial foi feita posteriormente através de microscópio óptico em objetiva de imersão para 100 células, expressando-se o resultado em células/mm³. Foi também realizada a contagem total dos eritrócitos e leucócitos utilizando-se câmara de Neubauer.

Após a obtenção do esfregaço sanguíneo, ainda sob efeito do anestésico, foi feita uma incisão na pele do abdômem do animal. Nela foi administrado lentamente 5 ml de meio RPMI (meio de inositol, ribose e fosfato) estéril. O local da administração foi imediatamente cauterizado. O abdômem do animal foi massageado por aproximadamente 2 minutos, formando um homogenato de células peritoneais. Imediatamente após este procedimento foi coletada a maior quantidade possível do lavado peritoneal, o qual foi depositado em frascos

imersos em gelo, mantendo assim a viabilidade celular. Foi retirada uma alíquota deste concentrado celular para contagem em câmara de Neubauer com corante vital.

A seguir, o lavado peritoneal foi processado em citocentrífuga a 500 rpm/10 minutos, tendo sido obtido o material a ser empregado na preparação das lâminas para a contagem qualitativa e quantitativa dos leucócitos. As lâminas secas foram posteriormente coradas com Leishman, com tempo de fixação de 3 minutos e tempo de coloração de 8 minutos. Em microscópio óptico foi feita a contagem diferencial dos leucócitos em 100 células, em objetiva de imersão e os resultados foram expressos em número de células/mm³.

3. Modelo de Potência Antiinflamatória x Atividade Ulcerogênica

Foram utilizados ratos albinos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 a 250 g, separados, ao acaso, em grupos de 07 animais, submetidos a jejum de 24 horas antes do início do ensaio, de acordo com a metodologia descrita por Hemmati et al. (1973). Os animais foram tratados oralmente, por gavage, com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e com EHB nas doses de 500, 750 e 1000 mg/kg, uma hora antes da administração oral de 200 mg/kg de aspirina, por gavage.

Após 4 horas da administração da aspirina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. As lesões ulcerativas foram contadas e classificadas, recebendo um "score" como descrito por Szelenyi & Thiemer (1978) de acordo com o grau de severidade expresso pela sua área extensiva (1+, lesões pequenas de até 1 mm de extensão; 2+, lesões médias de 1 a 3 mm de extensão e 3+, lesões grandes e profundas com mais de 3 mm de extensão).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão para cada nível de lesão. Calculou-se também o índice médio de lesões ulcerativas (ILU), conforme metodologia descrita por Basile et al., (1990), usando-se a expressão:

$$ILU = \frac{(3 \times A) + (2 \times B) + (1 \times C)}{n} \text{ onde,}$$

A = nº de úlceras 3+
B = nº de úlceras 2+
C = nº de úlceras 1+

4. Modelos de Úlcera Gástrica Aguda

Foram empregados, nos modelos de úlcera gástrica, diferentes indutores que representam as maiores causas desta patologia gástrica.

4.1. Indometacina

No modelo de úlcera gástrica induzida por antiinflamatório não esteroideal foi seguida a metodologia descrita por Hayden et al. (1978). Foram utilizados ratos albinos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 a 250 g, separados em grupos de 07 animais, mantidos em gaiola especial, sem maravalha, submetidos a jejum de 24 horas antes do início do ensaio. Os animais foram tratados oralmente, por gavagem, com cimetidina na dose de 100 mg/Kg (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e com EHB na dose de 1 g/kg e Fr.EtOH na dose de 100 mg/kg, uma hora antes da administração de 30 mg/kg de indometacina, por via subcutânea, na pele do pescoço.

Após 4 horas da administração da indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. A extensão das lesões e o ILU foram então determinados como descrito acima.

4.2. Etanol

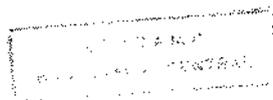
Nestes experimentos empregou-se a metodologia descrita por Morimoto et al. (1991). Foram utilizados ratos albinos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 a 250 g, separados em grupos de 07 animais, mantidos em gaiola especial, sem maravalha, submetidos a jejum de 24 horas antes do início do ensaio. Os animais foram tratados oralmente, por gavagem, com omeprazol na dose de 20 mg/kg (controle positivo), Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e EHB na dose de 1 g/kg e Fr.EtOH na dose de 100 mg/kg, uma hora antes da indução de lesão gástrica pela administração, por via oral, de 1 ml de etanol absoluto.

Após 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados e tiveram os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. Em seguida, a extensão das lesões e o ILU foram determinados como descrito anteriormente.

4.3. Estresse por Imobilização e Frio

Foram utilizados ratos albinos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 a 250 g, separados em grupos de 07 animais, mantidos em gaiola especial, sem maravalha, submetidos a jejum de 48 horas antes do início do ensaio. Os animais foram tratados oralmente, por gavagem, com omeprazol na dose de 20 mg/Kg (controle positivo), com Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e com EHB na dose de 1 g/kg e Fr.EtOH na dose de 100 mg/kg, 18 horas e 30 minutos antes da indução da úlcera gástrica de acordo com a metodologia empregada nos experimentos de Souza-Formigoni et al. (1991).

A seguir, os animais tiveram as patas anteriores e posteriores imobilizadas e foram colocados em contêntores especiais e mantidos na temperatura de 4°C



por 2 horas. Posteriormente, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. A extensão das lesões e o ILU foram então determinados como descrito anteriormente.

4.4. Ligadura do Píloro

Neste ensaio empregou-se a metodologia descrita por Shay et al. (1945). Foram utilizados ratos albinos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 a 250 g, separados em grupos de 07 animais, mantidos em gaiola especial, sem maravalha, submetidos a jejum de 24 horas antes do início do ensaio. Estes animais foram tratados oralmente, por gavagem, com cimetidina na dose de 100 mg/kg (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e com EHB na dose de 1 g/kg.

Trinta minutos após o tratamento, os animais foram submetidos à anestesia com éter etílico, sendo realizada uma tricotomia da região cirúrgica e uma incisão logo abaixo da apófise xifóide do esterno, em sentido longitudinal ao corpo do animal. Após localização do estômago e do píloro, procedeu-se sua ligadura sendo a incisão, então, suturada.

Três horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados com éter etílico e tiveram a incisão reaberta para a retirada do estômago, o qual foi colocado em posição evidente, para a ligadura da cardia. Em seguida, o estômago foi retirado e imerso em solução fisiológica para lavagem externa. Em uma placa de Petri, o estômago foi aberto ao longo da maior curvatura, sendo coletado seu conteúdo com o auxílio de uma seringa. Em seguida, a extensão das lesões e o ILU foram determinados como descrito anteriormente.

Após determinar o volume e o pH da secreção gástrica, a mesma foi colocada em um balão volumétrico, sendo o volume completado para 10 ml com água. Esta solução foi titulada com NaOH 0.05 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração de ácido total em mEq/ml foi calculada utilizando a equação seguinte:

$$\frac{[\text{total de ácido}]}{\text{Volume gástrico (ml)}} = \frac{\text{fator } 1.825 \times \text{Vol. NaOH (ml)}}{\text{Volume gástrico (ml)}}$$

4.5. Determinação do Muco da Barreira Gastroprotetora

Neste ensaio empregou-se o método modificado de Corne et al. (1974). Foram utilizados ratos albinos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 a 250 g, separados em grupos de 07 animais, mantidos em gaiola especial, sem maravalha, submetidos a jejum de 48 horas antes do início do ensaio. Estes animais foram tratados oralmente, por gavagem, com carbenoxolona na dose de 200 mg/kg (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e Fr.EtOH na dose de 100 mg/kg.

Após 30 minutos, os animais foram imobilizados e submetidos à estresse em baixa temperatura como descrito no tópico 4.3. Decorridas 2 horas da indução do estresse, os animais foram sacrificados e tiveram os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. O fundo do estômago foi retirado e a porção glandular, após ligeira lavagem em solução fisiológica, foi imersa em 10 ml de solução de Alcian Blue 0.1% dissolvido em uma solução tampão de sacarose 0.16 mol/l e acetato de sódio 0.05 mol/l a pH 5.8, ajustado com HCl 0.1 mol/l, por um período de 2 horas.

Decorrido este tempo, o excesso de Alcian Blue foi lavado por duas vezes sucessivas com 10 ml de sacarose 0.25 mol/l, por 15 e 45 minutos,

respectivamente. Após a última lavagem, o corante complexado com o muco da parede glandular foi extraído com 10 ml de solução de $MgCl_2$ 0.5 mol/l, com agitação intermitente por um minuto a cada 30 minutos, durante 2 horas.

Em seguida foi feita uma emulsão com toda a solução de $MgCl_2$ obtida no processo de extração e 10 ml de éter etílico, sendo esta emulsão centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos. A fase aquosa, que contém o corante, foi separada para a determinação da concentração de Alcian Blue por leitura espectrofotométrica a 598 nm. Os valores individuais foram extrapolados em uma curva padrão do corante e expressos em μg de Alcian Blue/g de tecido e os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média.

5. Modelo de Algesia por Ácido Acético

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, com peso corporal variando entre 25 a 30 g, separados em grupos de 12 animais, submetidos a jejum por um período de 12 horas. Os animais foram tratados oralmente, por gavagem, com dipirona magnesiana na dose de 200 mg/Kg (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução da amostra - Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/kg (controle negativo), com EHB na dose de 1 g/kg e Fr.EtOH na dose de 100 mg/kg, trinta minutos antes da administração intraperitoneal de ácido acético glacial na concentração de 0.6%. Procedeu-se, então, à contagem do número de contorções apresentadas por animal, no período compreendido entre o 6º e o 20º minuto após a administração do ácido acético, como descrito por Siegmund et al. (1957) e modificado por Koster et al. (1959).

6. Análise Estatística.

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, com nível crítico igual ou menor a 0.05 para rejeição da hipótese de nulidade. Na presença de significância na ANOVA, procedeu-se à análise de contraste entre as médias aplicando-se o teste *a posteriori* de Duncan, com nível crítico igual ou menor a 0.05.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Capítulo III

Resultados

1. Modelos de Toxicidade

1.1. Determinação da Dose Letal 50% - DL₅₀

Os extratos aquoso e hidroalcoólico bruto foram ensaiados no sentido de obter os valores relativos à DL₅₀ pelas vias oral e intraperitoneal, porque ambas as vias seriam utilizadas para administração do extrato em experimentos subsequentes.

1.1.1. Via Oral

Os extratos aquoso e hidroalcoólico bruto de *Turnera ulmifolia* não mostraram sinais de toxicidade quando administrados até 10 g/kg de peso corporal, demonstrando que os mesmos são praticamente inócuos.

1.1.2. Via intraperitoneal

O valor da DL_{50} do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) de *T. ulmifolia* foi de 7.82 g/kg de peso corporal e está demonstrado na figura 2. A morte dos animais ocorreu por insuficiência respiratória. O extrato aquoso não mostrou toxicidade até 10 g/kg, demonstrando ser praticamente inócuo.

1.2. Teste de Viabilidade Celular

A curva dose-efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *T. ulmifolia* demonstrou sinais de citotoxicidade a partir da dose de 300 mg/ml de meio de cultura celular, ou seja, doses bastante elevadas. A CI_{50} determinada para Fr.EtOH foi 465 mg/ml. Estes resultados estão demonstrados na Figura 3.

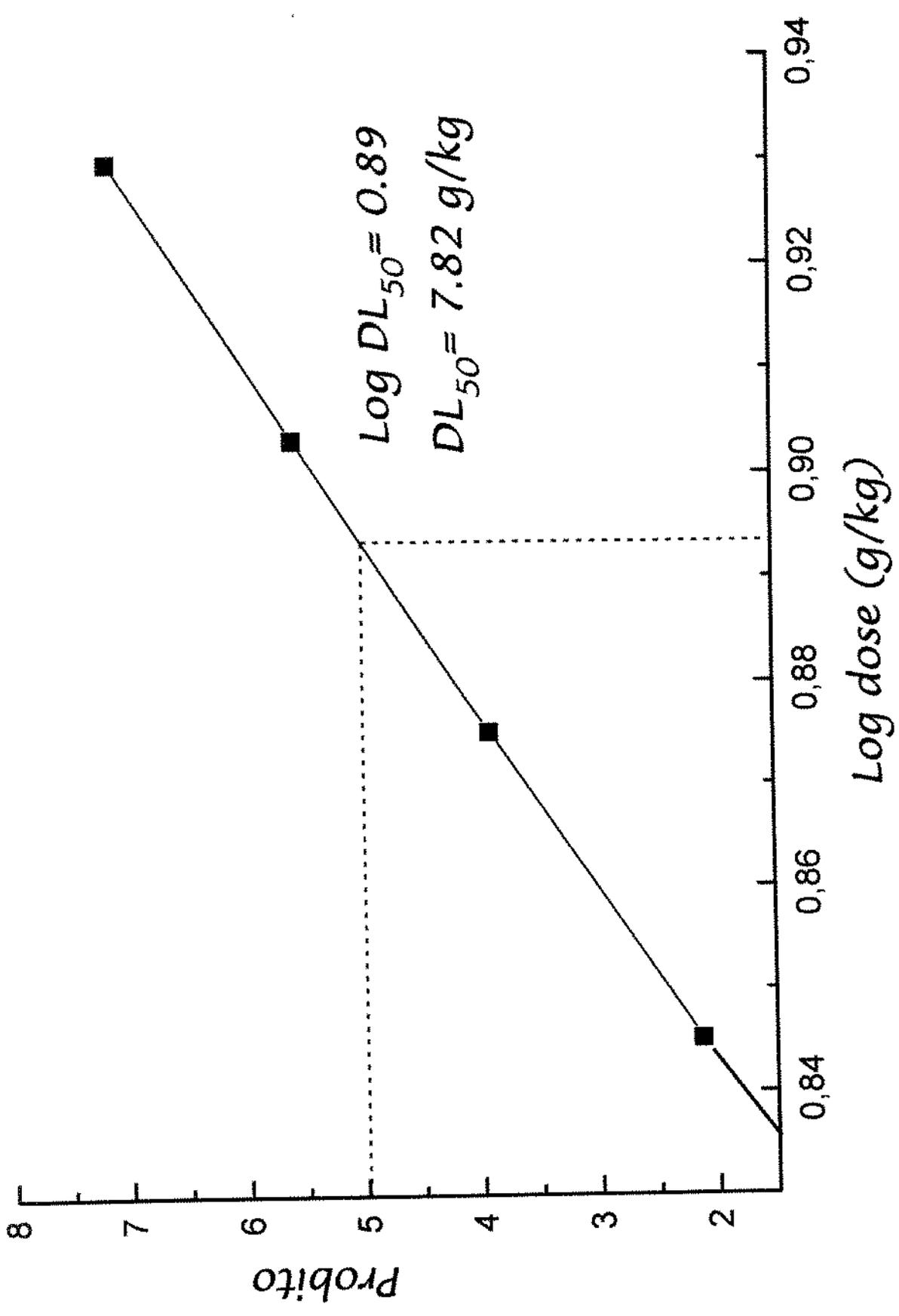


Figura 2 - Determinação da Dose Letal 50% (DL_{50}) de EHB de *Turnera ulmifolia*, administrado por via intraperitoneal.

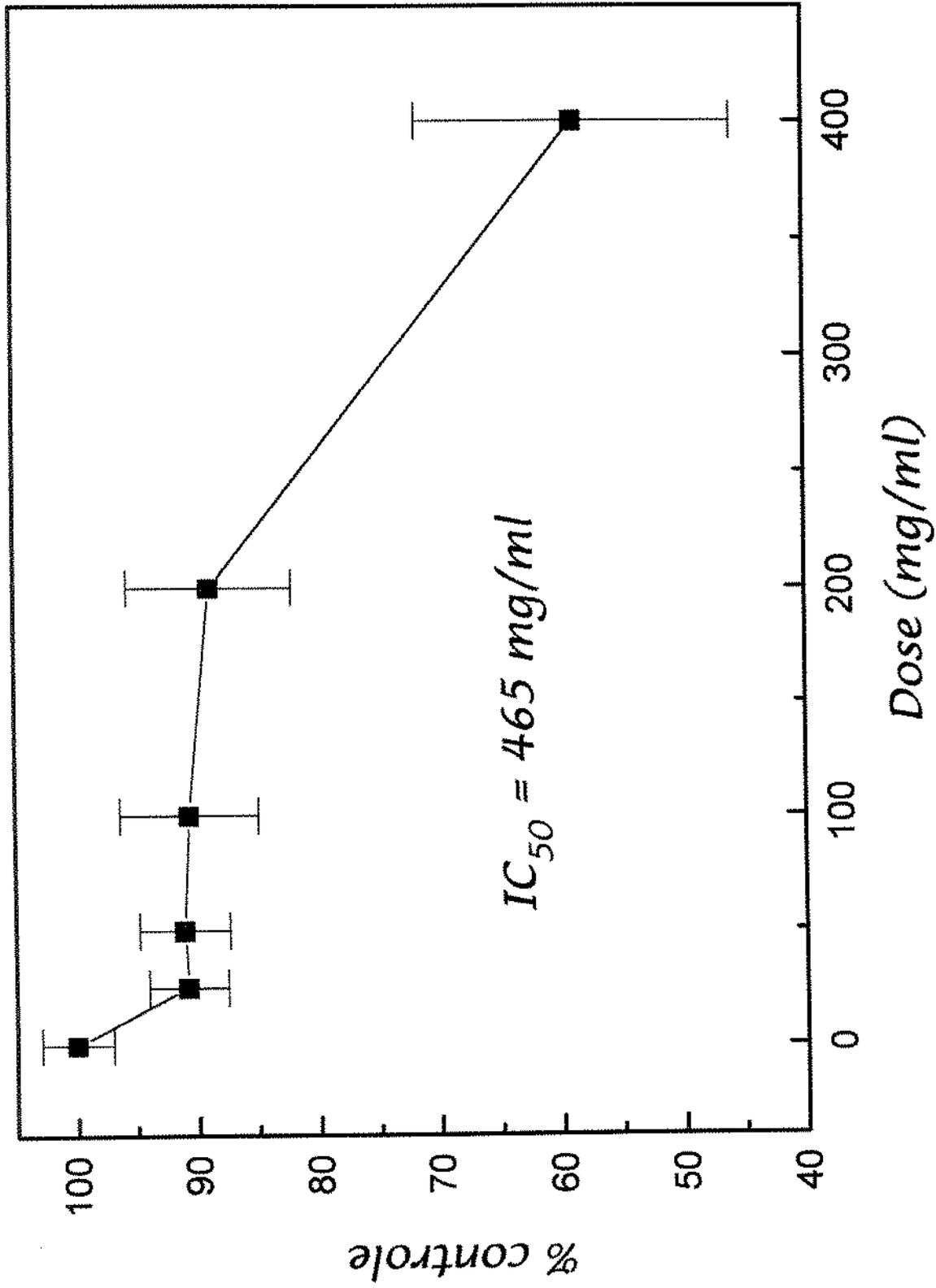


Figura 3 - Determinação da Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) de Fr.EtOH de *Turnera ulmifolia* em cultura de células V-79.

2. Modelos de Inflamação

2.1. Edema de Pata Induzido por Carragenina

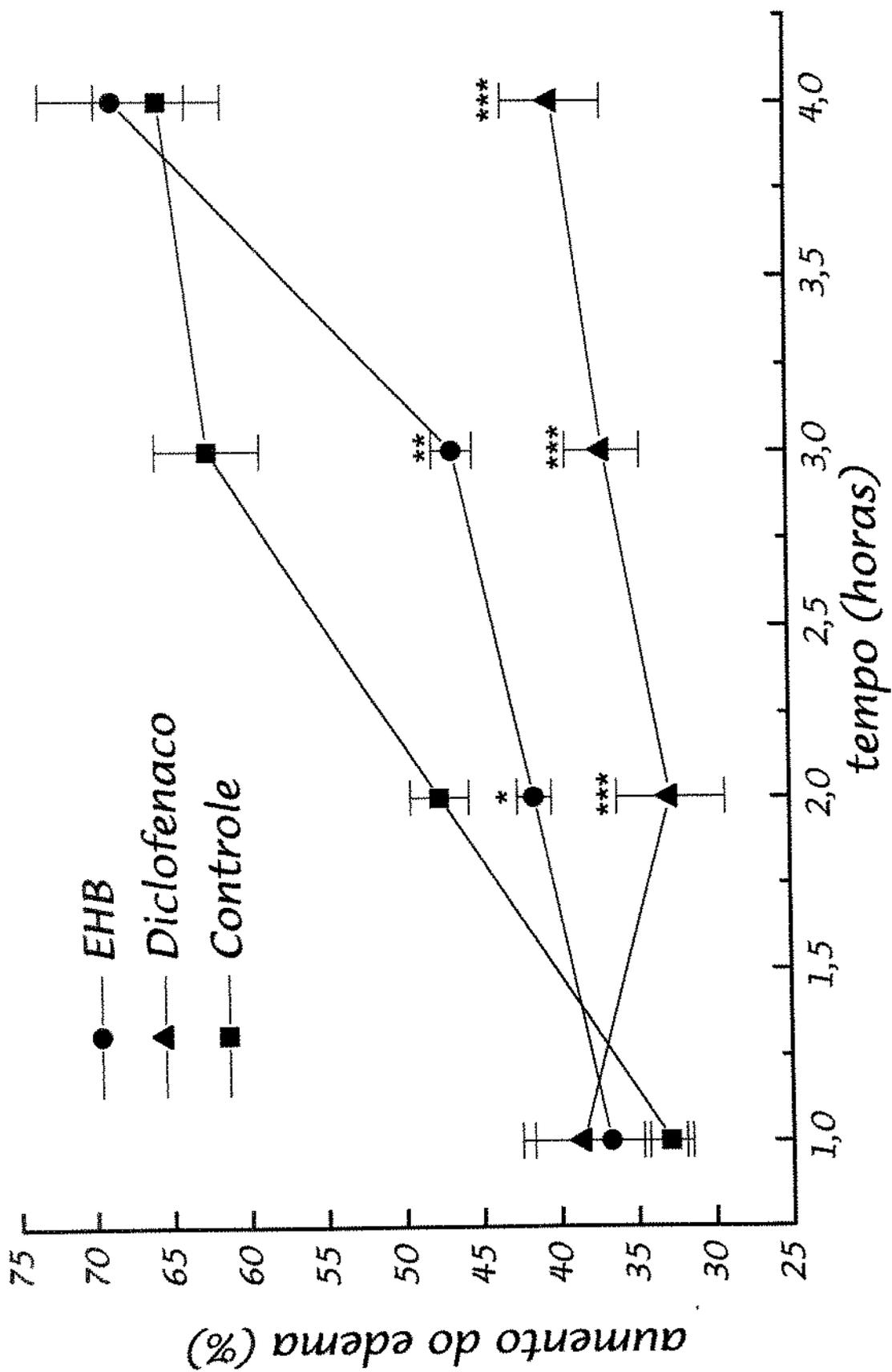
a) Monitoramento da Resposta Antiinflamatória

Todos os resultados obtidos nos experimentos de monitoramento da atividade farmacológica nos vários procedimentos fitoquímicos empregados foram apresentados no capítulo VI relativo ao apêndice.

b) Decurso Temporal da Resposta Inflamatória

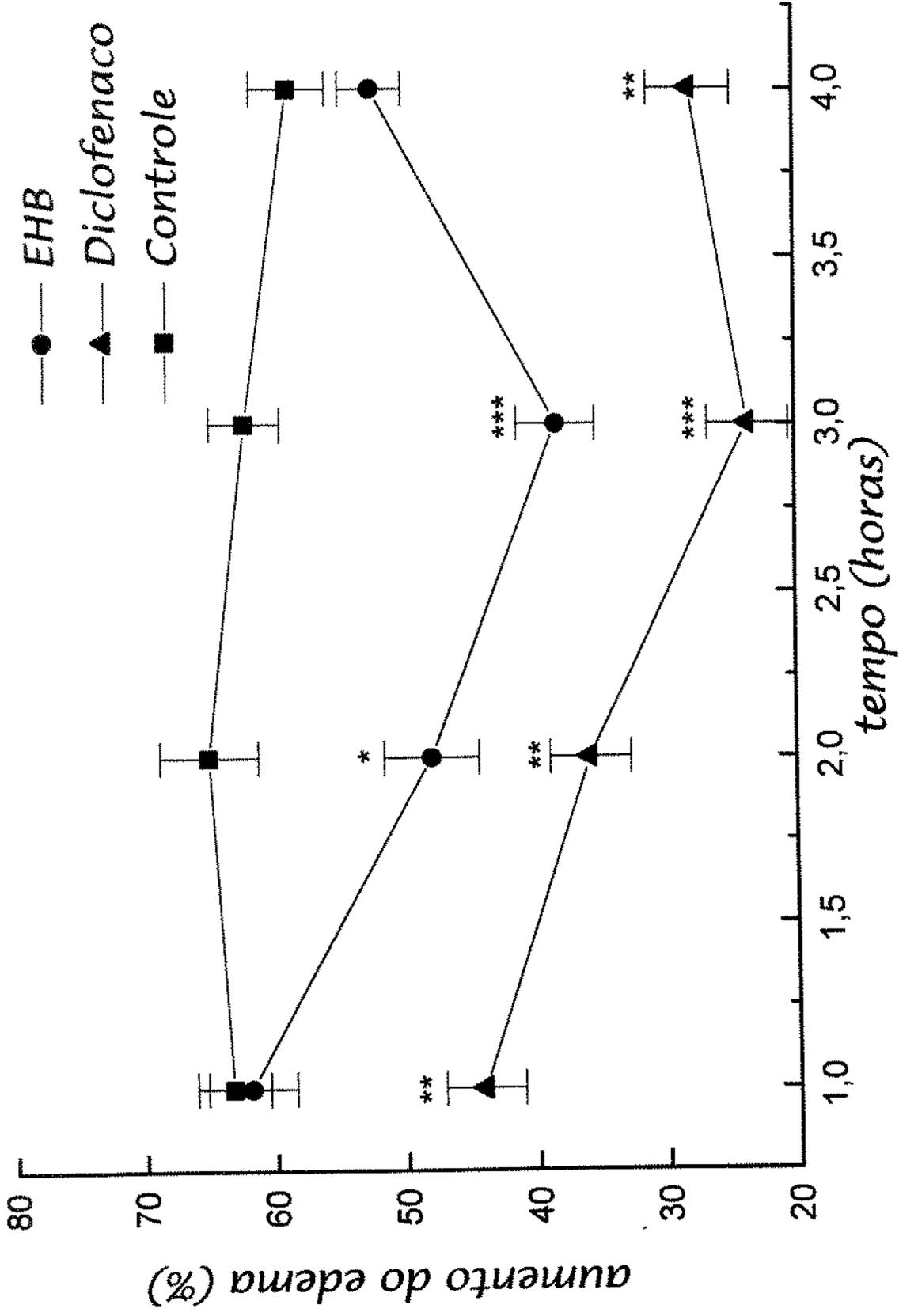
Nestes ensaios foram avaliados os efeitos de EHB na dose de 1 g/kg e de Fr.EtOH na dose de 100 mg/kg, ambos administrados oralmente, sobre o decurso temporal da resposta inflamatória à carragenina no teste de edema de pata. A dose de EHB foi selecionada a partir dos resultados obtidos nos estudos de toxicidade aguda. A seleção da dose de Fr.EtOH deveu-se a uma maior concentração dos flavonoides que estavam presentes em EHB. Os dados obtidos nestes experimentos estão demonstrados nas figuras 4 e 5, respectivamente. Nestas figuras estão expressos os valores de % de aumento do edema obtidos para os grupos controle e tratados com EHB, Fr.EtOH e diclofenaco sódico.

EHB e Fr.EtOH apresentaram um pico de inibição do edema, estatisticamente significativo, após 3 horas da administração de carragenina; já o diclofenaco sódico inibiu o edema desde a primeira hora. Deste modo, o tempo de 3 horas foi utilizado em todos os experimentos de monitoramento fitoquímico referidos acima.



ANOVA: $F_{(2,18)}$: 1h=0,55 $p>0.05$; 2 h=8,25 $p<0.01$; 3 h= 22,32 $p<0.001$; 4 h= 12,35 $p<0.001$. Teste de Duncan * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

Figura 4 - Efeito de EHB de Turnera ulmifolia, administrado oralmente, sobre o decurso temporal da resposta inflamatória no edema de pata de rato por carragenina.



ANOVA: $F_{(2,18)}$: 1h= 18,87 $p<0.001$; 2h= 17,51 $p<0.001$; 3h= 43,84 $p<0.001$;

4h= 32,09 $p<0.001$. Teste de Duncan * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

Figura 5 - Efeito de Fr.EtOH de *Turnera ulmifolia*, administrada oralmente, sobre o decurso temporal da resposta inflamatória no edema de pata de rato por carragenina.

c) Curva Dose-Efeito

As curvas dose-efeito de EHB, nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg e Fr.EtOH, nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg, ambos administrados pela via oral, foram determinadas utilizando o teste de edema de pata induzido por carragenina e encontram-se demonstradas nas figuras 6 e 7, respectivamente.

A resposta antiedematogênica obtida com as administrações de EHB e de Fr.EtOH de *T. ulmifolia* sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos mostrou-se dose-dependente e os valores de DE₅₀ calculados por regressão linear foram de 3,3 g/kg e 150 mg/kg, respectivamente.

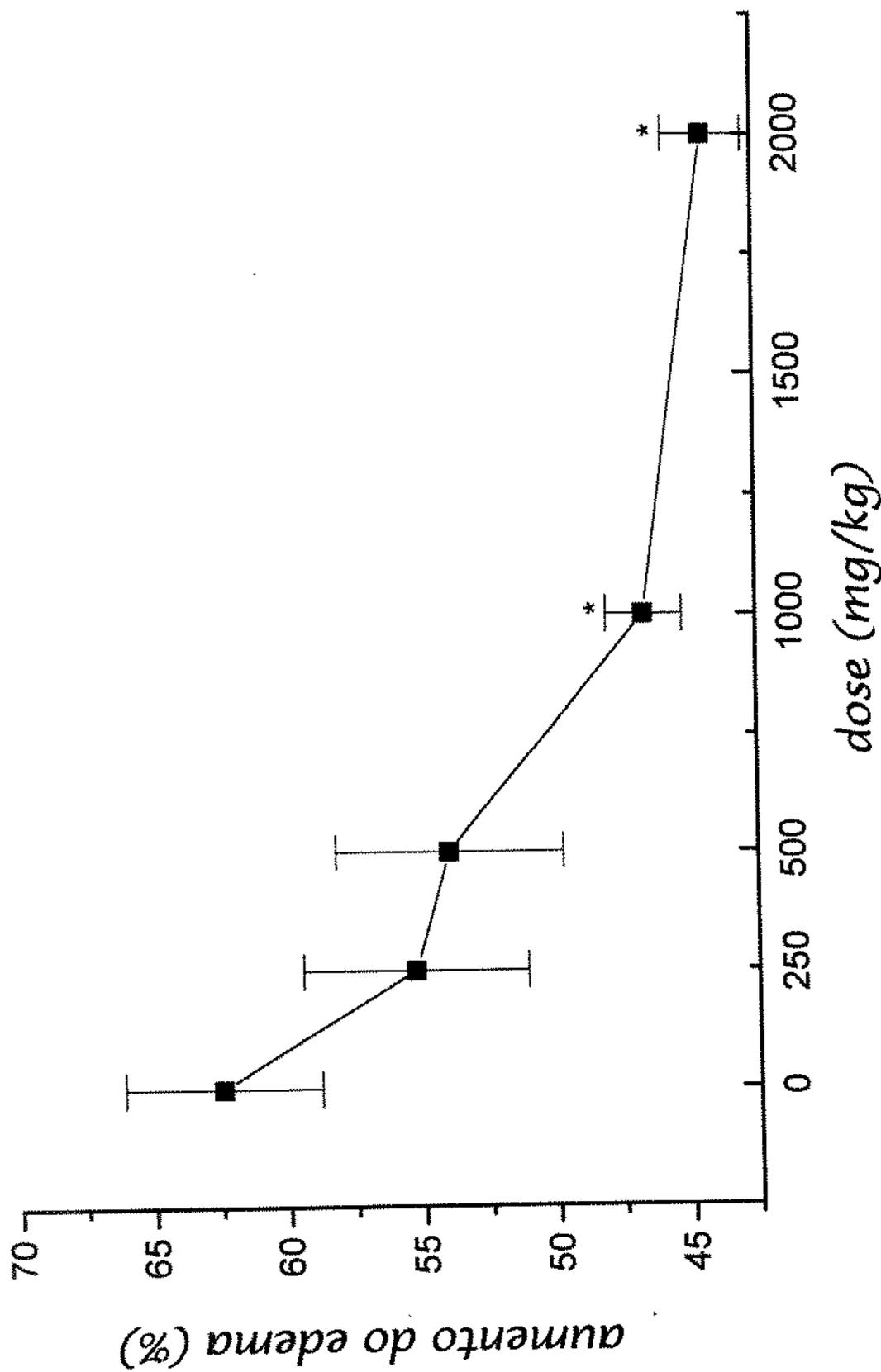
2.2. Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton

O teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton foi realizado utilizando-se acetona (controle negativo), dexametasona (controle positivo) e Fr.EtOH de *T. ulmifolia*, todas aplicadas topicamente. Os dados obtidos nestes experimentos estão sumarizados na tabela 1. Nesta tabela estão relacionadas as porcentagens de aumento da orelha e de inibição do edema.

Tabela 1. Efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e da dexametasona no edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

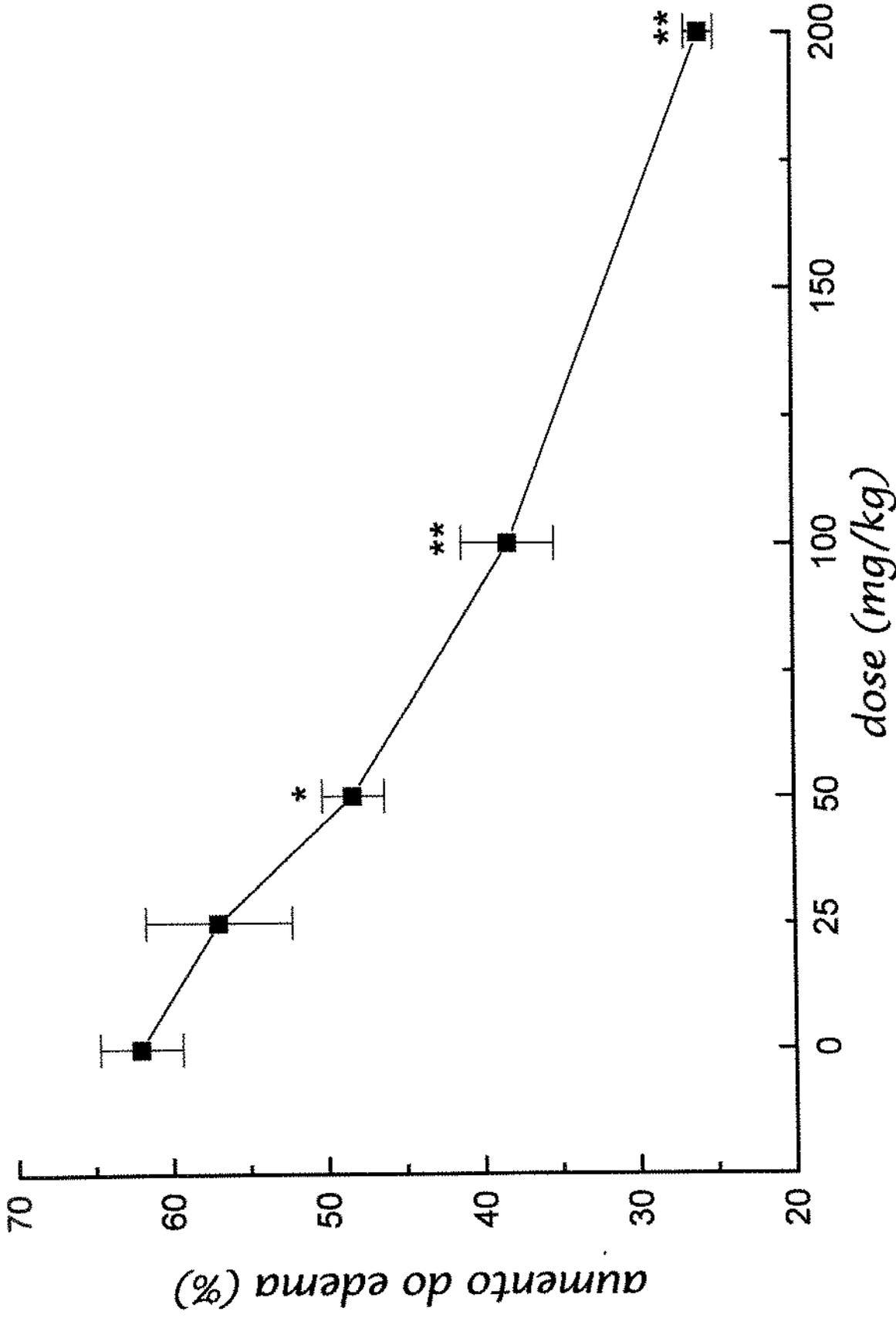
| Amostra | Dose (mg/orelha) | n | % aumento da orelha | % inibição |
|--------------|---------------------|---|---------------------|------------|
| Fr. EtOH | 2 | 8 | 77.9 \pm 3.5 | 0 |
| Dexametasona | 0.2 | 8 | 14.9 \pm 1.8 | 64.8* |
| Controle | 20 μ l/orelha | 9 | 42.3 \pm 3.6 | — |

ANOVA, $F_{(2,22)} = 6,35$ $p < 0.01$. Teste de Duncan: * $p < 0.01$



ANOVA: $F_{(4,30)} = 7,14$ $p < 0.01$. Teste de Duncan * $p < 0.05$

Figura 6 - Curva dose-efeito de EHB de *Turnera ulmifolia*, administrado oralmente, no edema de pata de rato por carragenina.



$F_{(4,30)}$: 24,56 $p < 0.001$. Teste de Duncan * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$

Figura 7 - Curva Dose-Efeito de Fr.EtOH de *Turnera ulmifolia*, administrada oralmente, no edema de pata de rato por carragenina.

A Fr.EtOH não demonstrou atividade antiedematogênica no ensaio de edema de orelha induzida por óleo de cróton, enquanto que a dexametasona inibiu, de modo estatisticamente significativa, o edema em cerca de 65%.

2.3. Granuloma *Cotton Pellet*

Neste ensaio foi avaliada a atividade antiinflamatória de EHB de *T. ulmifolia* sobre as fases transudativa e proliferativa da resposta inflamatória em ratos. Os dados estão sumarizados na tabela 2, estando relacionados valores de % de aumento do *pellet*, comparando-se os grupos controle e tratados com EHB e diclofenaco sódico.

Os resultados obtidos demonstraram que o EHB de *T. ulmifolia* inibiu mais acentuadamente a fase transudativa da resposta ao granuloma *cotton pellet* do que aquela proliferativa, enquanto que o diclofenaco sódico inibiu ambas as fases. Na fase proliferativa, embora EHB de *T. ulmifolia* tenha produzido inibição, esta não foi estatisticamente significativa.

2.4. Permeabilidade Vascular

O EHB de *T. ulmifolia* foi testado no ensaio de permeabilidade vascular induzida por diferentes mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, histamina, prostaglandina E₂ e 5-hidroxitriptamina em ratos. Os resultados estão sumarizados na tabela 3, e foram expressos em unidades de proteína extravasada.

EHB e diclofenaco sódico inibiram o aumento da permeabilidade vascular induzida por histamina, prostaglandina E₂ e 5-hidroxitriptamina, de modo estatisticamente significativa. No entanto, só o diclofenaco inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzido por bradicinina.

Tabela 2. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) de *Turnera ulmifolia* e do diclofenaco sódico sobre as fases transudativa e proliferativa do ensaio de granuloma *cotton pellet* em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Fases | Amostra | Dose (mg/kg) | n | % aumento do <i>pellet</i> | % inibição do edema |
|---------------|-------------|--------------|---|----------------------------|---------------------|
| Transudativa | EHB | 1000 | 5 | 24.4 \pm 4.4** | 56.7 |
| | Diclofenaco | 5 | 5 | 25.8 \pm 8.5* | 54.2 |
| | Controle | 10 ml/kg | 6 | 56.3 \pm 3.9 | — |
| Proliferativa | EHB | 1000 | 5 | 52.9 \pm 12.8 | 31.0 |
| | Diclofenaco | 5 | 5 | 27.4 \pm 2.9* | 64.3 |
| | Controle | 10 ml/kg | 6 | 76.7 \pm 3.6 | — |

ANOVA: Fase Transudativa: $F(2,13) = 5,45$ $p < 0.05$, Fase Proliferativa: $F(2,13) = 4,32$ $p < 0.05$. Teste de Duncan: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Tabela 3. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EHB) de *Turnera ulmifolia* e diclofenaco sódico no aumento da permeabilidade vascular induzida por diferentes mediadores: bradicinina, histamina, 5- hidroxitriptamina (5-HT) e prostaglandina E2 (PGE2) em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | Bradicinina (1 μ g/ml) | Histamina (25 μ g/ml) | 5-HT (250 μ g/ml) | PGE2 (350 ng/ml) |
|--------------------|--------------|---|----------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------|
| EHB | 1000 | 5 | 12.2 \pm 4.9 | 8.6 \pm 1.1* | 3.4 \pm 1.6** | 10.7 \pm 0.9* |
| Diclofenaco sódico | 5 | 5 | 4.7 \pm 2.4* | 6.7 \pm 1.3* | 2.0 \pm 1.1** | 8.7 \pm 0.3** |
| Controle | 10 ml/kg | 5 | 11.9 \pm 2.5 | 18.5 \pm 4.1 | 16.1 \pm 2.6 | 16.2 \pm 1.0 |

ANOVA F(2,12): Bradicnina = 13,84 p<0.05; Histamina = 18,14 p<0.05; 5-HT = 21,45 p<0.01; PGE2 = 8,33 p<0.05. Teste de Duncan: * p < 0.05 ** p < 0.01

2.5. Estudo do Exsudato Peritoneal e do Sangue Periférico

Neste ensaio foram investigados os efeitos da Fr.EtOH, administrada intraperitonealmente, nas doses de 5000, 500 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tanto no sangue periférico quanto no exsudato peritoneal, 72 horas após a administração em camundongos. Os resultados obtidos para Fr.EtOH e LPS (utilizado como agente estimulador da quimiotaxia de leucócitos para o peritônio) foram analisados em relação a aqueles do grupo controle, que recebeu apenas solução tampão PBS.

Os dados relativos às contagens total e diferencial do sangue periférico estão sumarizados na figura 8 e tabela 4, respectivamente.

Através dos resultados obtidos verificou-se que Fr.EtOH não produziu alterações significativas no número total de eritrócitos e leucócitos. No entanto, quando foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos do sangue periférico observou-se aumentos dose-dependentes no número de basófilos, os quais só foram estatisticamente significantes nas maiores doses utilizadas de Fr.EtOH. LPS reduziu o número de leucócitos totais, principalmente por reduzir, significativamente, o número de linfócitos do sangue periférico.

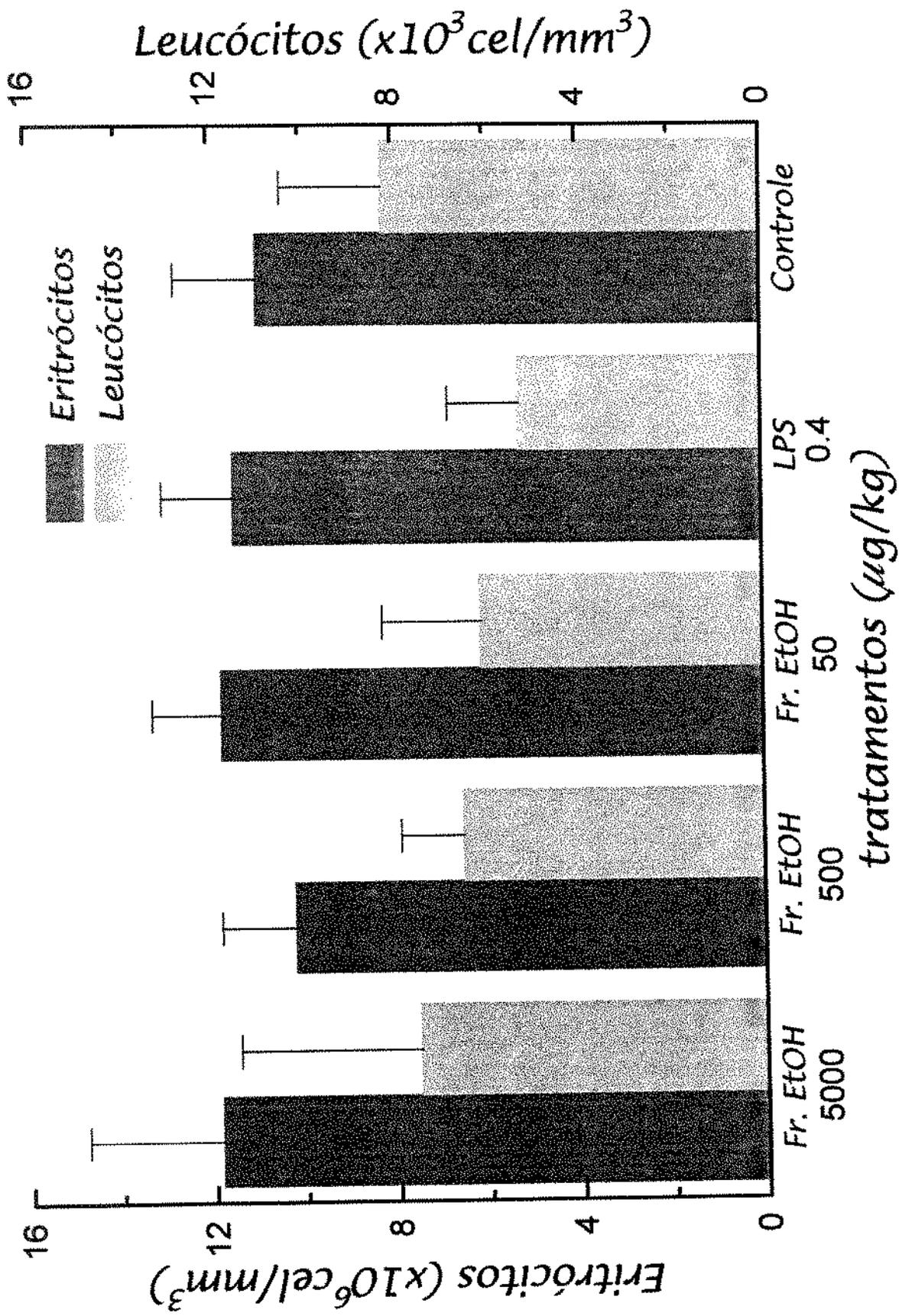
Do mesmo modo, os resultados relativos à contagem total e diferencial de leucócitos do exsudato peritoneal estão demonstrados na figura 9 e tabela 5, respectivamente.

Observou-se que enquanto o LPS aumentou, de modo estatisticamente significativo, o número de leucócitos totais que migraram para a cavidade peritoneal, Fr.EtOH de *T. ulmifolia* produziu uma redução no total de leucócitos, também significativa e diretamente proporcional à dose utilizada.

A análise dos dados existentes na tabela 5 revelou que as reduções, estatisticamente significantes, observadas com Fr.EtOH ocorreram tanto em relação ao número de neutrófilos, quanto de linfócitos. Já o LPS, aumentou, de modo

estatisticamente significativo, o número de monócitos e de linfócitos, enquanto que não produziu nenhuma alteração em relação ao número de neutrófilos.

Os resultados obtidos sugeriram que Fr.EtOH produziu uma inibição na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal provocada pela administração intraperitoneal de PBS.



ANOVA: $F_{(4,20)}$; Eritrócitos = 0.52 $p > 0.05$; Leucócitos = 1.69 $p > 0.05$

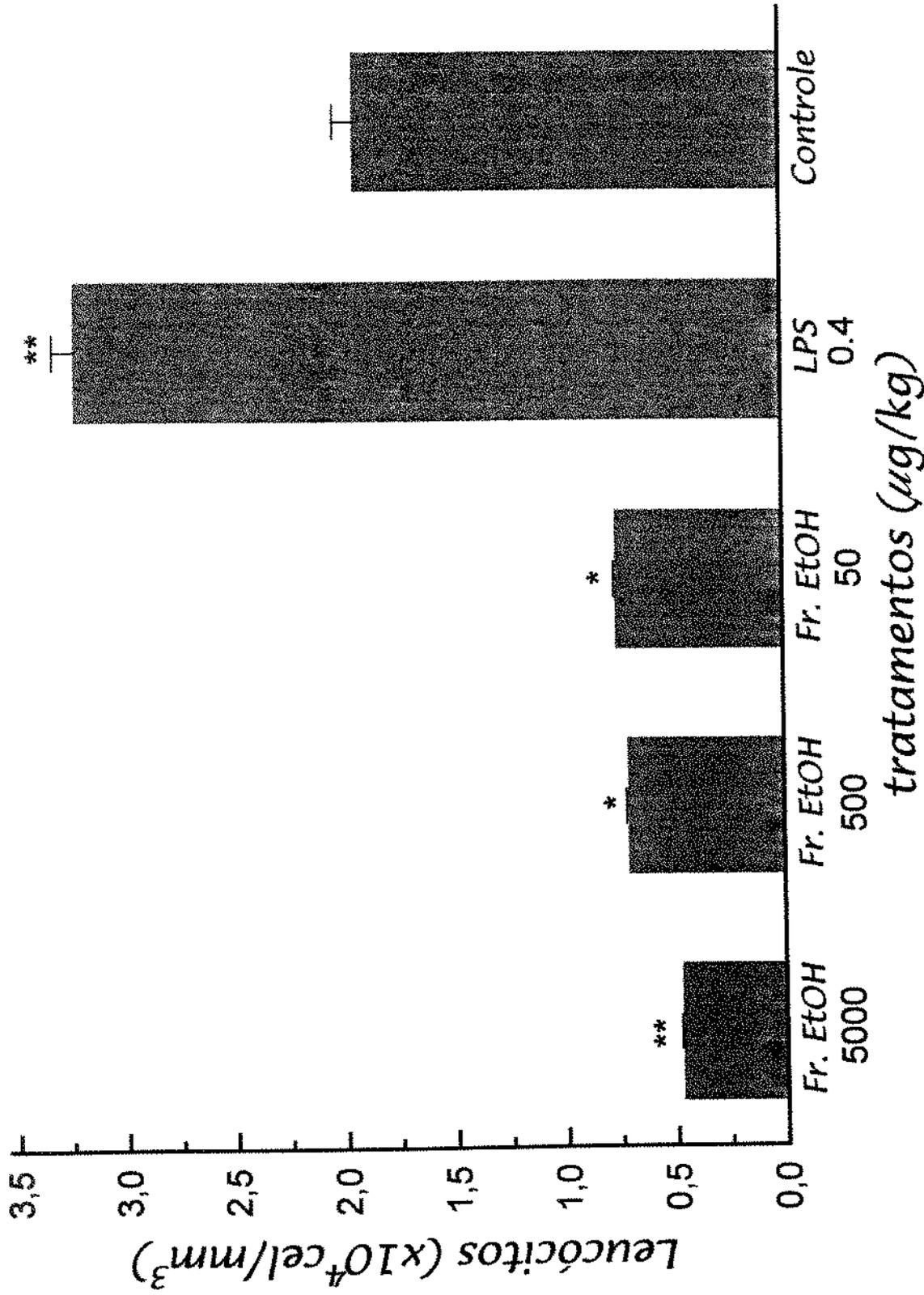
Figura 8 - Efeito de Fr.EtOH de *Turnera ulmifolia*, administrada intraperitonealmente, sobre a contagem total de eritrócitos e leucócitos do sangue periférico. ⁴

Tabela 4. Efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Tumera ulmifolia* e do lipopolissacarídeo (LPS) sobre a contagem diferencial de células do sangue periférico. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | n | média \pm epm ($\times 10^3$ cel / mm^3) | | | | |
|----------|-------------------------------------|---|---|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| | | | Basófilo | Eosinófilo | Neutrófilo | Linfócito | Monócito |
| Fr. EtOH | 5000 | 5 | 1.53 \pm 0.25 ^{***} | 2.16 \pm 0.64 | 1.72 \pm 0.62 | 3.74 \pm 1.36 | 0.38 \pm 0.19 |
| | | 4 | 1.23 \pm 0.32 ^{***} | 1.58 \pm 0.51 | 0.92 \pm 0.16 | 2.79 \pm 0.82 | 0.13 \pm 0.08 |
| LPS | 0,4 | 5 | 0.33 \pm 0.17 | 1.39 \pm 0.10 ^{**} | 1.03 \pm 0.53 | 3.90 \pm 1.15 | 0.44 \pm 0.45 |
| | | 5 | 0.18 \pm 0.14 | 1.28 \pm 0.99 | 1.29 \pm 0.27 | 2.18 \pm 0.98 ^{**} | 0.33 \pm 0.10 |
| Controle | 10 ml/kg | 5 | 0.32 \pm 0.06 | 1.98 \pm 0.68 | 1.24 \pm 0.52 | 4.30 \pm 1.15 | 0.38 \pm 0.07 |

Basófilo ANOVA $F(4, 19)=44,9$ $p<0.001$ Neutrófilo ANOVA $F(4, 19)=2,12$ $p>0.05$ Monócito ANOVA $F(4, 19)=1.08$ $p>0.05$

Eosinófilo ANOVA $F(4, 19)=5,56$ $p<0.01$ Linfócito ANOVA $F(4, 19)=1,27$ $p<0.05$ Teste de Duncan: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$



ANOVA: $F_{(4,20)} = 17,32$ $p < 0.001$. Teste de Duncan * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

tratamentos ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Figura 9 - Efeito de Fr. EtOH de *Turnera ulmifolia*, administrada intraperitonealmente, sobre a contagem total de leucócitos do exsudato peritoneal.

Tabela 5. Efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e do lipopolissacarídeo (LPS) sobre a contagem diferencial de células do exsudato peritoneal. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | n | média \pm epm ($\times 10^3$ cel / mm^3) | | |
|----------|-------------------------------------|---|---|--------------------|-------------------|
| | | | Neutrófilo | Linfócito | Monócito |
| Fr. EtOH | 5000 | 5 | 1.23 \pm 0.31* | 2.68 \pm 0.65** | 0.81 \pm 0.30 |
| | 500 | 5 | 1.20 \pm 0.35* | 4.42 \pm 0.56** | 1.49 \pm 0.40 |
| | 50 | 5 | 1.09 \pm 0.42** | 4.68 \pm 1.46* | 1.81 \pm 0.61 |
| LPS | 0,4 | 5 | 2.62 \pm 1.26 | 21.60 \pm 6.86** | 7.98 \pm 3.49** |
| Controle | 10 ml/kg | 5 | 2.89 \pm 1.61 | 12.19 \pm 6.46 | 3.95 \pm 2.95 |

Neutrófilo ANOVA F(4,20) = 4.2 p<0.05

Linfócito ANOVA F(4,20) = 16,9 p<0.001

Monócito ANOVA F(4,20) = 9,9 p<0.001

Teste de Duncan: * p < 0.05 ** p < 0.01

3. Modelo de Potência Antiinflamatória x Atividade Ulcerogênica

Neste tipo de ensaio avaliou-se a propriedade de EHB de *T. ulmifolia*, administrado oralmente, nas doses de 500, 750 e 1000 mg/kg, em potencializar as lesões gástricas induzidas pela aspirina. O grupo controle recebeu apenas veículo, antes da administração da aspirina. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 6, demonstrando o número de lesões ulcerosas nos três níveis avaliados (1+,2+ e 3+), assim como sobre o índice de lesões ulcerativas (ILU).

EHB de *T. ulmifolia*, administrado nas doses de 500, 750 e 1000 mg/kg por via oral, não potencializou as lesões gástricas induzidas por aspirina, mas sim promoveu inibições, estatisticamente significantes, da ulcerações, com valores de ILU 67, 73 e 81% menores que aqueles obtidos para o grupo controle, respectivamente. Esta inibição ocorreu nos três níveis de lesão avaliados, porém só a inibição daquelas dos níveis 1+ e 2+ foram estatisticamente significativas.

Tabela 6. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) de *Turnera ulmifolia* e da aspirina na mucosa gástrica de ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | Nível 1+ | Nível 2+ | Nível 3+ | ILU |
|----------|--------------|---|-----------------|----------------|---------------|------------------|
| EHB | 500 | 7 | 20.7 \pm 2.6* | 2.1 \pm 0.6* | 1.6 \pm 0.4 | 29.7 \pm 3.1** |
| | 750 | 7 | 17.8 \pm 2.0* | 1.8 \pm 0.3* | 1.0 \pm 0.4 | 24.4 \pm 2.9** |
| | 1000 | 7 | 13.4 \pm 1.8* | 1.1 \pm 0.1* | 0.5 \pm 0.1 | 17.1 \pm 3.5** |
| Controle | 200 | 7 | 65.7 \pm 5.6* | 7.0 \pm 0.7* | 3.6 \pm 0.6 | 90.4 \pm 5.6* |

EHB: ANOVA, F(4, 29); Nível 1+ = 25,08 p<0.001; Nível 2+ = 12,80 p<0.01; Nível 3+ = 3,73 p>0.05; ILU = 46,97 p<0.001.

Teste de Duncan: * p < 0.05 ** p < 0.01

4. Modelos de Úlcera

4.1. Indometacina

Foi avaliada a atividade antiulcerogênica do EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia*, utilizando a indometacina como agente indutor de úlceras gástricas. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 7, demonstrando o número de lesões ulcerosas nos três níveis avaliados (1+,2+ e 3+), assim como o ILU.

EHB de *T. ulmifolia*, na dose de 1 g/kg inibiu, de modo estatisticamente significativo, a formação de lesões ulcerativas induzidas por indometacina, com um valor de ILU cerca de 50% menor que aquele obtido para o grupo controle. A inibição ocorreu nos três níveis de lesão, porém só a inibição daquelas do nível 2+ (1 a 3 mm de extensão) foi estatisticamente significativa. A cimetidina reduziu o ILU em cerca de 90%, com inibições significantes sobre as lesões de pequena e média intensidade, mas sem efeito sobre as lesões profundas.

Já Fr.EtOH, administrada oralmente na mesma dose que a cimetidina (100 mg/kg), inibiu significativamente a formação de lesões ulcerativas induzidas por indometacina, nos três níveis de lesão avaliados, porém só a inibição dos níveis 1+ e 2+ foi estatisticamente significativa. A cimetidina mostrou-se mais ativa que a fração e produziu inibição significativa inclusive sobre as lesões profundas.

Tabela 7. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e da cimetidina na úlcera induzida por indometacina em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | Nível 1+ | Nível 2+ | Nível 3+ | ILU |
|------------|--------------|---|-------------------|-----------------|---------------|-------------------|
| EHB | 1000 | 7 | 13.8 \pm 0.8 | 1.4 \pm 0.8* | 0.8 \pm 0.5 | 19.0 \pm 2.5* |
| Cimetidina | 100 | 7 | 4.1 \pm 1.0** | 0.3 \pm 0.2* | 0 | 4.6 \pm 1.1** |
| Controle | 10 ml/kg | 7 | 16.0 \pm 2.2 | 7.8 \pm 1.7 | 2.5 \pm 1.1 | 39.0 \pm 6.2 |
| Fr.EtOH | 100 | 7 | 32.1 \pm 14.2** | 1.4 \pm 1.6** | 0.4 \pm 1.1 | 36.3 \pm 18.3** |
| Cimetidina | 100 | 7 | 17.9 \pm 8.7** | 0** | 0* | 17.9 \pm 8.7** |
| Controle | 10 ml/kg | 6 | 62.8 \pm 9.7 | 7.2 \pm 2.5 | 2.3 \pm 1.5 | 84.2 \pm 8.7 |

ANOVA: EHB: F(2, 18): Nível 1+ = 15,7 p<0.001; Nível 2+ = 12,3 p<0.001; Nível 3+ = 3,19 p>0.05; ILU = 18,2 p<0.001; Fr.EtOH: F(2, 17): Nível 1+ = 26,76 p<0.001; Nível 2+ = 31,87 p<0.001; Nível 3+ = 8,70 p<0.01; ILU = 44,64 p<0.001. Teste de Duncan: * p < 0.01 ** p < 0.001

4.2. Etanol

Foi avaliada a atividade antiulcerogênica do EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia*, utilizando o etanol como agente indutor de úlceras gástricas. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 8, demonstrando o número de lesões ulcerosas nos três níveis avaliados (1+,2+ e 3+), assim como os valores de ILU.

EHB de *T. ulmifolia*, na dose de 1 g/kg, inibiu, de modo estatisticamente significativo, a formação de lesões ulcerativas induzidas por etanol, com um valor de ILU cerca de 60% menor que aquele obtido para o grupo controle. A inibição ocorreu de modo estatisticamente significativo nos três níveis de lesão avaliados. Já Fr.EtOH, administrada oralmente numa dose 5 vezes maior (100 mg/kg) que o omeprazol (droga de referência), também inibiu, de modo estatisticamente significativo, a formação de lesões ulcerativas induzidas por etanol, nos três níveis de lesão avaliados, com um valor de ILU cerca de 55% menor que aquele obtido para o grupo controle. A inibição obtida para o omeprazol, administrado oralmente na dose de 20 mg/kg, foi de cerca de 58% em relação ao ILU, com inibições significantes em todos os níveis de lesão avaliados.

Tabela 8. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e do omeprazol na úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | Nível 1+ | Nível 2+ | Nível 3+ | ILU |
|-----------|--------------|---|------------------|-----------------|----------------|------------------|
| EHB | 1000 | 7 | 29.6 \pm 3.5** | 1.6 \pm 0.4** | 1.3 \pm 0.7* | 38.0 \pm 4.3** |
| Fr. EtOH | 100 | 7 | 33.3 \pm 3.4** | 3.4 \pm 0.9** | 1.4 \pm 0.7* | 44.1 \pm 5.5** |
| Omeprazol | 20 | 7 | 30.8 \pm 2.7** | 2.3 \pm 0.7** | 1.8 \pm 0.7* | 41.0 \pm 4.2** |
| Controle | 10 ml/kg | 6 | 62.1 \pm 3.9 | 8.4 \pm 0.6 | 6.4 \pm 1.1 | 98.3 \pm 5.1 |

ANOVA, F(3,23): Nível 1+ = 19,99 p<0.001; Nível 2+ = 20,30 p<0.001; Nível 3+ = 8,90 p>0.001; ILU = 33,60 p<0.001. Teste de Duncan: * p < 0.01 ** p < 0.001

4.3. Estresse por Imobilização e Frio

Foram avaliadas as atividades antiulcerogênicas de EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia* utilizando o estresse por imobilização e frio como agente indutor de úlceras gástricas. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 9, demonstrando o número de lesões ulcerosas nos três níveis avaliados (1+,2+ e 3+), assim como o índice de lesões ulcerativas.

Os dados obtidos revelaram que nem EHB, na dose de 1 g/kg, nem Fr.EtOH, na dose de 100 mg/kg, ambos administrados oralmente, não inibiram a formação de lesões ulcerativas induzidas por estresse nos três níveis de lesão avaliados. O omeprazol, administrado por via oral na dose de 20 mg/kg, apresentou um valor de ILU cerca de 60% menor que aquele obtido para o grupo controle. Esta inibição ocorreu nos três níveis de lesão, porém só inibição daquelas dos níveis 1+ e 2+ foram estatisticamente significativas, não apresentando efeito inibitório sobre as lesões profundas.

Tabela 9. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e do omeprazol na úlcera induzida por estresse por imobilização e frio em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | Nível 1+ | Nível 2+ | Nível 3+ | ILU |
|-----------|-----------------|---|------------------|----------------|---------------|------------------|
| EHB | 1000 | 8 | 56.0 \pm 5.1 | 10.3 \pm 2.5 | 4.5 \pm 1.2 | 82.5 \pm 13.8 |
| Fr.EtOH | 100 | 8 | 50.3 \pm 4.2 | 9.3 \pm 1.9 | 6.3 \pm 0.7 | 82.4 \pm 14.3 |
| Omeprazol | 20 | 8 | 22.5 \pm 1.8** | 3.1 \pm 1.1* | 2.6 \pm 1.2 | 32.5 \pm 7.1* |
| Controle | 10 ml/kg | 8 | 49.8 \pm 3.4 | 10.1 \pm 1.2 | 4.5 \pm 1.0 | 131.1 \pm 20.8 |

ANOVA, F(3,28): Nível 1+ = 20,25 p<0.001; Nível 2+ = 5,64 p<0.05; Nível 3+ = 2,5 p>0.05; ILU = 8,74 p<0.01.
 Teste de Duncan: * p < 0.01 ** p < 0.001

4.4. Ligadura do Píloro

Foi avaliada a atividade antiulcerogênica do EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia* utilizando o modelo de ligadura do píloro. Foram também avaliados os efeitos dos tratamentos sobre o pH e volume gástrico, assim como sobre a concentração de ácido total. Os resultados obtidos referentes à formação de úlceras gástricas estão sumarizados na tabela 10, demonstrando os valores de ILU. Já na tabela 11 estão demonstradas as alterações do pH e volume gástrico, assim como da concentração de ácido total.

A análise dos resultados revelou que EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia*, nas doses de 1000 e 100 mg/kg, respectivamente, inibiram, significativamente, a formação de lesões ulcerativas, com um valores de ILU cerca de 80% menores que aquele obtido para o controle. Esta redução do ILU foi acompanhada de um aumento, também estatisticamente significante, do volume gástrico sem, contudo, ocorrerem alterações no pH e na concentração de ácido total.

A cimetidina reduziu o ILU em cerca de 60%, não alterando o volume do conteúdo gástrico total. Entretanto o pH gástrico e a concentração de ácido foram alterados de modo estatisticamente significante.

Tabela 10. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) e da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e da cimetidina na úlcera induzida por ligadura do píloro em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | ILU |
|------------|--------------|---|----------------|
| EHB | 1000 | 5 | 4.4 \pm 1.3* |
| Fr.EtOH | 100 | 5 | 3.7 \pm 0.9* |
| Cimetidina | 100 | 5 | 8.8 \pm 2.1* |
| Controle | 10 ml/kg | 5 | 20.8 \pm 3.7 |

ANOVA, $F_{(3,16)}=10,89$ $p < 0.01$. Teste de Duncan: * $p < 0.01$

Tabela 11. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) e da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e da cimetidina sobre o pH, e volume e concentração de ácido total estomacal na úlcera induzida por ligadura do piloro em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | Volume gástrico | pH gástrico | [ácido total] mg/ml |
|------------|--------------|---|-----------------|----------------|---------------------|
| EHB | 1000 | 5 | 2.7 \pm 0.6* | 3.4 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.3 |
| Fr.EtOH | 100 | 5 | 5.5 \pm 0.5** | 3.0 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.2 |
| Cimetidina | 100 | 5 | 1.1 \pm 0.2 | 6.4 \pm 0.2* | 1.4 \pm 0.1* |
| Controle | 10 ml/kg | 5 | 1.5 \pm 0.3 | 5.2 \pm 0.3 | 0.8 \pm 0.1 |

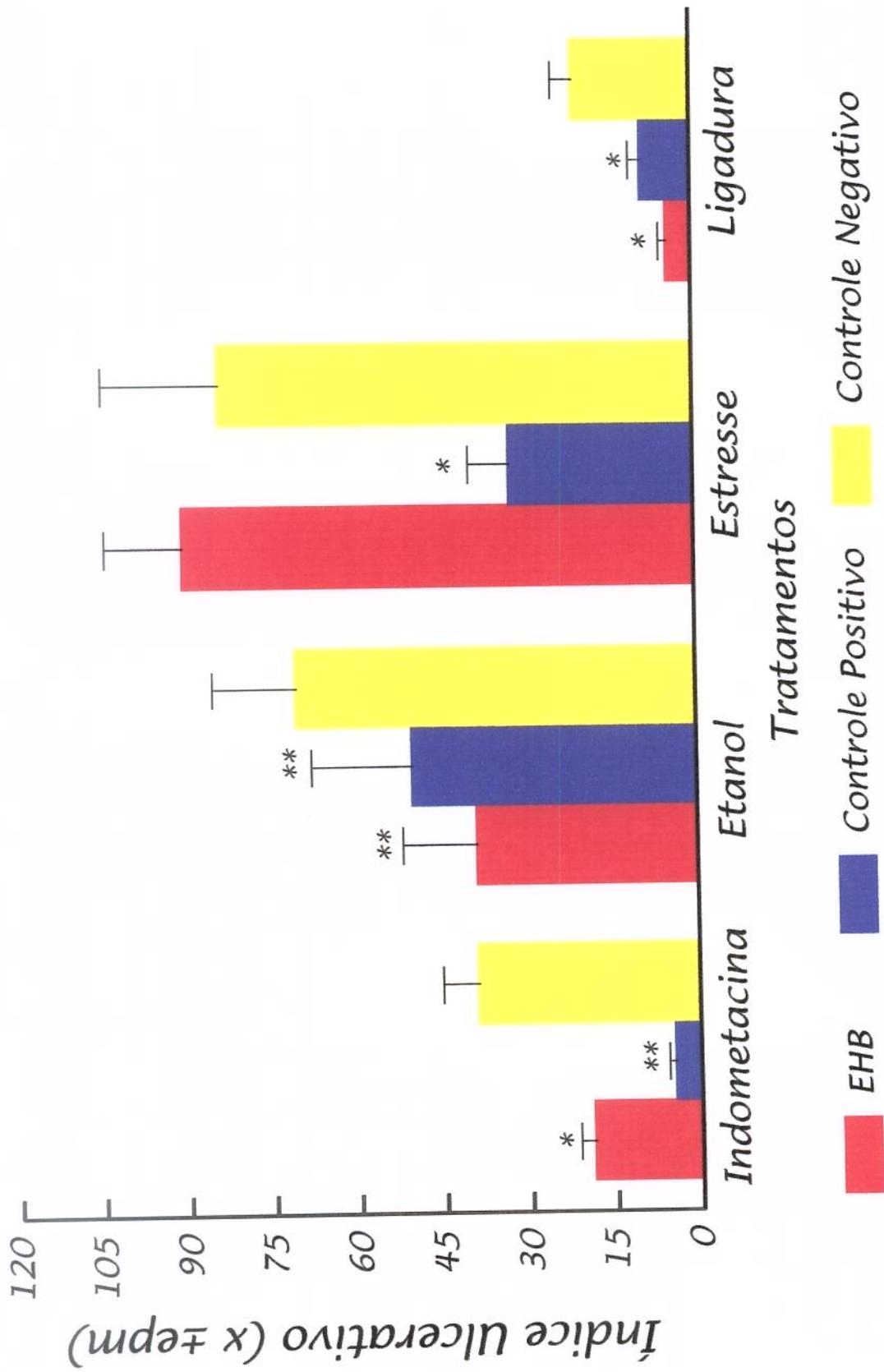
ANOVA, $F_{(3,16)}$: Volume gástrico = 3,77 $p > 0.05$; pH = 10,73 $p < 0.01$; $[H^+]$ = 1,59 $p < 0.05$.
 Teste de Duncan: * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

A potência relativa de EHB e Fr.EtOH sobre os diversos modelos de indução de úlceras gástricas estudados foi comparada e os resultados estão apresentados na figura 10.

Quando os efeitos de EHB e respectivos controles positivos (cimetidina ou omeprazol dependendo do agente indutor de lesões ulcerativas utilizado), administrados oralmente, foram comparados observou-se que:

- o modelo de estresse por imobilização e frio foi o que causou o maior dano à mucosa gástrica e neste modelo EHB não apresentou atividade antiulcerogênica;
- a ligadura do piloro foi o modelo que causou o menor dano à mucosa gástrica e EHB inibiu o aparecimento das lesões neste modelo;
- EHB também apresentou efeito inibitório tanto sobre as lesões induzidas por etanol quanto sobre aquelas induzidas pela indometacina.

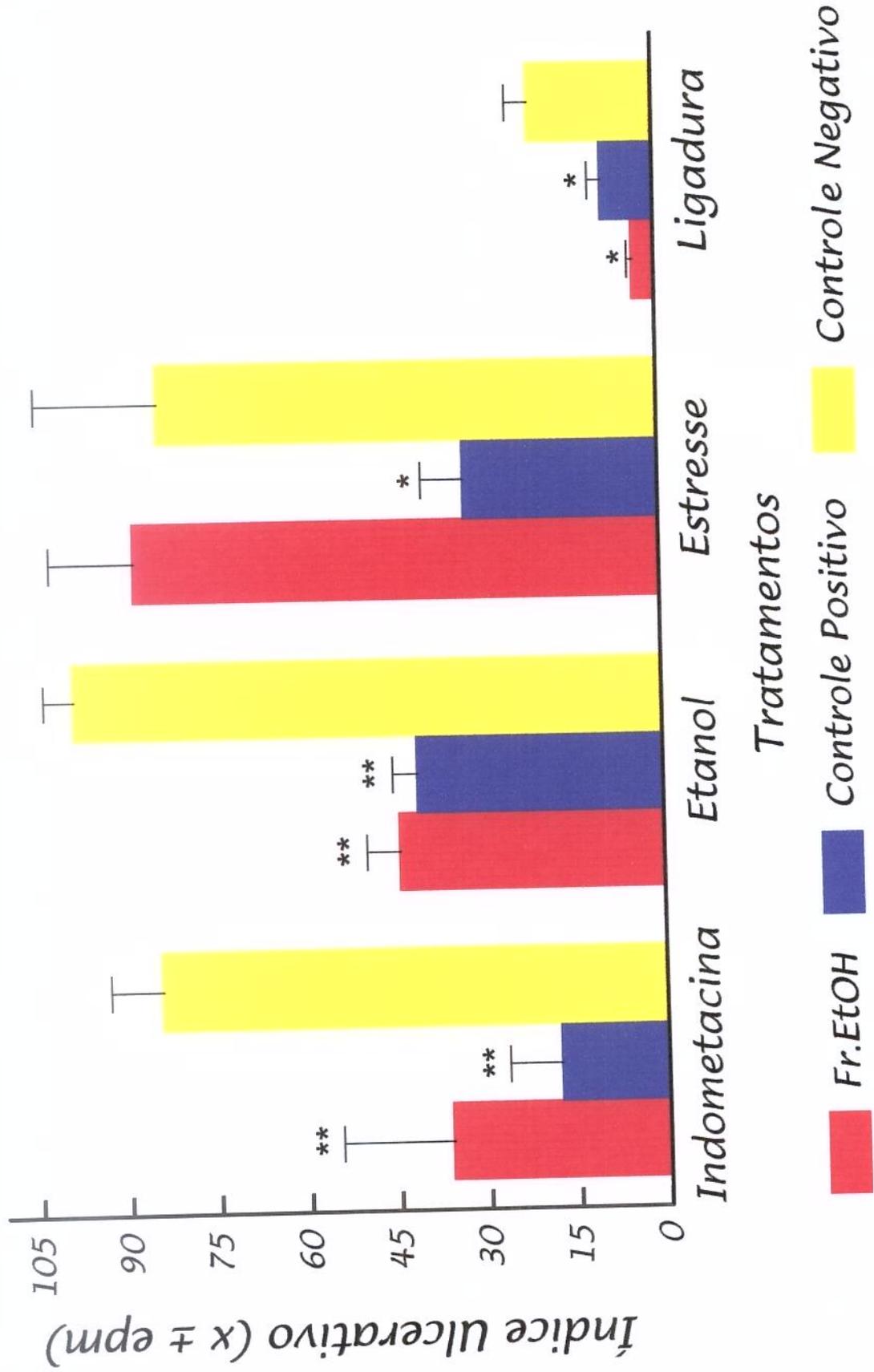
A fração de polaridade intermediária, Fr.EtOH, administrada pela mesma via em dose 10 vezes menor que aquela de EHB, comportou-se do mesmo modo, indicando que esta fração, além de concentrar o(s) princípio(s) ativo(s) sobre a resposta inflamatória, também concentrou aquele(s) responsável(s) pela ação antiulcerogênica.



ANOVA: Indometacina: $F_{(2,18)} = 18,2$ $p < 0.001$; Etanol: $F_{(2,18)} = 33,60$ $p < 0.001$; Estresse:

$F_{(2,21)} = 8,74$ $p < 0.01$; Ligadura: $F_{(2,12)} = 10,89$ $p < 0.01$. Teste de Duncan * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

Figura 10 - Potência relativa de EHB de *Turnera ulmifolia*, administrado oralmente, em diferentes modelos de úlcera gástrica em ratos.



ANOVA: Indometacina: $F_{(2,17)} = 44,64$ $p < 0.001$; Etanol: $F_{(2,18)} = 31,20$ $p < 0.001$;
 Estresse: $F_{(2,21)} = 6,87$ $p < 0.01$. Teste de Duncan * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

Figura 11 - Potência Relativa em Modelos de Úlcera Gástrica da Fração de Polaridade Intermediária de Turnera ulmifolia.

4.5. Determinação do Muco da Barreira Gastroprotetora

Foi avaliada a atividade de Fr.EtOH de *T. ulmifolia*, utilizando a metodologia de determinação do muco da barreira gastroprotetora. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 12, demonstrando os valores médios expressos em μg de Alcian Blue/g de tecido.

Tabela 12. Efeito da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e da carbenoxolona sobre a formação do muco da barreira gastroprotetora em ratos submetidos a estresse por imobilização e frio. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | [muco] $\mu\text{g/g}$ tecido | % aumento |
|---------------|--------------|---|----------------------------------|-----------|
| Fr.EtOH | 100 | 7 | 259.3 \pm 44.1* | 37.6 |
| Carbenoxolona | 200 | 7 | 267.3 \pm 24.8* | 41.9 |
| Controle | 10 ml/kg | 7 | 188.4 \pm 32.1 | --- |

ANOVA, $F_{(2,18)}=6,12$ $p<0.01$. Teste de Duncan: * $p < 0.05$

Os dados obtidos demonstraram que Fr.EtOH de *T. ulmifolia*, na dose de 100 mg/kg, e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, ambas administradas oralmente, promoveram aumentos, estatisticamente significantes, na formação do muco da barreira gastroprotetora, cerca de 40% menor em relação aos totais obtidos para o grupo controle (animais estressados que receberam apenas o veículo).

5. Modelo de Algesia por Ácido Acético

Neste modelo foi avaliada a atividade analgésica de EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia* em camundongos, utilizando-se o ácido acético como indutor de algesia. Os resultados, expressos como média \pm erro padrão do número de contorções, obtidos neste experimento, estão demonstrados na tabela 13.

Tabela 13. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto (EHB), da fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) de *Turnera ulmifolia* e da dipirona magnesiana no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

| Amostra | Dose (mg/kg) | n | número de contorções | % inibição das contorções |
|---------------------|--------------|----|----------------------|---------------------------|
| EHB | 1000 | 12 | 45.1 \pm 5.5 | 0 |
| Fr.EtOH | 100 | 12 | 30.3 \pm 4.9 | 19.9 |
| Dipirona magnesiana | 200 | 12 | 3.6 \pm 0.8* | 90.4 |
| Controle | 10 ml/kg | 12 | 37.5 \pm 4.3 | — |

ANOVA, $F(3,44)=17,72$ $p<0.001$. Teste de Duncan: * $p < 0.001$

EHB de *T. ulmifolia*, administrado oralmente na dose de 1g/kg, não inibiu as contorções induzidas por ácido acético, enquanto que Fr.EtOH, em uma dose 10 vezes menor (100 mg/kg) promoveu uma redução, embora não significativa, de cerca de 20% no número de contorções apresentadas pelo grupo controle. A droga de referência, dipirona magnesiana, administrada oralmente na dose de 200 mg/kg, produziu uma inibição, estatisticamente significativa, das contorções abdominais induzidas por ácido acético de aproximadamente 90%.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

Capítulo IV

Discussão

Foi descrito anteriormente que extratos etanólicos preparados a partir das folhas de *Turnera diffusa* e das raízes secas de *T. blanchetiana*, mostraram-se citotóxicos (Nascimento et al., 1990). Por outro lado Tober & Conn (1985) detectaram ácido hidrocianico nas sementes de *T. ulmifolia*. Por esta razão, estudou-se possíveis efeitos tóxicos desta espécie *in vivo* e *in vitro*. Verificou-se que EHB não foi tóxico aos animais quando administrado pelas vias oral e intraperitoneal. Fr.EtOH só mostrou sinais de toxicidade às células em concentrações superiores à 300 mg/ml, com uma CI_{50} calculada de 465 mg/ml, o que confere ao(s) princípio(s) ativo(s) desta espécie boa margem de segurança em relação às doses empregadas (Cingi et al., 1991).

É conhecido que a inflamação é uma resposta do tecido à qualquer tipo de injúria, seja induzida por agente mecânico, químico ou por microorganismos. Esta resposta inflamatória envolve um complexo conjunto de ativações enzimáticas,

liberação de mediadores, extravasamento de fluidos corpóreos, migração celular, colapso e reparo tissular (Vane & Botting, 1995).

Os efeitos antiinflamatórios podem ser obtidos por uma grande variedade de agentes químicos distintos e não existe uma correlação evidente entre suas atividades farmacológicas e estruturas químicas (Sertié et al., 1990). Este fato, associado à complexidade do processo inflamatório, demonstra que o uso de diferentes modelos experimentais são essenciais nas triagens farmacológicas de substâncias potencialmente antiinflamatórias.

Por outro lado, a pesquisa para drogas antiinflamatórias seguras, as quais não apresentem efeitos gástricos indesejáveis, continua em andamento e parte desta pesquisa é o estudo de plantas medicinais, conhecidas por serem utilizadas popularmente no tratamento de desordens inflamatórias, sem relatos de efeitos colaterais sobre o trato gastrointestinal (Singh et al., 1989).

Devido ao uso popular da espécie *T. ulmifolia* em distúrbios inflamatórios em geral, foram estudadas as propriedades antiinflamatórias do extrato bruto hidroalcoólico 70% (EHB) e de sua fração ativa (Fr.EtOH) em vários modelos de inflamação. EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia* mostraram um efeito antiedematogênico dose-dependente em ensaio de edema de pata induzido por carragenina; embora ambos tenham apresentado inibição significativa do edema, essa redução foi menos efetiva que aquela obtida para diclofenaco sódico, utilizado como droga de referência. As respostas máximas de EHB e Fr.EtOH, administrados pela via oral, ocorreram 3 horas após o tratamento com o agente flogístico. Para os demais experimentos de inflamação com EHB foi selecionada a dose de 1 g/kg, pois além de não apresentar toxicidade, a inibição do edema de pata com a dose de 2 g/kg não foi tão superior que justificasse o uso desta dose.

Quando EHB foi fracionado, empregando-se critérios de polaridade (Verpoorte, 1989), as três frações obtidas foram testadas na dose de 100 mg/kg, administradas oralmente, no edema de pata por carragenina com o objetivo de descobrir a fração mais ativa. A dose 10 vezes menor de fração que aquela utilizada nos experimentos com EHB (testado a 1 g/kg) foi selecionada porque, em análises fitoquímicas preliminares, verificou-se que nas frações mais ativas, obtidas a partir deste extrato (fração de polaridade intermediária - Fr.EtOH - e fração polar - Fr.Aq.), uma mistura de dois flavonoides glicosilados foi detectada, e ela estava presente nestas frações em concentrações 10 vezes maiores que em EHB. Para os ensaios complementares utilizou-se somente Fr.EtOH (100 mg/kg) devido ao seu elevado rendimento quando comparado à fração polar.

É conhecido que a resposta inflamatória aguda consiste em três principais efeitos vasculares: (i) vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo vascular, (ii) aumento da permeabilidade vascular e (iii) migração de leucócitos para o tecido injuriado. A histamina e a 5-hidroxitriptamina são usualmente responsáveis pela resposta imediata da inflamação em ratos, enquanto que as cininas e as prostaglandinas seriam responsáveis pela resposta tardia (Di Rosa et al., 1971; Goetzel, 1980). A principal evidência de que a histamina e a 5-hidroxitriptamina sejam os mediadores da resposta imediata no tecido lesado é que o edema pode ser suprimido nas duas primeiras horas pelo uso de antagonistas farmacológicos destas substâncias (Wilhelm, 1977). Já as drogas tipo aspirina inibem o processo inflamatório em estágios associados com a liberação de prostaglandinas e migração de leucócitos dos vasos sanguíneos do tecido lesado (Di Rosa et al., 1972).

EHB reduziu marcadamente a permeabilidade vascular induzida por PGE_2 , como também aquela induzida pela histamina e 5-hidroxitriptamina, mas não o aumento de permeabilidade induzido por bradicinina. Esses resultados sugerem

uma efetiva participação de EHB sobre os mediadores da fase primária ou imediata da resposta inflamatória, além de alguma participação nas fases mais tardias devido à inibição da PGE₂, mas não da bradicinina. Estes resultados foram suportados, em parte, pelo ensaio de algesia onde Fr.EtOH, mas não EHB, ambos administrados oralmente, apresentou uma pequena redução, não significativa, nas contorções induzidas por ácido acético. Entretanto, Fr.EtOH só foi testada na dose de 100 mg/kg, enquanto que a dipirona magnesiana, ativa neste modelo, foi testada a 200 mg/kg, pela mesma via.

No teste de granuloma *cotton pellet*, um outro modelo utilizado para a pesquisa de agentes antiinflamatórios, EHB e diclofenaco sódico mostraram ser equivalentes em inibir a fase transudativa do granuloma, mas somente o diclofenaco sódico inibiu a fase proliferativa. Esses dados reforçam a hipótese da maior participação de EHB sobre os mediadores envolvidos com a resposta imediata da inflamação em ratos, ou seja, o efeito de EHB pareceu apresentar pouco efeito sobre os eventos que envolvem a migração celular tardia para o sítio lesado. Para confirmar esta última hipótese, não EHB, mas sua fração (Fr.EtOH) foi testada no ensaio de exsudato peritoneal.

É sabido que os leucócitos são os principais responsáveis pelo sistema de defesa do organismo. Esse sistema de defesa apresenta uma fase não específica, com a atuação de granulócitos e macrófagos e uma específica, onde atuam os linfócitos. Os granulócitos, quando estimulados por microorganismos ou por LPS, liberam compostos citotóxicos que lesam os mesmos, promovendo a quimiotaxia das células de defesa do organismo para o local da injúria. Para uma proteção eficiente, as células do sistema imune circulam como células não aderentes no sangue periférico e linfonodos, e migram para o tecido como células aderentes, quando necessário (Weissman & Cooper, 1993).

A produção de moléculas inflamatórias, tais como IL-1, TNF ou IFN e a indução de moléculas de adesão, como a P- e E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 podem ser suficientes para recrutar, de forma maciça, os leucócitos para o sítio inflamatório (Imhof & Dunon, 1995). Deste modo, um mecanismo de ação antiinflamatório interessante seria aquele em que a substância teste pudesse de algum modo impedir a síntese e/ou antagonizar os efeitos destas moléculas inflamatórias.

Por esta razão e devido a importância da migração dos leucócitos para a cavidade peritoneal, local onde LPS e Fr.EtOH de *T. ulmifolia*, foram administrados, foi avaliada a influência da administração aguda de ambos sobre os parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos.

Nenhuma alteração relativa aos perfis numéricos totais eritrocitário e leucocitário foram evidenciadas quando foram comparados os resultados obtidos para Fr.EtOH e PBS; entretanto, a administração de LPS, um agente quimiotático de leucócitos, produziu uma redução do número de leucócitos circulantes. Na contagem diferencial dos leucócitos do sangue periférico foi detectada uma diminuição significativa do número de basófilos nos animais tratados com Fr.EtOH; esta redução, entretanto, não alterou a contagem total pois este tipo celular compõe apenas de 0 a 1% dos leucócitos totais do sangue. A redução observada no número total de leucócitos dos animais tratados com LPS ocorreu, principalmente, devido a uma diminuição no número de linfócitos, verificada na contagem diferencial.

A análise dos resultados obtidos no estudo do exsudato peritoneal demonstrou que enquanto LPS, como era previsto, aumentou o número de leucócitos no exsudato peritoneal (às custas do aumento do número de linfócitos e de monócitos), Fr.EtOH inibiu, de modo estatisticamente significante e dose-dependente, a migração de leucócitos para o peritônio. Esta diminuição ocorreu

principalmente devido a uma redução no número de linfócitos e neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal. Deste modo, Fr.EtOH de *T. ulmifolia* parece interferir com a migração primária de células para o sítio inflamatório, denotando uma atividade antiinflamatória relacionada também à inibição da migração celular. Estes resultados contrariam a hipótese sugerida a partir dos dados obtidos no ensaio do granuloma *cotton pellet*, embora neste modelo os efeitos de Fr.EtOH não tenham sido investigados.

Por outro lado, drogas antiinflamatórias não esteroidais induzem lesões gástricas pela inibição da atividade da enzima ciclooxigenase (Brooks & Day, 1991). A pesquisa com drogas antiinflamatórias que não apresentem este efeito colateral tem sido intensificada nos últimos anos (Mitchell et al., 1994; Smith et al., 1994; Vane & Botting, 1995). Por esta razão, os efeitos de EHB de *T. ulmifolia* foram estudados sobre o estômago. Seus efeitos foram comparados com aqueles da aspirina (Hematti et al., 1973) com a finalidade de avaliar se EHB seria capaz de potencializar as lesões gástricas induzidas pela aspirina. EHB, administrado oralmente, não potencializou as lesões gástricas induzidas pela aspirina, pelo contrário, EHB reduziu, de modo estatisticamente significativo e dose-dependente, as lesões gástricas do antiinflamatório não esteroidal.

Além disto, como os estômagos de animais tratados com EHB e Fr.EtOH apresentaram-se totalmente normais em todos os modelos de inflamação onde estas preparações foram oralmente administradas e, como os resultados do ensaio de permeabilidade vascular indicaram marcada inibição sobre os efeitos da PGE₂, decidiu-se por investigar melhor a atividade antiulcerogênica exibida por EHB no modelo de lesões gástricas induzidas pela aspirina. Deste modo, resolveu-se testar os efeitos de EHB e Fr.EtOH sobre as lesões gástricas induzidas por outro antiinflamatório não esteroidal, a indometacina, um inibidor

da síntese de PGE₂ no estômago. Neste modelo, EHB e Fr.EtOH, apresentaram efeito idêntico a aquele obtido para EHB no modelo da aspirina.

Assim, prosseguir na investigação do efeito antiulcerogênico de EHB e Fr.EtOH da *T. ulmifolia* foi considerado importante por várias razões: (i) um antiinflamatório ideal é aquele que não produz danos à mucosa gástrica (Vane & Botting, 1995), (ii) das folhas da espécie vegetal *Turnera diffusa* foram isolados alguns flavonoides como a arbutina e, das partes aéreas, a gonzalitosina (Dominguez & Hinojosa, 1976); embora alguns flavonoides exibam ações antiinflamatórias e antiulcerogênicas (Parmar & Ghosh, 1981), combinações dessas propriedades não são usuais, mas são desejáveis, (iii) em uma triagem fitoquímica preliminar da *T. ulmifolia* havia sido detectada a presença de dois flavonoides, com atividade antiinflamatória, como componentes majoritários de EHB e Fr.EtOH.

EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia* inibiram as lesões gástricas induzidas por ligadura do piloro (Shay et al., 1945), etanol (Morimoto et al., 1991) e indometacina (Hayden et al., 1978), além da inibição produzida por EHB sobre aquelas induzidas por aspirina (Hematti et al., 1973); entretanto, nem EHB nem Fr.EtOH foram capazes de produzir inibição sobre as lesões produzidas por estresse por imobilização e frio (Souza-Formigoni, 1991).

Vários mecanismos poderiam estar associados à formação de ulceração ou danos à mucosa gástrica em modelos experimentais utilizados para o estudo de drogas antiulcerogênicas em ratos (Parmar & Ghosh, 1981). Foi descrito que a histamina está envolvida na formação de úlceras por ligadura do piloro e que ela possui um papel importante como mediador da secreção gástrica ácida estimulada pela gastrina, por excitação vagal e por agentes colinérgicos (Glick et al., 1966; Grossman & Konturek, 1974; Rangachari, 1975). Então, o efeito de EHB sobre as lesões gástricas induzidas por ligadura do piloro poderia ser

devido à uma inibição da histamina, a qual foi constatada nos experimentos de permeabilidade vascular. Essa hipótese foi reforçada porque, como a cimetidina (um antagonista dos receptores H_2 histaminérgicos), EHB de *T. ulmifolia* também inibiu o dano gástrico induzido por indometacina, mas não aquele induzido por estresse por imobilização e frio, onde a histamina parece não desempenhar papel importante.

Por outro lado, a estimulação da secreção ácida acentua a secreção de muco e bicarbonato, função conhecida como "citoproteção". As prostaglandinas E_2 e I_2 , que são sintetizadas pela mucosa gástrica, apresentam propriedades citoprotetoras. Como as prostaglandinas podem proteger a mucosa gástrica em animais contra vários agentes ulcerogênicos, foram desenvolvidos análogos estruturais das prostaglandinas. O misoprostol é o principal representante do grupo (Monk & Clissold, 1987). Deste modo, o efeito significativo de EHB e Fr.EtOH sobre a formação de úlceras gástricas induzidas pelo etanol e o aumento da formação de muco da barreira gastroprotetora (Corne et al., 1974) induzido por Fr.EtOH sugeriu um envolvimento adicional de ambos, extrato e fração, com a síntese de prostaglandinas; neste caso, envolvendo um incremento na produção desta substância. Como explicar, no entanto, uma inibição da PGE_2 nos experimentos de permeabilidade vascular e um incremento da sua produção em um tipo determinado de lesão ulcerativa?

Recentemente, ficou claro que existem duas isoenzimas envolvidas na síntese dos endoperóxidos de prostaglandinas (PGH) denominadas PGH-sintetase-1 e -2 ou ainda COX I e II. Ambas catalizam a conversão do araquidonato à PGH_2 , um passo sequencial da formação de prostaciclina e tromboxanos (Smith et al., 1994). A COX I, também chamada constitutiva, está presente nas plaquetas, no endotélio, no rim e no estômago, enquanto que a COX II, também denominada induzida, é produzida a partir de estímulos

inflamatórios sobre macrófagos e células endoteliais, quando estas últimas são tratadas com citocinas e ésteres de forbol (Vane & Botting, 1995).

A COX I tem sido descrita como sítio de ação das drogas antiinflamatórias não esteroidais (Vane & Botting, 1995) e este tipo de drogas poderia ser considerada ideal se inibisse apenas a síntese das prostaglandinas mediada pela COX induzida, mas não pela COX constitutiva (Smith et al., 1994). Já têm sido descritos resultados obtidos com o uso de antagonistas seletivos da COX II em triagens experimentais, tais como o meloxicam e os compostos codificados como SC58125 e BF-389 (Vane & Botting, 1995).

Os resultados obtidos para os experimentos descritos demonstram claramente o efeito inibitório *in vivo* de EHB de *T. ulmifolia* sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida pela PGE₂. Assim, seria possível que os efeitos antiinflamatórios de EHB e Fr.EtOH de *T. ulmifolia*, sem a produção de qualquer dano gástrico, poderiam ser devidos a uma inibição seletiva da ação da COX II (induzida por agentes flogísticos) sem nenhum efeito importante sobre a COX I constitutiva.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Capítulo V

Conclusões

Nos modelos de inflamação utilizados, extrato bruto e fração de *Turnera ulmifolia*, apresentaram marcada atividade antiinflamatória.

A atividade antiinflamatória do extrato bruto e fração de *Turnera ulmifolia* não é acompanhada por lesões da mucosa gástrica; ao contrário, ambos apresentaram ações antiulcerogênicas em vários modelos experimentais de lesões gástricas.

Deste modo, à luz dos dados apresentados, foi possível confirmar, ainda que preliminarmente, as informações populares do uso em inflamação da espécie vegetal *Turnera ulmifolia*. Entretanto, os estudos devem prosseguir no sentido de isolar e identificar os flavonoides glicosilados detectados em EHB e Fr.EtOH, bem como determinar o mecanismo de ação destes compostos.

CAPÍTULO VI

APÊNDICE

Capítulo VI

Apêndice

FITOQUÍMICA

1. Coleta da Amostra Vegetal

No total foram realizadas três coletas da "chanana", todas no município de São Luís, no estado do Maranhão. A primeira ocorreu nos meses de dezembro de 1992 e janeiro de 1993, sendo o peso total do material seco coletado de 1.3 kg de planta seca. Já a segunda coleta ocorreu nos meses de agosto e setembro de 1993 e o peso total do material coletado foi 2.4 kg. A última coleta ocorreu em janeiro de 1994 e o peso total do material coletado foi 1.5 kg de planta seca.

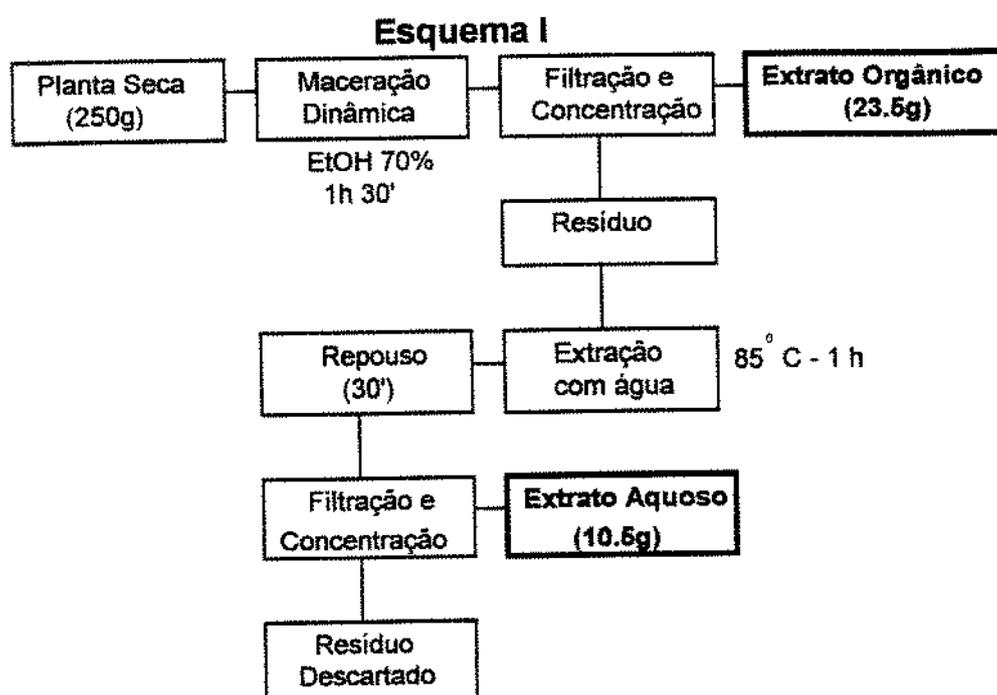
O material coletado compreendeu toda a parte aérea da planta incluindo flor, fruto e semente. A secagem foi feita em estufa a 45°C sob ventilação forçada e o material seco foi, em seguida, pulverizado e submetido a diversos tipos de extração ou processamento.

2. Monitoramento da Atividade Farmacológica

Todos os extratos brutos e frações obtidas a partir do processamento do material vegetal recebido foram submetidos ao monitoramento da atividade farmacológica. Para tanto, foi utilizado o ensaio de edema de pata induzido por carragenina cuja metodologia está descrita no capítulo II. Os resultados são apresentados sequencialmente à descrição do trabalho fitoquímico realizado.

3. Preparação dos Extratos Brutos

A partir da parte aérea da planta foram preparados três tipos de extratos brutos. No primeiro esquema de processamento fitoquímico da amostra vegetal foram pesados 250 g do pó, aos quais adicionou-se 4 litros de uma solução hidroalcoólica 70%, preparando-se deste modo, o extrato orgânico sob maceração dinâmica (1 hora e 30 minutos). Sequencialmente foi preparado um extrato aquoso à quente (1 hora, a 85°C, com posterior repouso de 30 minutos), conforme descrito no Esquema I.



Tanto o extrato orgânico (cujo solvente foi evaporado até secura total), quanto o aquoso (seco em Spray Dryer), foram submetidos a teste farmacológico para monitoramento de atividade biológica.

Na tabela I estão demonstrados os valores de % de inibição do edema, comparando-se o grupo controle com aqueles tratados com extratos e diclofenaco sódico no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos.

Tabela I. Efeitos dos extratos orgânico e aquoso de *Turnera ulmifolia* e do diclofenaco sódico no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão de 10 animais.

| Amostra | Dose (mg/kg) | % aumento da pata | % inibição do edema |
|--------------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| Extrato Orgânico | 1000 | 58.6 \pm 3.6 | 10.5 |
| Extrato Aquoso | 1000 | 71.8 \pm 3.1 | 0 |
| Diclofenaco sódico | 5 | 36.7 \pm 2.1* | 43.9 |
| Controle | 10 ml/kg | 65.5 \pm 2.4 | — |

ANOVA, $F(3,36) = 25,09$ $p < 0.001$, Teste de Duncan * $p < 0.001$

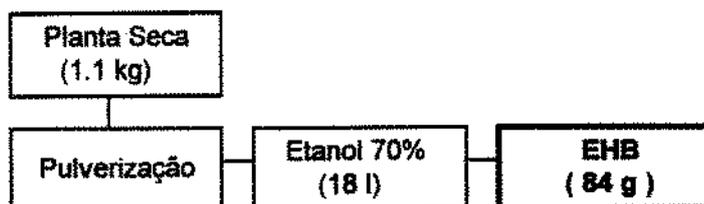
O extrato orgânico de *Turnera ulmifolia* inibiu o edema de pata induzido por carragenina, embora esta inibição não tenha sido estatisticamente significativa, enquanto o extrato aquoso não demonstrou efeito neste modelo experimental.

Um dos procedimentos adotados, na tentativa de melhorar a eficácia do extrato orgânico no modelo experimental de inflamação utilizado, foi preparar um novo extrato utilizando uma sequência de extrações dirigida para uma situação de polaridade intermediária.

Seguiu-se, deste modo, um outro esquema de extração, À à 1.1 kg do pó da parte aérea da planta foram adicionados 18 litros de uma solução hidroalcoólica 70%, preparando-se deste modo, o extrato hidroalcoólico bruto

(EHB), sob maceração dinâmica durante 1 hora e 30 minutos, conforme esquema II. Este extrato também foi submetido a teste farmacológico.

Esquema II



Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela II na qual estão demonstrados os valores de % de inibição do edema, comparando-se grupos controle e tratados com o novo extrato (EHB) e diclofenaco sódico.

Tabela II. Efeito do extrato hidroalcoólico bruto de *Turnera ulmifolia* e do diclofenaco sódico no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão.

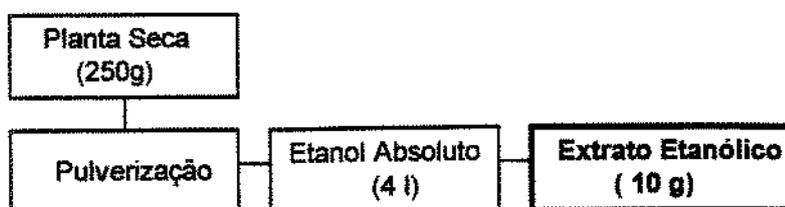
| Amostra | Dose (mg/kg) v.o. | % aumento da pata | % inibição do edema |
|--------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| EHB | 1000 | 58.6 \pm 3.6* | 25.8 |
| Diclofenaco sódico | 5 | 48.8 \pm 4.2** | 38.2 |
| Controle | 10 ml/kg | 79.0 \pm 4.7 | — |

ANOVA, $F(2,27) = 6,21$ $p < 0.01$, Teste de Duncan * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

O procedimento empregado na preparação do extrato hidroalcoólico bruto tornou a inibição do edema estatisticamente significativa, o que não havia ocorrido anteriormente com o extrato orgânico.

Com o objetivo de concentrar o(s) princípio(s) ativos(s) presentes no extrato hidroalcoólico bruto, o passo seguinte foi o de tentativas no sentido de isolar o(s) princípio(s) ativo(s). Para tanto foi preparado um extrato etanólico. À 250 g de planta seca foram adicionados 4 l de etanol absoluto; esta mistura foi submetida à maceração dinâmica por 1 hora e 30 minutos, segundo o Esquema III. Este extrato também foi submetido a teste farmacológico.

Esquema III



Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela III, relacionando-se valores de % de inibição do edema, comparando-se o grupo controle com aqueles tratados com extrato e diclofenaco sódico.

Tabela III. Efeito do extrato bruto etanólico de *Turera ulmifolia* e do diclofenaco sódico no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão de 8 animais.

| Amostra | Dose (mg/kg) v.o. | % aumento da pata | % inibição do edema |
|--------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| Extrato Etanólico | 100 | 33.4 \pm 6.8* | 39.8 |
| Diclofenaco sódico | 5 | 22.3 \pm 2.7* | 59.9 |
| Controle | 10 ml/kg | 55.3 \pm 4.1 | — |

ANOVA, $F_{(2,21)} = 10,48$ $p < 0.001$, Teste de Duncan * $p < 0.01$

O extrato etanólico demonstrou uma atividade quase duas vezes superior ao extrato hidroalcoólico numa dose 10 vezes menor, indicando assim uma elevação da concentração do(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) pela atividade antiedematogênica. Deste modo, encontrou-se uma maneira de melhorar o rendimento dos princípios ativos presentes no extrato hidroalcoólico bruto. No entanto, todo o estudo farmacológico foi realizado com o extrato hidroalcoólico bruto pois seu rendimento foi superior a aquele obtido para o extrato etanólico, conforme pode ser visto no quadro abaixo.

| Amostra | Atividade | Planta Seca (g) | Quantidade do Extrato (g) | Rendimento (%) |
|------------------------|-----------|--------------------|------------------------------|-------------------|
| Extrato Orgânico | + | 250 | 23.5 | 9.4 |
| Extrato Aquoso | - | 250 | 10.5 | 4.2 |
| Extrato Hidroalcoólico | ++ | 1.100 | 84.2 | 7.7 |
| Extrato Etanólico | +++ | 250 | 15 | 6 |

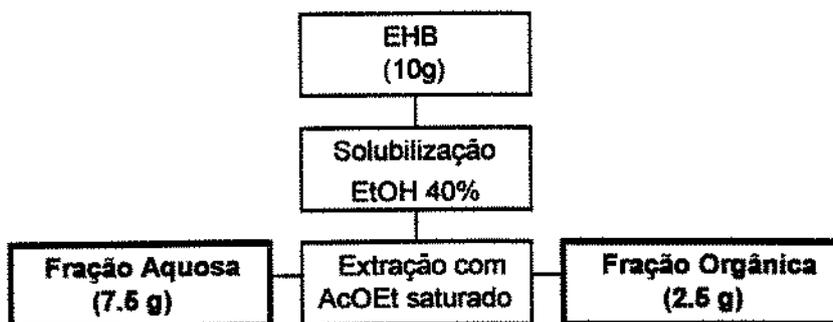
Legenda: (-) inativo; (+) pequena atividade; (++) ativo e (+++) muita atividade

4. Fracionamento dos Extratos Brutos

Para o isolamento do(s) princípio(s) ativo(s) de *Turnera ulmifolia* foram realizados vários tipos de fracionamentos.

Inicialmente decidiu-se fracionar o extrato hidroalcoólico bruto, que havia demonstrado atividade antiedematogênica estatisticamente significativa, numa sequência de extrações dirigidas para uma situação de polaridade intermediária, conforme esquema IV. Deste modo foram obtidas duas frações, uma orgânica e outra aquosa, ambas submetidas ao ensaio de edema de pata por carragenina.

Esquema IV



Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela IV, relacionando-se valores de % de inibição do edema, comparando-se o grupo controle com aqueles tratados com frações e diclofenaco sódico.

Tabela IV. Efeitos das frações orgânica e aquosa obtidas a partir do extrato hidroalcoólico bruto de *Turnera ulmifolia* e do diclofenaco sódico no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão de 9 animais.

| Amostra | Dose (mg/kg) v.o. | % aumento da pata | % inibição do edema |
|--------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| Fração Orgânica | 1000 | 74.3 \pm 7.6 | 6.4 |
| Fração Aquosa | 1000 | 75.5 \pm 4.6 | 4.4 |
| Diclofenaco sódico | 5 | 53.3 \pm 3.4* | 48.2 |
| Controle | 10 ml/kg | 79.0 \pm 4.7 | — |

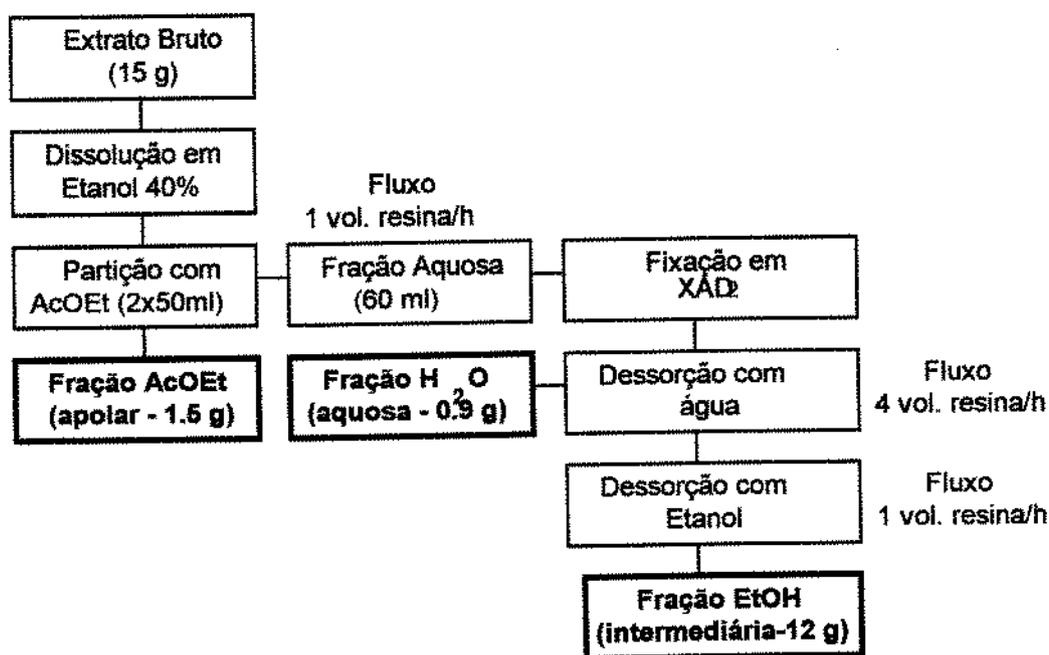
ANOVA, $F(3,32) = 5,04$ $p < 0,01$, Teste de Duncan * $p < 0,05$

Estas frações, entretanto, não apresentaram a mesma atividade que o extrato hidroalcoólico bruto, sendo equivalentes quanto à sua potência, indicando

que o fracionamento empregado não foi eficaz no isolamento do(s) princípio(s) ativo(s).

Portanto, um novo fracionamento foi empregado com a finalidade de encontrar uma fração ativa a partir do mesmo extrato hidroalcoólico bruto (EHB). As frações foram obtidas utilizando-se gradientes de polaridade em resina XAD₂, obtendo-se uma fração apolar, uma polar e de uma polaridade intermediária segundo o Esquema V e estas frações foram testadas farmacologicamente para monitoramento de atividade biológica.

Esquema V



Os dados obtidos estão sumarizados na tabela V, relacionando-se valores de % de inibição do edema, comparando-se o grupo controle com aqueles tratados com frações e diclofenaco sódico.

Tabela V. Efeitos das frações apolar, polar e de polaridade intermediária obtidas a partir do extrato hidroalcoólico bruto de *Turnera ulmifolia* e do diclofenaco sódico no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão de 7 animais.

| Amostra | Dose (mg/kg) | % aumento da pata | % inibição |
|---------------------------------|--------------|-------------------|------------|
| Fração Polar | 100 | 38.9 \pm 5.4* | 25.9 |
| Fração Apolar | 100 | 60.9 \pm 4.4 | 0 |
| Fração Polaridade Intermediária | 100 | 39.5 \pm 5.3* | 24.8 |
| Diclofenaco sódico | 5 | 32.7 \pm 3.5* | 37.7 |
| Controle | 10 ml/kg | 52.5 \pm 4.0 | — |

ANOVA, $F_{(4.30)} = 5,91$ $p < 0.01$, Teste de Duncan * $p < 0.05$

Como a atividade pareceu estar dispersa entre as frações polar e de polaridade intermediária e levando-se em consideração os diferentes rendimentos obtidos para as frações, decidiu-se testar diversas proporções destas frações em ensaio de edema de pata induzido por carragenina, conforme indicado no quadro abaixo.

| Amostra | Fração Polar (%) | Fração de Polaridade Intermediária (%) |
|------------|------------------|--|
| Fração 1:3 | 25 | 75 |
| Fração 1:1 | 50 | 50 |
| Fração 3:1 | 75 | 25 |

Os resultados obtidos no ensaio de edema de pata induzido por carragenina estão demonstrados na tabela VI, relacionando-se valores de % de inibição do edema, comparando-se o grupo controle com aqueles tratados com frações e diclofenaco sódico.

Tabela VI. Efeitos das frações obtidas através da mistura de diversas proporções das frações polar e de polaridade intermediária do extrato hidroalcoólico bruto de *Turnera ulmifolia* e do diclofenaco sódico no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados são a média \pm erro padrão de 8 animais.

| Amostra | Dose (mg/kg) | % aumento da pata | % inibição |
|--------------------|--------------|-------------------|------------|
| Fração 1:3 | 100 | 48.4 \pm 5.9 | 13.6 |
| Fração 1:1 | 100 | 43.4 \pm 5.5* | 22.5 |
| Fração 3:1 | 100 | 52.4 \pm 4.9 | 6.4 |
| Diclofenaco sódico | 5 | 40.8 \pm 2.8* | 27.1 |
| Controle | 10 ml/kg | 56.0 \pm 2.7 | — |

ANOVA, $F_{(4,35)} = 1,42$ $p < 0.05$, Teste de Duncan * $p < 0.05$

A atividade antiedematogênica foi mais intensa na fração 1:1, a qual contém concentrações equivalentes das frações polar e de polaridade intermediária. Assim, nos demais modelos experimentais de inflamação realizados, decidiu-se utilizar apenas a fração de polaridade intermediária, codificada como Fr.EtOH, devido ao seu rendimento superior em detrimento da fração polar.

5. Isolamento do(s) Princípio(s) Ativo(s)

A fração de polaridade intermediária (Fr.EtOH) foi submetida a Cromatografia de Camada Delgada (CCD), sendo detectadas duas substâncias em concentrações relevantes. Entretanto, com as técnicas disponíveis em nosso laboratório fitoquímico, tais como extração líquido-líquido utilizando vários solventes, fracionamento em sílica gel e em C_{18} , lixiviação e cristalização, não foi possível a separação dessas duas substâncias químicas identificadas, devido à alta polaridade das mesmas.

Assim, Fr.EtOH foi submetida a *screening* fitoquímico observando-se uma reação positiva para flavonoide. Devido à polaridade da fração, sugeriu-se que tais flavonoides sejam conjugados a açúcares ou moléculas de glicose. Tais substâncias têm sido implicadas em distintos tipos de atividade farmacológica, incluindo atividade antiinflamatória (Kinghorn & Balandrin, 1993; Parmar & Ghosh, 1981).

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo VII

Referências Bibliográficas

- Asprey, G.F. & Thornton, P. Medicinal plants of Jamaica. Part IV. **West Indian Med. J.**, 4: 145-165, 1955.
- Auterhoff, H. & Haeufel, H.P. Contents of Damiana drugs. **Arch. Pharm.**, 301: 537, 1968a.
- Auterhoff, H. & Haufel, H.P. Constituents of the drug Damiana. **Arch. Pharm.**, 301: 537, 1968b.
- Ayensu, E.S. Medicinal plants of the west indies. **Manuscript**, 110p., 1978.
- Barata, L. Plantas Medicinais da Amazônia. **Boletim apresentado à Fundação Brasileira de Plantas Medicinais**, Ano 7, nº 9, 1991.
- Barros, G.S.G.; Matos, F.J.A.; Vieira, J.E.V.; Souza, M.P. & Medeiros, M.C. Pharmacological screening of some brazilian plants. **J. Pharm. Pharmacol.**, 22:116, 1970.

- Basile, A.C., Sertié, J.A.A., Panizza, S., Oshiro, T.T., Azzolini, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **J. Ethnopharmacol.**, **30**: 185-197, 1990.
- Bazan, N.G. A signal terminator. **Nature**, **374**: 501-502, 1995.
- Braquet, P.; Touqui, L.; Shen, T.Y.; Vargaffig, B.B. Perspectives in platelet-activating factor research. **Pharmacol. Rev.**, **39**: 97-145, 1987.
- Brooks, P.M., Day, R.O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs - differences and similarities. **N. Engl. J. Med.**, **324**: 1716-1725, 1991.
- Brown, K.A. & Collins, A.J. In vitro effects of drugs on human polymorphonuclear cells and lymphocyte migration. **Br. J. Pharmacol.**, **64**: 347-352, 1978.
- Chatenoud, L. & Bach, J.F. Inflammation et rejet. **Nephrologie**, **11(4)**:189-93, 1990.
- Cingi, M.R., De Angelis, I., Fortunati, E. & Reggiani, D. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicol. In Vitro**, **5(2)**: 119-125, 1991.
- Coltren, H.R. Tissue-specific regulation of inflammation. **J. Appl. Physiol.**, **72(1)**:1-7, 1992.
- Corne, S.J.; Morrissey, S.M. & Woods, R.J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol. Lond.**, **242**: 116-117p., 1974.
- Cingi, M.R.; De Angelis, I.; Fortunati, E. & Reggiani, D. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxic. In Vitro**, **5(2)**: 119-125.
- Cotran, R.S. & Pober, J.S. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **1(3)**: 225-35, 1990.
- Cotran, R.S.; Kumar, V. & Robbins, S.L. In: *Pathologic Basis of Disease*. 4th Ed. Philadelphia, Saunders, p. 39-71, 1989.

- Cragg, G.M., Schepartz, S.A., Suffness, M., Grever, M.R. The taxol supply crisis: new NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **J. Nat. Prod.**, **56**: 1657-1668, 1993.
- Di Rosa, M.; Papadimitriou, J.M. & Willoughby, D.A. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of non-steroidal-antiinflammatory drugs. **J. of Path.**, **105**: 329-356, 1971.
- Di Rosa, M. Biological properties of carragenin. **J. Pharm. Pharmac.**, **24**: 89-102, 1972.
- Dinarelo, C.A. Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism. **Blood**, **77**(8): 1627-1652, 1991.
- Dominguez, X.A. & Hinojosa, M. Mexican medicinal plants. XXVIII. Isolation of 5-hydroxy-7.3'.4'-trimethoxy-flavone from *Turnera diffusa*. **Planta Med.**, **30**: 68, 1976.
- Falus, A. & Merétey, K. Histamine: an early messenger in inflammatory and immune reactions. **Immunology Today**, **13**(5): 154-6, 1992.
- Freise, F.W. The occurrence of caffeine in Brazil medicinal plants. **Pharm. Zentralhalle Dtschl.**, **76**: 704-706, 1935.
- Fryer, F.A. A chemical investigation of Damiana (*Turnera diffusa*). **Specialites**, **112**: 21, 1965.
- Garcia-Barriga, H. Flora medicinal de Colombia. Vol. 2/3. Universidad Nacional. Bogota, 1975.
- Gilligan, J. P., Lovato, S.J., Erion, M.D., Jeng, A. Y. Modulation of carrageenan-induced hinf paw edema by substance P. **Inflammat.**, **18**(3), 285-292, 1994.
- Glick, D., Von Redlich, D., Levine, S., Jones, L. Effect of adrenal stimulation on histamine in the rat stomach. **Gastroenterology**, **51**, 18-23, 1966.
- Goetzel, E.J. Mediators of immediate hypersensitivity derived from arachidonic acid. **N. Engl. J. Med.**, **303**: 822-825, 1980.

- Goulding, N.J. & Guyre, P.M. Regulation of inflammation by lipocortin 1. **Immunology Today**, **13**(8): 295-298, 1992.
- Grossman, N.I., Konturek, S.J. Inhibition of acid secretion in dog by metiamide, a histamine antagonist acting on H₂ receptors. **Gastroenterology**, **66**, 517-520, 1974.
- Hayden, L.J.; Thomas, G. & West, G.B. Inhibitors of gastric lesions in the rat. **J. Pharm. Pharmac.**, **30**: 244-246, 1978.
- Hematti, H.; Rezvani, A. & Djahanguiri, B. Prevention of aspirin induced ulceration in rats with α -methyldopa and disulfiram. **Pharmacology**, **9**: 374, 1973.
- Hogg, N. Roll, roll, roll your leucocyte gently down the vein. **Immunology Today**, **13**(4): 113-115, 1992.
- Hosamani, K.M. Fatty acids in seed oil from *Turnera ulmifolia*. **Phytochemistry**, **345**: 1363-1365, 1993.
- Houghton, P.J. The biological activity of valerian and related plants. **J. Ethnopharmacol.**, **22**: 121-142, 1988.
- Imhof, B.A. & Dunon, D. Leucocyte migration and adhesion. **Advances in Immunology**, **58**: 345-416, 1995.
- Ishikura, N. Flavonol glycosides in the flowers of *Hiiscus mutabilis* v. *versicolor*. **Agr. Biol. Chem.**, **46**: 1705-1706, 1982.
- Jastela, M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- α /cachectin. **Lab. Invest.**, **64**(6): 724-742, 1991.
- Kinghorn, A.D. & Balandrin, M.F. Human medicinal agents from plants. **Am. Chem. Soc. Symp. Ser.**, **534**: 1-348, 1993.
- Kleijnen, J. & Knipschild, P. *Ginkgo biloba*. **Lancet**, **340**: 1136-1139, 1992.
- Koch, L. Drug collection from Bolivia. Systematically, anatomically and chemically examined. **Arch. Pharm.**, **274**: 343-369, 1936.

- Koster, R.; Anderson, M. & De Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** **18**, Abstract p. 412, 1959.
- Krag, K.J. Plants used as contraceptives by the North American Indians. An ethnobotanical study. **Thesis-BS-Harvard University**, 117p., 1976.
- Lasky, L.A. Lectin cell adhesion molecules (LEC-CAMs): a new family of cell adhesion proteins involved with inflammation. **J. Cell. Biochem.**, **45**:139-146, 1991.
- Litchfield Jr., J.T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **96**: 99-113, 1949.
- Mantovani, A. & Dejana, E. Cytokines as communication signals between leucocytes and endothelial cells. **Immunology Today**, **10**(11): 370-375., 1989.
- Mazella, A.A.G., Oliveira, A.A.M., Silva, F.B., Caldeira, T.T.O. & Sertié, J.A.A. Atividade antiinflamatória tópica de *Cordia verbenacea* (CV) e sua toxicidade. **Anais da VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumo 06.33, p.284, 1991.
- Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J., Vane, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 11693 -11697, 1994.
- Monk, J.P. & Clissold, S.P. Misoprostol: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. **Drugs**, **33**: 1-30, 1987.
- Morimoto, Y.; Shimohara, K.; Oshima, S. & Sukamoto, T. 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. **Japanese Journal of Pharmacology**, **57**, 495-505, 1991.

- Morley, J. Platelet - activating factor. In: **Textbook of Immunopharmacology**. Dale, M.M.; Foreman, J.V. (eds.). 2nd edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford, **16**: 186-195, 1989.
- Nakanishi, K.; Sasaki, S.I.; Kiang, G.O.H.; Kakisawa, H.; Ohashi, M.; Goto, M.; Watanabe, J.M.; Yokotani, H.; Matsumura, C. & Togashi, M. Phytochemical survey of Malaysian plants. Preliminary chemical and pharmacological screening. **Chem. Pharm. Bull.**, **13**: 882-890, 1965.
- Nascimento, S.C.; Chiappeta, A.A. & Lima, R.M.O.C. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, **614**: 353-355, 1990.
- Nemerson, Y. Tissue factor and hemostasis. **Journal of American Medical Society of Hematology**, **71**: 1-8, 1988.
- Nossal, G.J.V. The basic components of the immune system. **N. Engl. J. Med.**, **316**: 1320-1325, 1987.
- Parmar, N.S. & Ghosh, M.N. Gastric anti-ulcer activity of (+)-cyanidanol-3, a histidine decarboxylase inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, **69**: 25-32, 1981.
- Pereira, A.P.B., Silva, P.M.R., Cordeiro, R.S.B. & Martins, M.A. Efeito da yangambina na contração do jejuno isolado de rato: influência na resposta anafilática. **Anais da X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumo 16.31, p.244, 1995.
- Perez, R.M.; Ocegueda, G.A.; Munoz, J.L.; Avila, J.G. & Morrow, W.W. a study of the hypoglucemic effect of some Mexican plants. **J. Ethnopharmacol.**, **123**: 253-262, 1984.
- Perretti, M. & Flower, R.J. Modulation of IL-1 induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. **J. of Immunology**, **150**: 992-999, 1993.

- Phillipson, J.D., Wright, C.W., Kirby, G.C., Warhurst, D.C. Tropical plants as sources of antiprotozoal agents. In: Downum, K.R., Romeo, J.T., Stafford, H.A., eds. New York: Plenum, 1-40, 1993.
- Popper, T.L. & Watnick, A.S. In: **Antiinflammatory agents - Chemistry and pharmacology**. Academic Press, London, Eds. R.A. Scherrer and M. Whitehouse, 1: 245-290, 1974.
- Rangachari, P.K. Histamine release by gastric stimulants. **Nature (London)**, **253**, 53 - 55, 1975.
- Roig, J.T. In: Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba. Ministerio de Cultura Editorial Científico-Técnica. El Vedado. Havana. Volume 2, 633-635, 1988.
- Roig, Y. & Mesa, J.T. In: Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba. Ministerio de Agricultura. Republica de Cuba. Havana. 872p., 1945.
- Schiantarelli, P.; Cadel, S.; Acerbi, D. & Pavesi, L. Antiinflammatory activity and bioavaiiability of percutaneous piroxican. **Arzneim. Forsch / Drug Research**, **32(3)**: 230-235, 1982.
- Sertié, J.A.; Basile, A.C.; Panizza, S.; Matida, A.K. & Zelnik, R. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, **56**:36-40, 1990.
- Shay, H.; Komarov, S.A.; Fels, S.S.; Meranze, D.; Gruenstein, M. & Siple, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, **5**: 43-61, 1945.
- Shore, J.S. & Obrist, C.M. Variation in cyanogenesis within and among populations and species of *Turnera* series *Canaligeræ* (Turneraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, **20**: 9-15, 1992.
- Siegmund, E.; Cadmus, R. & Lu, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **95**, 729-731, 1957.

- Singh, B., Gambhir, S.S., Pandey, V.B., Joshi, V.K. Anti-inflammatory activity of *Echinops echinatus*. **J. of Ethnopharmacol.** **25**: 189-199, 1989.
- Smith, W.L.; Meade, E.A. & DeWitt, D.L. (1994) - Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. **Annual New York Academic Science**, **714**: 136-42.
- Souza Brito, A.R.M. & Souza Brito, A.A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **J. of Ethnopharmacol.** **39**: 53-67, 1993.
- Souza Brito, A.R.M. (1994) - In: **Manual de Ensaio Toxicológicos "In Vivo"**. Editora Três, 122 p.
- Souza-Formigoni, M.L.O., Oliveira, M.G., Monteiro, M.G., Silveira-Filho, N.G., Braz, S. & Carlini, E.A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. of Ethnopharmacol.** **34**: 21-27, 1991.
- Spector, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **J. of Pathol. Bacteriol.** **72**: 367-373, 1956.
- Spencer, K.C. & Seigler, D.S. Deidaclin from *Turnera ulmifolia*. **Phytochemistry**, **19**: 1863-1864, 1980.
- Swingle, K.F. & Shideman, F.E. (1972) - Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and their modification by certain antiinflammatory drugs. **J. Pharm. Exp. Ther.** **183**: 226-234.
- Szelenyi, I. & Thiemer, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch. Toxicol.**, **41**: 99-105, 1978.
- Tantisewie, B.; Ruijgrok, H.W.L. & Hegnauer, R. The distribution of hydrocyanic acid in the cormophytes v. on cyanogenic compounds in the parietales and in some others families. **Pharm. Weekbl.**, **104**: 1341, 1969.
- Tarab, J.L. & Patil, K.J. Qualitative and quantitative estimation fo caffeine in *Turnera ulmifolia*. **Indian J. Bot.**, **21**: 118-119, 1979.

- Teixeira, L.G.M., Cunha, G.M.A., Matos, M.E.O., Silva, J.C.R., Rao, V.S.N. Efeitos da fração purificada da *Wilbrandia verticillata* na lesão granulomatosa induzida pelo óleo de cróton em ratos. **Anais da IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumo 6.04, p.193, 1994.
- Tober, I. & Conn, E.E. cyclopentenylglycine. A precursor of deidaclin in *Turnera ulmifolia*. **Phytochemistry**, **246**: 1215-1218, 1985.
- Vane, J.R., Botting, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, **44**(1), 1-10, 1995.
- Verpoorte, R. Some phytochemical aspects of medicinal plant research. **J. of Ethnopharmacol.**, **25**: 43-59, 1989.
- Vieira, J.E.V.; Barros, G.S.G.; Medeiros, M.C.; Matos, F.J.A.; Souza, M.P. & Medeiros, M.J. Pharmacologic screening of plant from northeast Brazil. **Rev. Brasil. Farm.**, **49**: 67-75, 1968.
- Wall, M.E.; Wani, M.C.; Hughes, T.J. & Taylor, H. Plant antimutagenic agents. 1. General bioassay and isolation procedures. **J. Nat. Prod.**, **515**: 866-873, 1988.
- Warshafsky, S., Kramer, R.S., Sivak, S.L. Effect of garlic on total serum cholesterol: a meta-analysis. **Ann. Inter. Med.**, **119**: 599-605, 1993.
- Weissman, I.L. & Cooper, M.D. How the immune system develops. **Sci. Am.**, **269**(3): 33-39, 1993.
- Wei, X., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., FEng, G., Huang, F., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. & Liew, F.Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide syntase. **Nature**, **375**: 408-411, 1995.
- Weniger, B.; Rouzier, M.; Daguilh, R.; Henrys, D.; Henrys, J.H. & Anton, T. Popular medicine of the Central Plateau of Haiti. 2. Ethnopharmacological inventory. **J. Ethnopharmacol.**, **171**: 13-30, 1986.

- WHO Regional Office for the Western Pacific. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila: WHO, 1993.
- Wilhelm, D.L. Inflammation and healing. In: PATHOLOGY. 7 ed. Eds. W.A.D. Anderson, J.M. Kissane. Saint Louis, Mosby, p. 25-89, 1977.
- Winter, C.A.; Risley, E.A. & Nuss, G.W. Carrageenin induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. of the Soc. Exp. Biol.**, 3: 544-547, 1962.

SUMMARY

Summary

Turnera ulmifolia L. from the Turneraceae family is popularly known as "chanana". It's a yellow flowered shrub found in the northeast states of Brazil. This plant is used by the natives for treatment of inflammatory disorders. Based on this knowledge the inflammatory properties of crude hydroalcoholic extract (CHE) and the active fraction (Fr.EtOH) of this plant were studied using a wide range of inflammation models. Acute toxicity assays using oral ($DL_{50} > 15$ g/kg) and intraperitoneal ($DL_{50} = 7.8$ g/kg) administration of CHE weren't toxic to animals proving to be almost harmless. In carrageenin-induced rat paw edema assays CHE (1g/kg, po) and Fr.EtOH (100 mg/kg, po) revealed dose-dependent inhibition effect. The highest response were obtained three hours after flogist agent treatment, with about 30% of inhibition. The ED_{50} value of

Fr.EtOH was calculated as being 150 mg/kg. CHE (1 g/kg, po) remarkably lowered the induced vascular permeability increase by prostaglandin E₂ (34%), histamine (54%) and 5-hydroxytryptamine (79%), but not the increase induced by bradykinin, whereas sodium diclofenac (5 mg/kg, po) diminished the induced vascular permeability in all this inflammatory mediators, with inhibition of 46, 63, 88 and 61%, respectively. Cotton pellet granuloma assay of both CHE (1 g/kg, po) and sodium diclofenac (5 mg/kg, po) showed the same inhibition of the transudative phase (57 and 54%, respectively), but only sodium diclofenac inhibited the proliferative phase (64%). The acute administration of Fr.EtOH (5 mg/kg, ip) on hematological peripheric blood and peritoneal exudate parameters were evaluated. No alterations on total number of eritrocytes and leucocytes of peripheral blood were observed, however leucocyte diferential count detected basophils increase (80%). The results from the peritoneal exudate assay showed that Fr.EtOH inhibited in a dose-dependent manner the leucocyte migration toward the peritoneal cavity. This reduction was caused mainly by the decrease on the number of linphocytes (78%) and neutrophils (57%) migrating to the peritoneal cavity. However, when comparing antiinflammatory versus ulcerogenic activity, CHE (1 g/kg, po) didn't potentialize gastric mucosas lesions caused by aspirin, instead produced 67% of ulcerative lesion inhibition (ILU). CHE (1 g/kg, po) and Fr.EtOH (100 mg/kg, po) inhibited gastric induced lesions by pylorus ligation (79 and 82%), with absolute ethanol (1 ml/animal, po) 60 and 55%, those induced by indomethacin (30 mg/kg, sc) were inhibited by 51 and 57%. However, neither CHE or

Fr.EtOH were able to inhibited gastric lesions caused by hypotermic-restraint stress. Gastric barrier mucus formation increased by Fr.EtOH (100 mg/kg, po) in 38%, carbenoxolone (200 mg/kg, po) also raised the mucosa barrier about 42%. Fr.EtOH (100 mg/kg, po) didn't reduced abdominal writhing induced by acetic acid, whereas magnesion dipirone decreased in 90% the abdominal writhing. Both CHE and Fr.EtOH showed antiinflammatory activity in several experimental models, therefore confirming, preliminarely, the activity of *Turnera ulmifolia* mentioned by natives.