

FABIANA DE OLIVEIRA PIMENTEL

**Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied.
e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução
de úlcera gástrica.**

Campinas
2006

FABIANA DE OLIVEIRA PIMENTEL

**Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied.
e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução
de úlcera gástrica.**

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

Orientadora Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito



Campinas
2006

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

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

P649a Pimentel, Fabiana de Oliveira
Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied.e *Byrsonima fagifolia* Nied.em modelos de indução de úlcera gástrica. / Fabiana de Oliveira Pimentel. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

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

1. Úlcera gástrica. 2. Flavonóides. 3. Atividade antioxidante.
4. Radicais livres. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título em ingles: Antioxidant activity of *Byrsonima crassa* Nied. and *Byrsonima fagifolia* Nied. in induced gastric lesions experimental models.

Keywords:

- **Gastric ulcer**
- **Flavonoids**
- **Antioxidant activity**
- **Free radicals**

Área de Concentração: Farmacologia

Titulação: Mestrado

Banca examinadora: Prof^a.Dr^a. Alba Regina Monteiro Souza Brito; Prof^a.Dr^a. Ana Beatriz Albino de Almeida; Prof^o Dr^o Miguel Arcanjo Areas.

Data da defesa: 21 - 08 - 2006



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Profa. Dra. Ana Beatriz Albino de Almeida

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

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

Data:

21/08/2006

Dedicatória

*Aos meus pais, Carlos e Emília, por todo o amor, o respeito e amizade que sempre foram cultivadas em nossa família.
A minha irmã por ser um exemplo de vida para mim e por ter me presenteado com a maior riqueza deste mundo, meu sobrinho Henrique.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito por ter me acolhido como orientadora, apesar dos meus inúmeros gerúndios e por ter me mostrado que podemos ser muitos dentro de um só, sem jamais perder o encanto.

À Dra. Elisângela Farias Silva pela imprescindível ajuda na elaboração deste projeto.

Ao Prof. Dr. Wagner Villegas e a Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima pelas inúmeras dicas que me foram dadas.

À Dra. Miriam Sannomiya por ter sido sempre tão prestativa e atenciosa comigo.

À Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes por ter me permitido usar inúmeras vezes seu laboratório.

Ao meu querido Prof. Dr. Antonio Martins de Siqueira (Tonhão) da minha inesquecível EFOA por ter me aberto as portas para o mundo científico.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas e Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka pela rica participação na minha banca de qualificação.

Aos colegas do laboratório de Produtos Naturais: Ana Bia, Anderson, Aninha, Ana Carolina, Cibele, Cinza, Deborinha, Déborah, Demétrio, Elis, Érika, Lulu Magri, Maíra, Pati, Priscila, Rangel, Ricardo, Tati, Vinicius, Vitão... não poderia jamais deixar de ressaltar a importância que vocês tiveram na construção deste sonho.

Aos melhores amigos que alguém poderia ter na vida: Amanda, Sara, Sabrina, Mara, Reges, Rafa, Xande, Carol, Caroline e Mônica

A minha querida Cidinha (Sobrapar) pela cumplicidade, respeito e amizade.

Ao Dionysio por fazer os meus dias mais felizes.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia (Alexandra, Lécio, Ivo, Lú, Zefa) e aos alunos dos laboratórios 14 e 15 pelas inúmeros “quebra-galhos” e amizade.

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

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

Um dia você aprende que...

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar a alma.

E você aprende que amar não significa apoiar-se e que companhia nem sempre significa segurança.

E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas

E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os nossos planos e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.

E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam...

E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

E aprende que falar pode aliviar dores emocionais.....

E descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la.

E percebe que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrependará pelo resto da vida...

E aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

E descobre que devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pois pode ser a última vez que as vejamos....

E aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

E começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.

E descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser....e

que o tempo é curto.

E aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo....mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve.

E aprende que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existirão dois lados.....

E descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

E aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiências que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou.

E aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não lhe dá o direito de ser cruel.

E descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não sabe amar... pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.

E aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes, você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo.

E aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

E aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores...

(Autor desconhecido)

“...Nossas dúvidas são traidoras
e nos fazem perder o bem que poderíamos
conquistar, se não fosse o medo de tentar...”

Willian Shakespeare

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas _____	XXIII
Lista de Fluxograma, Figuras e Tabelas _____	XXIX
Resumo _____	XXXV
Abstract _____	XXXVII
1. INTRODUÇÃO _____	39
Radicais Livres _____	39
Defesas Antioxidantes _____	42
Trato Gastrointestinal _____	45
Mecanismos de Proteção do Estômago _____	46
Úlcera Gástrica _____	47
Indução de Úlcera por etanol absoluto _____	49
Indução de Úlcera por isquemia e reperfusão _____	51
Plantas Medicinais _____	55
Flavonóides _____	59
Malpighiaceae _____	63
<i>Byrsonima crassa</i> (Nied) _____	64
<i>Byrsonima fagifolia</i> (Nied) _____	66
2. OBJETIVOS _____	69
3. MATERIAL E MÉTODOS _____	70
Preparo do material vegetal _____	70
Coleta das espécies em estudo _____	70
Preparo dos Extratos _____	70
Animais utilizados em ensaios biológicos _____	73
Procedimentos Experimentais _____	73
Indução de Úlcera por administração de etanol _____	74
Indução de Úlcera por isquemia e reperfusão (IR) _____	75
Coleta do homogenato de tecido _____	76
Testes antioxidantes in vivo _____	76
Danos oxidativos de membrana _____	76
Determinação da Peroxidação lipídica (LPO) _____	76

Determinação de Compostos sulfidril (GSH)	77
Atividade Enzimática	77
Atividade da glutathione peroxidase (GPX)	77
Atividade da glutathione reductase (GR)	78
Atividade da superóxido dismutase (SOD)	78
4. RESULTADOS	79
<i>Byrsonima crassa na úlcera por etanol</i>	79
Índice de lesão ulcero (ILU)	79
Testes antioxidantes	80
Danos oxidativos de membrana	80
Determinação da peroxidação lipídica (LPO)	80
Determinação de Compostos sulfidril (GSH)	80
Atividade enzimática	81
Atividade da glutathione peroxidase (GPX)	81
Atividade da glutathione reductase (GR)	81
Atividade da superóxido dismutase (SOD)	82
<i>Byrsonima fagifolia na úlcera por etanol</i>	83
Índice de lesão ulcero (ILU)	83
Testes antioxidantes	84
Danos oxidativos de membrana	84
Determinação da peroxidação lipídica (LPO)	84
Determinação de Compostos sulfidril (GSH)	84
Atividade enzimática	85
Atividade da glutathione peroxidase (GPX)	85
Atividade da glutathione reductase (GR)	85
Atividade da superóxido dismutase (SOD)	86
<i>Byrsonima crassa na úlcera por isquemia e reperfusão</i>	87
Índice de lesão ulcero (ILU)	87
Testes antioxidantes	88
Danos oxidativos de membrana	88

Determinação da peroxidação lipídica (LPO) _____	88
Atividade enzimática _____	89
Atividade da glutathione peroxidase (GPX) _____	89
Atividade da glutathione reductase (GR) _____	89
Atividade da superóxido dismutase (SOD) _____	90
<i>Byrsonima fagifolia</i> na úlcera por isquemia e reperfusão _____	91
Índice de lesão ulcera (ILU) _____	91
Testes antioxidantes _____	92
Danos oxidativos de membrana _____	92
Determinação da peroxidação lipídica (LPO) _____	92
Atividade enzimática _____	93
Atividade da glutathione peroxidase (GPX) _____	93
Atividade da glutathione reductase (GR) _____	93
Atividade da superóxido dismutase (SOD) _____	94
5. DISCUSSÃO _____	95
6. CONCLUSÕES _____	108
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	109
8. REFERÊNCIAS _____	110

LISTA DE ABREVIATURAS

AGP = ácidos graxos polinsaturados

ATP = adenosina trifosfato

ATPase = adenosina trifosfatase

B. crassa = *Byrsonima crassa*

B. fagifolia = *Byrsonima fagifolia*

CAT = catalase

CHCl₃ = clorofórmio

COX = cicloxigenase

DAINES = drogas anti-inflamatórias não esteroidais

dp = desvio padrão

DPPH = 2,2 di-fenil-2-picril-hidrazil

DTNB = 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)

e⁻ = elétron

ECHCl₃ = extrato clorofórmico

EDTA = ácido etilenodiamínio tetra-acético

EmeOH = extrato metanólico

epm = erro padrão da média

ERNS = espécies reativas do nitrogênio

EROs = espécies reativas do oxigênio

FAc = fração acetato de etila

FAq = fração aquosa

GPx = glutathione peroxidase

GR = glutathione reductase

GSH = grupamentos sulfidril
GSSG = glutationa oxidada
H. pilory = *Helicobacter pylori*
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
HNO₂ = ácido nitroso
ILU = índice de lesão ulcerativa
IR = isquemia e reperfusão
KCl = cloreto de potássio
LO· = radical lipídico alcooxil
LOO· = radical lipídico peroxil
LPO = peroxidação lipídica
MDA = malondialdeído
MeOH = metanol
N₂O₃ = óxido nitroso
NaCl = cloreto de sódio
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase
NaOH = hidróxido de sódio
NBT = nitro blue oxidase
NO = óxido nítrico
NO· = alcooxila
NO₂ = nitritos
NO₃ = nitrato
O₂ = oxigênio
·OH = radical hidroxil

O_2^- = radical superóxido

OMS = Organização Mundial de Saúde

$ONOO^-$ = peroxinitritos

PAF = fator de agregação plaquetária

PBS = tampão fosfato tamponado

PG = prostaglandina

RO^\cdot = alcooxila

ROO^\cdot = peroxila

SDS = sulfato de sódio dodecil

SOD = superóxido dismutase

TBARs = reagentes de ácido tiobarbitúrico

Tris = trienzima base

XO = xantina oxidase

LISTA DE FLUXOGRAMA, FIGURAS E TABELAS

Fluxograma 1	Preparo do EmeOH das FAc e FAq de <i>B. crassa</i> e <i>B. Fagifolia</i>	69
Figura 1	Esquema da atividade antioxidante das enzimas antioxidantes frente a ação das radicais livres	42
Figura 2	Visualização anatômica e histológica do estômago	44
Figura 3	Via metabólica para a produção de O ₂ durante o período de reperfusão de tecidos isquêmicos pela conversão da xantina oxidase.	52
Figura 4	Esqueleto básico dos flavonóides	59
Figura 5	Estruturas químicas da FAc de <i>B. crassa</i>	62
Figura 6	Cromatografia de separação por HPLC da FAc de <i>B. crassa</i>	63
Figura 7	Estruturas químicas da FAc de <i>B. fagifolia</i>	64
Figura 8	Cromatografia de separação por HPLC da FAc de <i>B. fagifolia</i>	65
Figura 9	Identificação da artéria celíaca no estômago de rato Wistar	73
Tabela 1	Influência das características químicas dos flavonóides no potencial antioxidante	60
Tabela 2	Rendimento obtido dos extratos clorofórmicos e metanólicos preparados a partir de folhas de <i>B. crassa</i> e <i>B. fagifolia</i>	68

Tabela 3	Rendimento obtido das FAc e FAq de <i>B. crassa</i> e <i>B. fagifolia</i> preparados a partir do EMeOH	68
Tabela 4	Efeito da FAc de <i>B. crassa</i> sobre úlceras gástricas induzidas por etanol	76
Tabela 5	Mecanismos antioxidantes (LPO e GSH) das FAc de <i>B. crassa</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol	77
Tabela 6	Mecanismos antioxidantes (atividade de GPx e GR) da FAc de <i>B. crassa</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol	78
Tabela 7	Mecanismos antioxidantes (atividade da SOD) da FAc de <i>B. crassa</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol	79
Tabela 8	Efeito da FAc de <i>B. fagifolia</i> sobre úlceras gástricas induzidas por etanol	80
Tabela 9	Mecanismos antioxidantes (LPO e GSH) da FAc de <i>B. fagifolia</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol	81
Tabela 10	Mecanismos antioxidantes (atividade de GPx e GR) da FAc <i>B. fagifolia</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol	82

Tabela 11	Mecanismos antioxidantes (atividade da SOD) da FAc <i>B. fagifolia</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol	83
Tabela 12	Efeito da FAc de <i>B. crassa</i> sobre úlceras gástricas induzidas por IR	84
Tabela 13	Mecanismos antioxidantes (LPO) da FAc de <i>B. crassa</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR	85
Tabela 14	Mecanismos antioxidantes (atividade de GPx e GR) da FAc de <i>B. crassa</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR	86
Tabela 15	Mecanismos antioxidantes (atividade da SOD) da FAc de <i>B. crassa</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR	87
Tabela 16	Efeito da FAc de <i>B. fagifolia</i> sobre úlceras gástricas induzidas por IR	88
Tabela 17	Mecanismos antioxidantes (LPO) da FAc de <i>B. fagifolia</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR	89
Tabela 18	Mecanismos antioxidantes (atividade de GPx e GR) da FAc de <i>B. fagifolia</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR	90
Tabela 19	Mecanismos antioxidantes (atividade de SOD) das FAc <i>B. fagifolia</i> envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR	91

RESUMO

A úlcera péptica afeta cerca de 10% da população ocidental. Estudos relatam a participação de espécies reativas do oxigênio (EROs) na etiologia e patofisiologia das doenças humanas; como o processo inflamatório, infecção viral, doenças auto-imunes, doenças gastrointestinais e na úlcera gástrica. Alterações bioquímicas são constatadas durante a formação da úlcera, indicando que os radicais livres estão envolvidos com o processo ulceroso. Na úlcera por etanol ocorre formação de edema, liberação de substâncias vasoativas, infiltração de células inflamatórias e aumento da permeabilidade da mucosa. Há uma maior formação de EROs a partir das células inflamatórias, devido a alterações na cadeia respiratória ou a atividade da xantina oxidase, utilizando acetaldeído como substrato. Na úlcera gástrica por de isquemia e reperfusão, a liberação de EROs é relatada como um evento patológico central, sendo a mesma por si só capaz de provocar lesões no tecido gástrico; entretanto, é após a reperfusão que ocorrem os principais eventos lesivos. Neste trabalho foi avaliada a possível atividade antioxidante da fração acetato de etila (FAc) de *Byrsonima crassa* e *Byrsonima fagifolia* em úlcera induzida por etanol e por isquemia e reperfusão em ratos machos Wistar. Sob nossas condições experimentais, os modelos de indução de úlcera por etanol e por isquemia e reperfusão provocaram alterações no sistema antioxidante da mucosa gástrica de ratos, como nos níveis de grupamentos sulfidríla (GSH), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Também observamos aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) e da concentração de espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARs), como índice de peroxidação lipídica (LPO). As FAc de *B. crassa* e FAc de *B. fagifolia* no modelo de etanol permitiram o restabelecimento dos níveis de GSH, de LPO e da atividade da SOD. Com relação as GPx e GR apenas o tratamento com FAc de *B. crassa* permitiu o seu restabelecimento. O tratamento com FAc de *B. crassa* e FAc de *B. fagifolia* no modelo de isquemia e reperfusão não restabeleceu nenhum dos parâmetros estudados. A atividade antiulcerogênica da FAc de *B. crassa* e *B. de fagifolia* pode estar envolvida com atividade antioxidante através do seqüestro de radicais livres aliado a outros mecanismos de proteção.

ABSTRACT

The gastric ulcer is a pathology that affects about 10% of the world-wide population. There is evidence concerning the participation of reactive oxygen species (ROS) in the etiology and pathophysiology of human diseases, such as inflammation, viral infections, autoimmune pathologies, and digestive system disorders such as gastrointestinal inflammation and gastric ulcer. Studies have shown alterations in the antioxidant status following ulceration, indicating that free radicals seem to be associated with the ethanol-induced and ischaemia-reperfusion-induced ulceration in rats. Ethanol promotes a strong and quick venoconstriction, which is followed by arteriolar dilatation. The oxyradicals generated during the episodes of ethanol can provoke severe changes leading to cell death. In the ischaemia and reperfusion the release of ROS is reported as a central pathological event. Thus, the objective of this work was to evaluate the antioxidant activity of the ethila acetate fraction (FAc) of gross *Byrsonima crassa* Nied. and *Byrsonima fagifolia* Nied. in the induced ulcer by absolute ethanol and ischaemia and reperfusion in male rats Wistar. We observed the reduction of the levels the sulfhydryl compounds (GSH), the increase in the concentration of species that react with the tiobarbitúrico (TBARS), as index of lipid peroxidation (LPO), beyond the reduction in the activity in the activity of glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR.) and increase in superoxide dismutase (SOD). The FAc *B. crassa* and FAc *B. fagifolia* administration in the ethanol induced the reestablishment of the levels of GSH, LPO and activity of the SOD. Regarding to the GPx and GR activities only the treatment with FAc *B. crassa* allowed its reestablishment.

In ischaemia and reperfusion -induced gastric lesions, were observed the increase of LPO, the reduction of the activity of the GPx and GR., and the increase of SOD. The treatment with FAc *B. crassa* and Fac *B. fagifolia* in ischaemia and reperfusion -induced gastric lesions did not reestablish none of the studied parameters. The antiulcerogenic activity of gross FAc *B. crassa* and FAc *B. fagifolia* can be involved with antioxidant activity, through the free radicals kidnapping associated with other mechanisms of protection.

1. INTRODUÇÃO

Radicais Livres

Radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados em sua última camada de valência. A presença deste elétron não pareado altera a reatividade química dos átomos ou moléculas tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares (aqueles com os elétrons pareados) (Júnior, 1998).

O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição (Júnior, 2001).

Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e atualmente é identificado como fator relaxante do endotélio e um importante vasodilatador (Júnior, 2001). Estes radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados EROs (espécies reativas do oxigênio) e ERNs (espécies reativas do nitrogênio) (Barreiros et al., 2006).

Um radical livre é capaz de existir independentemente, apresentar uma grande instabilidade, uma meia vida muito curta, reagir rapidamente com diversos compostos e poder atacar alvos celulares (Halliwell, 1994).

No organismo, os radicais livres encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta

efeitos prejudiciais, tais como; a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Husain, 1987).

As principais fontes endógenas geradoras de espécies reativas de oxigênio incluem as mitocôndrias e a atividade de algumas enzimas como: xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidases, enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas e tromboxanos, e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos, as quais produzem uma grande quantidade de EROs em resposta ao estímulo fagocitário (Halliwell et al., 1991).

A geração destas espécies químicas acontece naturalmente nos sistemas vivos, ocorrendo por vias endógenas, tais como; respiração celular, inflamações e transporte de oxigênio pela hemoglobina. As vias exógenas que geram estas espécies são: ozônio, radiação gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro (Halliwell et al., 1994, 1995, 1998).

Quando a concentração de radicais livres sobrepõe-se à capacidade antioxidante da célula, ocorre ataque oxidativo a lipídios de membrana, a proteínas estruturais e funcionais, e a ácidos nucléicos. Este ataque é denominado “estresse oxidativo” (McCord, 2000; Andreoli, 2000; Aruoma, 1995).

É grande o número de doenças em que se sugere o envolvimento dos radicais livres ou das espécies reativas de oxigênio. Questiona-se, na maioria dos casos, se estas espécies representam a causa ou meramente a consequência destas doenças (Halliwell, 1987).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (Halliwell, 2000; Pietta, 2000).

Uma das formas mais comuns de formação de radicais livres de maior importância biológica consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, promovendo o aparecimento do radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila ($\cdot OH$), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular, conforme o esquema abaixo (Halliwell, 1991).



O principal problema é que o H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxila, conhecido como o radical mais reativo. Estas espécies reativas de oxigênio, para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de alguma molécula, tornando esta última uma espécie radicalar; a consequência disto é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares do DNA e das proteínas (Júnior, 2001).

Nos organismos aeróbios 95 a 99% do O_2 captado da atmosfera pelos pulmões são utilizados como aceptor de elétrons na cadeia respiratória das mitocôndrias. Este processo é conhecido como respiração celular, onde há consumo de O_2 para produção de H_2O e Adenosina Trifosfato (ATP); 5% deste O_2 , porém, é reduzido a O_2^- pelo vazamento de elétrons na cadeia respiratória, (Andreoli, 2000; Mccord, 2000; Halliwell e Gutteridge, 1998; Gutteridge, 1993).

As principais EROs distribuem-se em dois grupos; dos radicalares: hidroxila ($\cdot OH$), superóxido (O_2^-), peroxila ($ROO\cdot$) e alcooxila ($RO\cdot$); dos não radicalares que

são o oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3), peroxinitritos (ONOO^-) (Halliwell, 1999).

As membranas celulares são alvos freqüentes de EROs por serem ricas em complexos enzimáticos pertencentes às cadeias redutoras de O_2 . A composição majoritariamente de ácidos graxos poliinsaturados (AGP) nas membranas celulares propicia a formação de sítios geradores de EROs, fazendo com que ocorra lipoperoxidação (LPO) pelo fácil acesso dos EROs às insaturações dos ácidos graxos (McCord, 2000; Andreoli, 2000; Buege e Aust, 1989). Este processo degenerativo envolvendo formação e propagação de radicais lipídicos peroxil e alcooxil ($\text{LOO}\cdot$, $\text{LO}\cdot$), captação de O_2 e rearranjo de duplas ligações dos AGP altera a integridade e fluidez das membranas (Gardner, 1989; Buege e Aust, 1989).

As células que compõem a mucosa gástrica são ricas em mitocôndrias devido a sua alta atividade metabólica e produção de muco; por esta razão tornam-se sítios onde ocorrem danos oxidativos nos processos de geração de lesões da mucosa gástrica (Cabeza e Motilva, 2001; Das et al., 1997, 1998; Das e Banerjee, 1993; Ito et al., 1998).

Defesas antioxidantes

Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (Allen e Hamilton, 1983).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta. De acordo com Halliwell (2000) *“Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”*.

Obviamente o organismo possui vários sistemas de defesa antioxidante que atuam na detoxificação das espécies reativas de oxigênio de formas diferenciadas. Dentre eles, o sistema enzimático antioxidante parece ser o principal meio de remoção de EROs formadas durante o metabolismo intracelular (Zoppi et al., 2003).

Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, SOD e catalase (CAT) ou não enzimaticamente, a exemplo da GSH. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, onde se destacam os flavonóides e os poliflavonóides (Husain et al., 1987; Halliwell, 1995).

São 3 os tipos de superóxido dismutase (SOD), as quais se distinguem em: citoplasmática, mitocondrial e extracelular (Havsteen, 2002; Kock et al., 2004). A SOD catalisa a dismutação do anion superóxido (O_2^-) em um radical menos nocivo, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é futuramente degradado pela CAT ou GPx. A CAT é uma enzima que acelera a degradação do H_2O_2 em água e oxigênio (Baker et al., 2004). A segunda via de degradação do H_2O_2 é através da ação da GPx em cooperação com a GR. A redução da H_2O_2 em água

pela GPx é acompanhado pela conversão da glutatona na forma reduzida para a forma oxidada (Imai e Nakagawa, 2003).

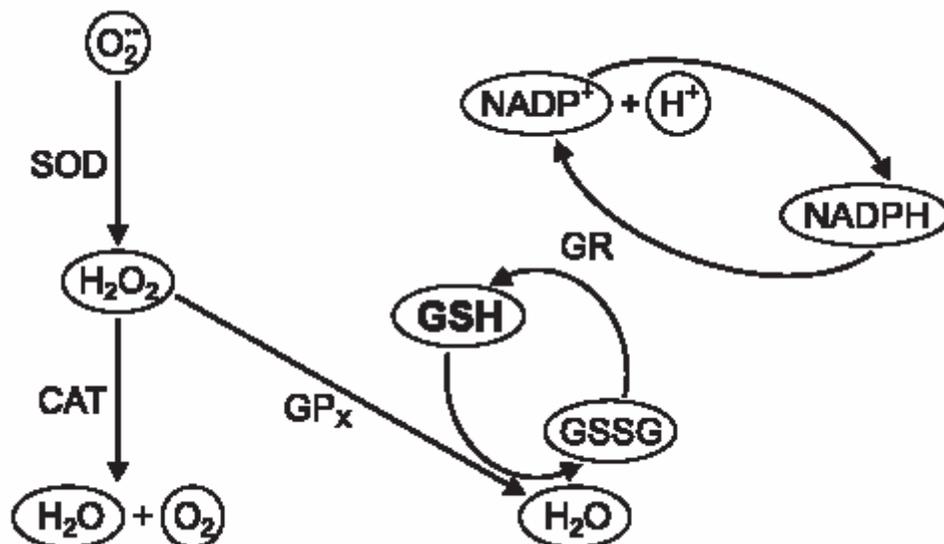


Figura 1: Esquema da atividade das enzimas antioxidantes frente a ação dos radicais livres.

Quando a concentração de radicais livres sobrepõe-se à capacidade antioxidante da célula, ocorre ataque oxidativo a lipídios de membrana, a proteínas estruturais e funcionais, e a ácidos nucleicos (McCord, 2000; Andreoli, 2000; Aruoma, 1995). Além disso, os produtos deste ataque oxidativo podem atuar como mediadores inflamatórios, estimulando a migração de polimorfonucleares e ativação da resposta inflamatória (Andreoli, 2000; McCord, 2000).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a

ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar em morte celular (Gutteridge, 1993; Halliwell, 1991).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; já o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Martinez-Flórez et al., 2002).

Trato Gastrointestinal

O Trato Gastrointestinal é constituído pelo tubo digestivo e suas glândulas secretoras anexas, sendo responsável pela digestão e absorção dos nutrientes encontrados no bolo alimentar, funcionando ao mesmo tempo, como barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o interno (Sanioto, 1991). Quando a proteção contra a autodigestão falha, nós desenvolvemos lesões nas paredes do trato gastrointestinal, conhecidas como *úlceras* (Silverthorn, 2003).

De acordo com Kutchai (1996), o estômago pode ser anatomicamente e funcionalmente dividido em quatro regiões revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo e antro. As células parietais (secretoras de ácido clorídrico) e as células principais (secretoras de pepsinogênio) estão localizadas primariamente no fundo e no corpo, enquanto que as células secretoras de gastrina estão no antro (WOLFE e SOLL, 1988).

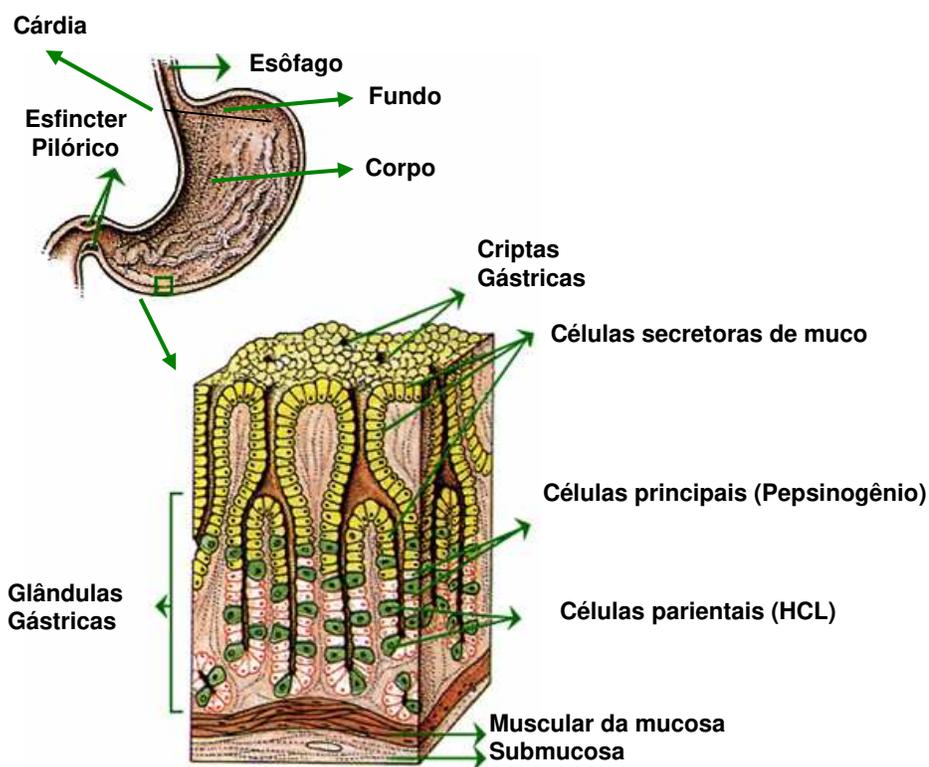


Figura 2: Visualização anatômica e histológica do estômago.

Mecanismos de Proteção do Estômago

Dentre os fatores protetores da mucosa gástrica são considerados como mais importantes o muco, o bicarbonato e o fluxo sanguíneo.

Muco: O muco é um fator significativamente importante para a mucosa gástrica, o qual se apresenta de forma viscosa, elástica, aderente, como um gel transparente, que contém 95% de água e 5% de glicoproteína, recobrando toda a superfície da mucosa gastrointestinal. O muco é capaz de agir como antioxidante e reduzir danos da mucosa promovidos por radicais livres (Repetto et al., 2002). Quando células contendo muco são danificadas por radicais de oxigênio extracelular, o

muco intracelular é liberado no tecido gástrico prevenindo danos por varredura (Seno et al., 1995).

Bicarbonato: Tanto a secreção de muco, quanto a de bicarbonato, são estimuladas por diversos fatores e formam a chamada “barreira mucoprotetora” (Sanioto, 1991; Kutchai, 1996).

Fluxo sanguíneo: Um dos papéis do fluxo sanguíneo é suprir de oxigênio, nutrientes e hormônios a mucosa gástrica, além de participar da regulação da saída do ácido, da produção de muco e da secreção de bicarbonato. De fato o aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica diminui suscetivelmente o dano causado por diversos agentes nocivos (Brzozowski et al., 2003).

Prostaglandina: A ação protetora das prostaglandinas (PGs) envolve fluxo sanguíneo, estimulação de muco, secreção de bicarbonato (Hawkey, 2000). Observação realizada por Gretzer et al. (1998) reportou que a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) tem um importante papel na cicatrização de úlcera gástrica. A diminuição do fluxo sanguíneo na área ulcerada e a falha da atividade de enzimas antioxidantes na mucosa, podem contribuir para retardar a cicatrização da úlcera gástrica e agravamento de danos gástricos induzidos por estresse.

Úlcera Gástrica

A fisiopatologia da úlcera péptica (gástrica ou duodenal) pode ser encarada como um desequilíbrio entre fatores agressivos (ácido, pepsina, infecção por *H. pylori*) e as defesas locais da mucosa, a secreção de bicarbonato, muco e PGs (Brozozowski, 2003). Originalmente, acreditava-se que todas as úlceras do trato

gastrointestinal eram causadas apenas pela ação agressiva do ácido clorídrico e da pepsina sobre a mucosa; e por este motivo tornaram-se assim conhecidas como “úlceras pépticas” (Richardson, 1993).

Adicionalmente, outros fatores foram envolvidos na patogênese da úlcera péptica gástrica, incluindo predisposição genética, secreção ácida alterada, rápido esvaziamento gástrico, falha dos mecanismos de defesa da mucosa, estresse físico e psicológico, além do tabagismo (Quan e Talley, 2002) e a ingestão de bebidas contendo álcool ou cafeína (Richardson, 1993).

Por mais de um século, a úlcera péptica foi, com freqüência, controlada através de cirurgia, com alto índice de mortalidade. A efetiva supressão da secreção de ácido gástrico começou com a introdução dos antagonistas de receptores H_2 em 1970, que resultou em grande avanço clínico. Durante a década de 80, o número de cirurgias de úlcera péptica reduziu em cerca de 85%, fato que pode ser atribuído ao uso de antagonistas de receptores H_2 , como cimetidina e ranitidina e a descoberta dos inibidores da bomba de prótons, como omeprazol e lansoprazol, cuja ação é promover a inibição da secreção de ácido gástrico. Nos anos 90 houve a descoberta da *H. pylori*, causando grande repercussão mundial para o tratamento de úlcera gástrica; entretanto, desde então, nada de novo surgiu para o entendimento, diagnose e tratamento da úlcera péptica (Yuan, 2005).

A úlcera péptica é considerada um grande fator de morbidade, havendo alto índice de morte em casos extremos, como úlceras hemorrágicas promovidas por estresse (Kushima, 2006). Na média populacional o risco de complicação com úlcera aumenta quatro vezes, resultando em 1,25 hospitalizações adicionais para cada 100 pacientes por ano (Hawkey, 2000).

As EROs geradas durante o metabolismo do ácido araquidônico, por macrófagos e por células musculares lisas podem contribuir para os danos na mucosa gástrica (Repetto e Liesuy, 2002). Durante a ulcerogênese ocorre ativação da SOD, diminuição da atividade das peroxidases, com geração de $\cdot\text{OH}$ e acúmulo de H_2O_2 , resultando em aumento da LPO na mucosa gástrica e formação de radicais lipídicos. Os radicais lipídicos, por sua vez, agem como propagadores de danos oxidativos, levando a uma diminuição dos níveis de GSH e desestruturação de grupamentos sulfidril protéicos (Das et al., 1997; Parks, 1988).

Já foi demonstrado que danos induzidos por administração de etanol ou de antiinflamatórios não esteroidais, isquemia e reperfusão (IR) e estresse na mucosa gástrica representam uma significativa diminuição dos níveis de GSH e aumento das taxas de LPO. Também ocorre diminuição da atividade da GPx na mucosa gástrica, tanto em animais de laboratório quanto em humanos. Isto mostra que as EROs são importantes agentes causadores de danos oxidativos nos processos de geração de lesões da mucosa gástrica (Cabeza et al., 2001; Das et al., 1997, 1998; Das e Banerjee, 1993; Ito et al., 1998; Szabo e Vattay, 1990; Pihan et al., 1987).

Indução de Úlcera por etanol absoluto

O etanol é um agente que induz uma rápida e forte vasoconstrição acompanhado de por uma rápida e vigorosa dilatação arteriolar. Os radicais de oxigênio gerados durante episódios de isquemia e reperfusão provocam severas mudanças celulares, levando em alguns casos, até a morte celular, devido ao

ataque a constituintes essenciais da célula, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos; também induz a peroxidação lipídica da membrana, levando a formação de compostos tóxicos, como aldeídos e novos radicais livres (Giavin e Szabo, 1992).

A Administração aguda de etanol absoluto em ratos produz lesões na mucosa gástrica e erosões similares as que ocorrem na úlcera gástrica (Repetto e Liesuy, 2002). O subsequente aumento na permeabilidade da membrana, juntamente com a queda de produtos vasoativos, mastócitos, macrófagos e outras células do sangue, podem causar danos vasculares, necrose e formação de úlcera (Bilici et al., 2002).

No processo de úlcera por etanol, além do dano direto à mucosa pelo contato do etanol, o que já inicia a LPO, há também um aumento de radicais hidroxil e superóxido gerados pela desestruturação de cadeias enzimáticas das membranas, acentuando a LPO. Há também infiltração leucocitária, aumento da atividade da mieloperoxidase, fragmentação do DNA, aumento da xantina oxidase e diminuição do nível de GSH livre na mucosa. Este processo apresenta ainda uma diminuição do muco aderido à mucosa e da atividade das PGs, o que pode aumentar os danos à mucosa por radicais, já que o muco além de barreira física, atua também como antioxidante (Repetto e Liesuy, 2002).

O etanol na concentração em que é empregado pode ser deletério na medida em que possibilita estase e ruptura da parede dos vasos sanguíneos, favorecendo hemorragia e necrose da mucosa (Mincis et al., 1995).

Alguns experimentos têm demonstrado que EROs e a peroxidação lipídica exercem um importante papel na patogênese de lesões na mucosa gástrica

induzidas por etanol. Em adição, produtos da peroxidação lipídica podem ativar leucócitos polimorfonucleares. Tem sido relatado também na genesis da lesão gástrica a infiltração de neutrófilos na mucosa (Zimmerman e Granger, 1994).

Vários agentes endógenos como GSH não protéicos, limitam a produção de EROs. No mesmo caminho, enzimas antioxidantes como a GPx estão envolvidos na eliminação de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos, atuando como importante papel de proteção celular (Konturek et al., 1990).

Na úlcera induzida por etanol absoluto ocorrem diversas alterações no sistema de defesa antioxidante endógeno, como redução na atividade da enzima GPx, depleção de GSH e aumento da atividade da SOD. A SOD, enzima importante para a proteção antioxidante do organismo, catalisa a dismutação do O_2^- ; a GPx facilita a “captura” de radicais livres pela glutathione, enquanto a GR converte a glutathione oxidada em glutathione reduzida, usando como co-fator o NADPH (Baker et al., 2004; Johnson e Giulivi, 2005).

Outra hipótese para explicar o dano oxidativo induzido pela administração de etanol na mucosa gástrica é o efeito constrictor sobre veias e artérias da mucosa gástrica, produzindo inflamação e danos ao tecido. A indução da lesão pelo etanol depende da dose utilizada e pode ser prevenido pela PGE_2 , que inibe a morte celular na parede gástrica e aumenta a secreção de muco (Repetto e Liesuy, 2002).

Indução de Úlcera por Isquemia e Reperfusão

O modelo de úlcera por isquemia e reperfusão (IR) é utilizado para avaliar resposta de fármacos em um processo de ulcerogênese sem utilização de agentes

químicos, patógenos ou estresse somático, como nos modelos de etanol, *H. pilory* e estresse por contenção e frio, isolando os fatores ulcerativos relacionados a radicais livres formados por processos inflamatórios e vasculares (Cabeza et al., 2001; Zimmerman e Granger, 1994).

A geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) é apontada como um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da úlcera gástrica induzida por diversos agentes, como etanol, antiinflamatórios não-esteroidais, estresse e isquemia e reperfusão (De la Lastra et al., 1997; El-Abhar et al., 2003; Hassan et al., 1997; Kwiecień et al., 2002).

Dependendo do tempo de isquemia e hipóxia, as lesões teciduais podem ser reversíveis ou irreversíveis (Perry, 1991). Para reverter o estado isquêmico, há necessidade de restauração de fluxo sanguíneo. Entretanto, o restabelecimento do suprimento vascular normal paradoxalmente pode ser responsável por lesões ainda mais graves do que as da isquemia *per se* (Campos e Yoshida, 2004).

Diversos trabalhos mostram o aumento da lipoperoxidação na úlcera gástrica, alguns deles apresentando uma estreita correlação entre a concentração de TBARS e o índice de lesão no estômago ulcerado por isquemia e reperfusão (Naito et al., 1995; Naito et al., 1999).

Na úlcera gástrica derivada de isquemia e reperfusão, a liberação de EROs é relatada como um evento patológico central (Brzozowski et al., 1999; Andrews et al., 1992; Itoh e Guth, 1985; Wadhwa et al., 1987; Yoshikawa et al., 1989) e a utilização de compostos antioxidantes e “scavengers” de radicais livres têm se mostrado benéfica em animais expostos a este processo (Derin et al., 2004; Derin

et al., 2005; Naito et al., 1999; Sakurai et al., 1994). A isquemia por si só é capaz de provocar lesões no tecido gástrico; entretanto, é após a reperfusão que ocorrem os principais eventos lesivos. Kitano et al. (2005) mostraram que após a reoxigenização da mucosa gástrica as lesões são aumentadas em cerca de três vezes em relação a aquelas ocasionadas no período de isquemia (Campos e Yoshida, 2004).

O processo de reperfusão, após período de isquemia, inicia com um aumento na concentração de cálcio interno e abertura dos canais inespecíficos na membrana interna mitocondrial, acompanhado por uma perda de proteínas da matriz com alteração na densidade plasmática. Também ocorre uma despolarização da membrana mitocondrial com inchamento (swelling) das mitocôndrias e diminuição da atividade da ATPase. Assim, os danos causados a mitocôndria durante a isquemia-reperfusão podem ser irreversíveis e induzir a morte celular por apoptose ou por necrose do tecido (Griffiths e Halestrp, 1995).

Muitos estudos citam a toxicidade celular por EROs em diferentes órgãos e tecidos sujeitos a processos de isquemia-reperfusão, em especial no trato gastrintestinal, causando alterações nas funções e estabilidade das membranas celulares, perda de atividade de enzimas e receptores, danos a ácidos nucléicos, induzindo a apoptose, além de estímulos na infiltração de leucócitos (Andrews e O'Brien, 1994, Cabreza et al., 2001).

O papel dos radicais livres no processo de IR causando lesão tecidual têm sido extensamente estudados em intestino, estômago, fígado, pâncreas, rins, coração e cérebro (Campos e Yoshida, 2004).

Diversos trabalhos mostram a redução da atividade das enzimas SOD e GPx na mucosa gástrica lesada pela oclusão da artéria celíaca, seguida de reoxigenação do estômago (Derin et al., 2004; El-Abhar et al., 2003; Kwiecień et al., 2002). Granger et al. (1986), em um estudo sobre IR no intestino delgado, propuseram um mecanismo para explicar a origem dos radicais livres: “Durante o período de isquemia, o ATP é catabolizado até hipoxantina, que se acumula nos tecidos. Como resultado do estado de baixa energia, há falência da homeostase celular caracterizada pela perda do gradiente iônico através da membrana celular, permitindo o influxo de Ca^{++} para as células, que ativa a protease a converter a xantina desidrogenase a xantina oxidase. A hipoxantina é o primeiro substrato para a xantina oxidase, o que ocorre quando o segundo substrato, o oxigênio, é fornecido na reperfusão, formando as espécies reativas do metabolismo do oxigênio”.

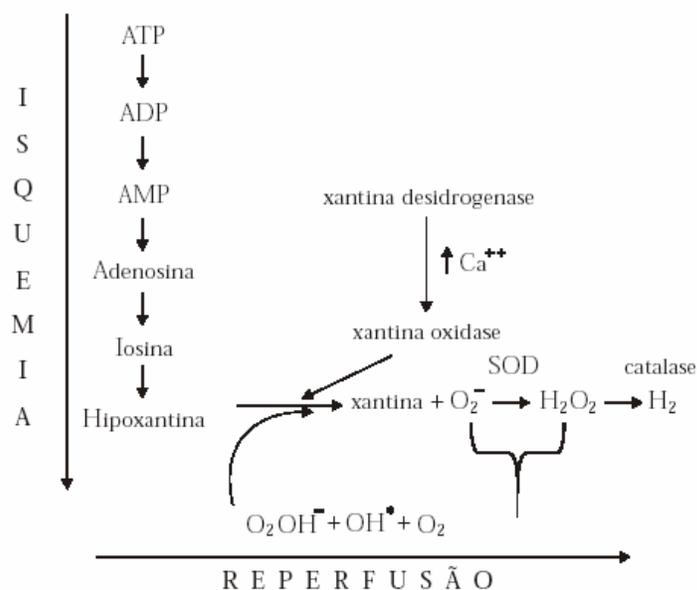


Figura 3: Via metabólica para a produção de O_2 durante o período de reperfusão de tecidos isquêmicos pela conversão da xantina oxidase.

Outra origem dos radicais livres seria a produção de radicais superóxidos pela mencionada quebra de elétrons do sistema de transporte de elétrons dentro da mitocôndria ou pela via da ciclooxigenase do metabolismo do ácido aracdônico. Por esse último mecanismo haveria a ativação de proteases e fosfolipases inespecíficas induzidas pelo acúmulo de cálcio intracelular no período de reperfusão, que levaria à síntese de mediadores pró-inflamatórios; tais como o fator de agregação plaquetária (PAF) e os compostos eicosanóides (leucotrienos, tromboxano e prostaglandinas) (Campos e Yoshida, 2004).

Plantas Medicinais

A utilização de plantas com fins medicinais era comum na Idade Média, mas os primeiros registros remontam a milênios. Acredita-se que a flora mundial esteja entre 250 a 500 mil espécies. O Brasil contribui com 120 mil espécies, a grande maioria na região amazônica, das quais o saber popular selecionou cerca de duas mil como medicinais. Dessas, apenas 10% foram cientificamente investigadas do ponto de vista químico-farmacológico. Observa-se, portanto, uma disparidade entre a quantidade e a diversidade da flora medicinal de um lado e a ausência de levantamentos etnofarmacológicos criteriosos de outro lado. Quando dizemos criteriosos, chamamos a atenção para levantamentos etnofarmacológicos nos quais conste identificação taxonômica das plantas envolvidas, descrição botânica objetiva da espécie citada e usos, posologia, efeitos observados, enfim, dados que auxiliem o usuário final na busca de conhecimento que tais levantamentos oferecem (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

A pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e apresenta um caráter multidisciplinar, principalmente quando o objetivo da pesquisa é encontrar substâncias ativas úteis para a terapêutica. Nessas pesquisas, a experiência indica que a seleção da espécie a ser estudada deve levar em consideração a indicação popular de uso medicinal e o trabalho conjunto de uma equipe que tenha um esforço comum na identificação da espécie, no isolamento e determinação das substâncias ativas, e na escolha e execução dos ensaios farmacológicos (Souza-Brito, 1996). Durante milênios, o homem empiricamente aprofundou seu conhecimento para a cura de suas enfermidades, demonstrando assim uma estreita relação entre o uso de plantas medicinais e sua evolução (Luiz-Ferreira, 2005).

Embora várias plantas estejam sendo usadas como fins terapêuticos (e mesmo comercializadas) a grande maioria não possui dados científicos que comprovem sua eficácia e seu espectro toxicológico no homem, assim como sua qualidade e sua produção. Apesar de três ou quatro décadas de estudo, pode-se dizer que até esta data não houve um estudo coordenado de todos os envolvidos no processo (indústria, farmacólogos, fitoquímicos, químicos, toxicólogos, investigadores clínicos, etc.) visando o desenvolvimento de drogas a partir de plantas (Ferreira, 2002).

Muitas das propriedades terapêuticas das plantas são relatadas pela população, as quais são confirmadas em sua maioria nos estudos científicos, comprovando a importância da pesquisa etnofarmacológica. Tais propriedades propiciaram o desenvolvimento de vários medicamentos (Maciel et al., 2002; Simões et al., 2002; Hostettmann, 2003).

O valor intrínseco de uma planta medicinal está no seu efeito terapêutico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) diz que planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A estas substâncias é dado o nome de princípios ativos e são eles os responsáveis pelo efeito terapêutico que a planta medicinal possui. As funções fisiológicas dos princípios ativos das plantas ainda não estão completamente esclarecidas, mas associa-se sua produção à defesa da planta contra agentes externos como doenças, pragas, radiação solar, estresse hídrico, etc, ou a resíduos do metabolismo vegetal. Estes princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e são produzidos (quase todos) pelo metabolismo secundário das plantas (Montanari, 2002).

Desde a última década as indústrias farmacêuticas têm demonstrado grande interesse nos estudos de plantas; visando descobrir novas estruturas de moléculas com potenciais atividades biológicas (Hamburger e Hostettman, 1991).

As novas tendências globais de uma preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável trouxeram novos ares ao estudo das plantas medicinais brasileiras. Novas linhas de pesquisa foram estabelecidas em Universidades brasileiras, algumas delas buscando bases mais sólidas para a validação científica do uso de plantas medicinais (Lorenzi e Matos, 2002).

De acordo com Newman et al (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado em torno de 49% eram substâncias

isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural (Gurib, 2006).

Um estudo etnofarmacológico da região do Cerrado do Brasil encontrou um grande número de plantas usadas para o tratamento de úlceras gástricas e gastrite (Hiruma-Lima, 2005).

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

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

- I- A úlcera péptica é uma patologia que apresenta uma elevada incidência em nosso país;
- II- Essa doença crônica, já que é quase sempre recorrente, requer uma intervenção endoscópica-terapêutica, que necessita, em muitos casos, de processo cirúrgico, acarretando transtornos financeiros para o indivíduo e também para o sistema de saúde;
- III- Não existe no mercado farmacêutico nenhum produto com 100% de eficácia os medicamentos existentes são de alto custo, efeitos limitados na patologia crônica, além de apresentarem efeitos colaterais e reações adversas;

- IV- As plantas possuem compostos terapêuticos potencialmente ativos, os quais constituem em grande estratégia para a descoberta de novos fármacos;
- V- A matéria-prima utilizada na produção dos produtos farmacêuticos é importada, representando dependência para a indústria farmacêutica nacional.

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

Flavonóides

Os flavonóides são pigmentos naturais presentes em vegetais e que protegem o organismo humano de danos produzidos por agentes antioxidantes, como raios ultravioletas, poluição ambiental e substâncias químicas presentes nos alimentos. O organismo humano não pode produzir estas substâncias químicas protetoras, podendo obtê-las através da alimentação ou em forma de suplementos. Estão amplamente distribuídos em plantas, frutas, verduras e em diversas bebidas e representam componentes da parte energética da dieta humana (Aherne e Brien, 2002).

Os flavonóides estão presentes, em larga escala, na dieta alimentar do homem justificando o crescente interesse científico em elucidar os efeitos destas substâncias na saúde humana. Seus efeitos benéficos são descritos em diversas patologias, tais como: *diabetes melitus*, alergia, câncer, infecções virais, cefaléias, úlceras duodenal e gástrica, inflamações, cardiopatias, arteriosclerose e

osteoporose (Harbone e Williams, 2000). No entanto, a heterogeneidade química aliada à extensa lista de propriedades farmacológicas desta classe de compostos dificulta a elucidação de seus mecanismos fisiológicos e bioquímicos (Di Carlo et al., 1999).

Os flavonóides contêm em sua estrutura química um número variável de hidroxilas fenólicas e excelentes propriedades de quelar ferro e outros metais de transição, conferindo uma grande capacidade antioxidante (Havsteen, 1983, Peres, 1994).

As maiores classes de flavonóides incluem os flavonóis, as flavonas, flavononas, catequinas (ou flavonol), antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonas e as chalconas. Muitos flavonóides ocorrem naturalmente como flavonóides glicosilados, ou seja, apresentam açúcares simples ou complexos como substituintes nos anéis centrais; dentre eles destacam-se: D-glucose, L-raminose, glucoraminose, galactose, ligninas, arabinose. No entanto, alguns flavonóides podem ser encontrados na forma de aglicona, sem açúcares ligados aos anéis centrais (Di Carlo et al., 1999)

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular que comportam um esqueleto comum de difenilpiranos, composto por dois anéis de fenil (A e B) ligados a um anel C de pirano (heterociclo). A atividade dos flavonóides como antioxidantes depende da propriedade redox de seus grupos hidroxifenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química (Bors et. al., 1990).

As propriedades bioquímicas dos flavonóides dependem da posição das duplas ligações, glicosilações, número, espécie e disposição dos radicais nos

anéis fenólicos, como visualizados na figura 4 e tabela 1. A maior parte dos estudos envolvendo flavonóides se concentra em suas propriedades bioquímicas e fisiológicas relacionadas ao potencial antioxidante na proteção dos sistemas biológicos durante estresse oxidativo. Pode-se observar ainda que a proteção oferecida por estas substâncias contra o ataque oxidativo induzidos por radicais livres está relacionado às diferenças na estrutura química (Harbone e Williams, 2000; Di Carlo et al., 1999; Van Acker et al., 1998, Beecher, 2003).

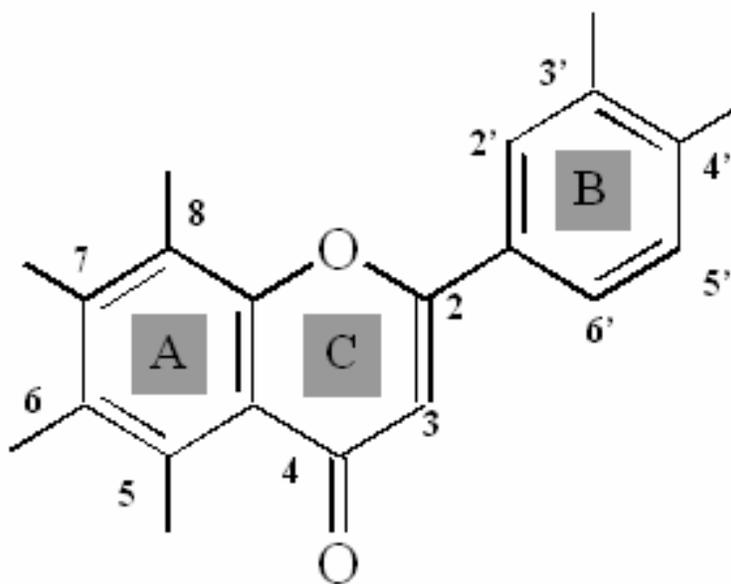


Figura 4 - Esqueleto Químico básico dos flavonóides

Tabela 1: Influência das características químicas dos flavonóides no potencial antioxidante

Características Químicas	Potencial Antioxidante
Glicosilação no C-7	Ação seqüestradora de radicais livres
Dupla ligação entre C3 e C4 e grupo hidroxil em C3	Inibição da xantina oxidase
Hidroxila na posição B3 e C3	Potencial fator quelante de EROs
Carbonil na posição 4 e uma hidroxila na posição A5	Inibição da NADPH-oxidase
Presença de ceto na posição C4 ou hidroxilana posição B3 e B4	Potencial inibidor de peroxidação lipídica

As propriedades anti-radicais livres dos flavonóides se dirigem fundamentalmente para o radical hidroxila e superóxido, espécies altamente reativas implicadas no início da cadeia de peroxidação lipídica (Jovanovic et al., 1998). Há também evidências da sua capacidade de modificar a síntese de eicosanóides (com resposta anti-prostanóide e antiinflamatória), de prevenir a agregação plaquetária (efeito antitrombócito) e também de proteger as proteínas de baixa densidade de oxidação (prevenção de ateroma) (Pace-Asciak et al, 1995; Yang , 2000; Geleijnse, 2002).

Malpighiaceae

Família de árvores e lianas com aproximadamente 60 gêneros e 1200 espécies e distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente no continente americano. Os frutos de algumas espécies de *Byrsonima* são conhecidos popularmente como “murici”; são utilizados para fazer sucos e doces, principalmente no norte e nordeste do Brasil. A casca é relatada para diversos usos medicinais, desde picadas de cobras a inflamação da garganta. Com flores vistosas, frutos que atraem aves e pelo rápido crescimento, espécies de *Malpighiaceae*, especialmente as *Byrsonimas* têm grande potencial como ornamento e na recuperação de áreas degradadas (Anderson, 1981)

Várias espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima* ocorrem no nordeste brasileiro, sendo algumas delas intensamente consumidas na forma de sucos, licores, geléias e doces. As espécies deste gênero são comumente utilizadas como antiasmáticas, antifebris e no tratamento de infecções cutâneas (Caceres et al., 1993).

Folhas e cascas de algumas espécies de *Byrsonima* são usadas popularmente em disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e ainda como anti-diarréicos (Amarquaye et al., 1994).

***Byrsonima crassa* (Nied)**

Sannomiya et al. (2004) revelaram que o extrato metanólico de folhas da *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae) contém flavonóides com atividade antioxidante. Dentre estes estão os monoglicosilados (quercetina-3-O- α -L-arabinose e quercetina 3-O- β -D-galactoside) e um biflavonóide (amentoflavona), como ilustrados na figura 5.

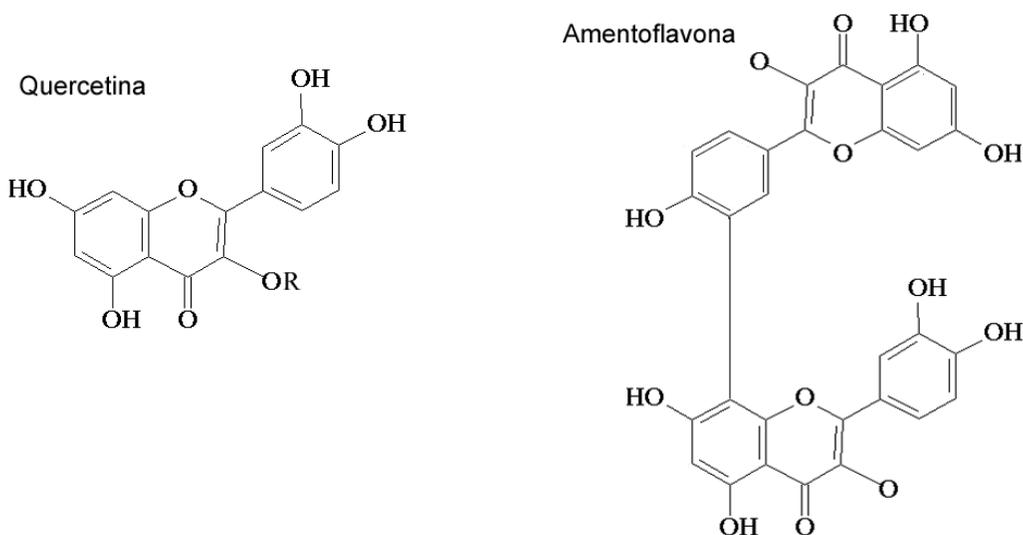


Figura 5: Estruturas químicas dos flavonóides FAc de *B. Crassa*

O flavonóide quercetina previne contra danos oxidativos e morte celular, por inúmeros mecanismos, como seqüestradora de radicais livres, proteção contra peroxidação lipídica e quelante de alguns metais (Molina, 2003).

A cromatograma de separação por HPLC de FAc de *B. crassa* revelou a presença das seguintes substâncias químicas AG: ácido gálico; cat: (+)-catequina; Pro: proantocianidina; epi: (-)-epicatequina; GM: galato de metila; Q-O-gal: quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo; Q-O-gal-gall: quercetina-3-O-(2''-galoil)- β -D-galactopiranosídeo; Q-O-ara: quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo; Q-O-ara-gall: quercetina-3-O-(2''-galoil)- α -L-arabinopiranosídeo (Sannomiya et al.,2004).

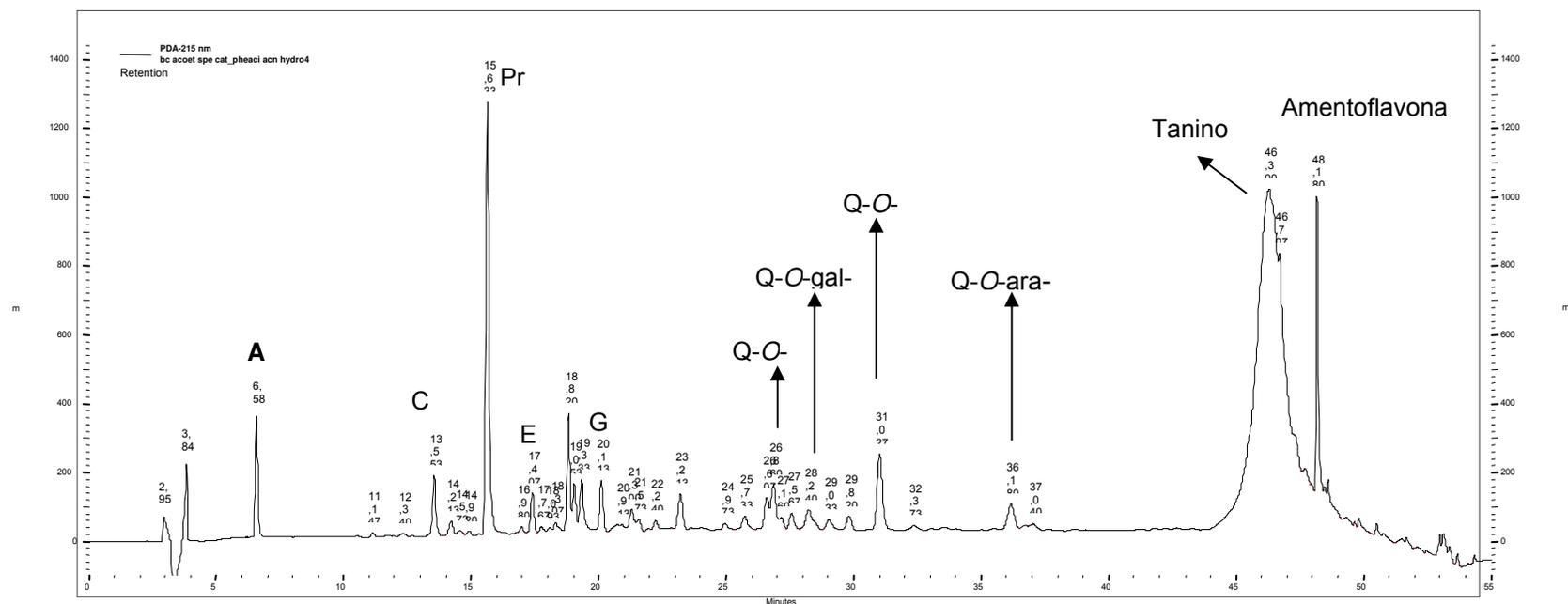


Figura 6 : Cromatografia de separação por HPLC da FAc de *B. Crassa*. EmeOH de *B. Crassa* (superior 215 nm). HPLC PU-2089/MD-2010 Jasco®. Coluna Synergi Hydro-RP18 (250 x 4,6 mm ID, 4 μ m). FM: A = H₂O+TFA 0,1%; B = ACN+TFA 0,1%. Gradiente de eluição. 5-17% B (15 min), 17-23% B (25 min), 23-100% B (10 min) 100% B isocrático (5 min)

***Byrsonima fagifolia* (Nied)**

Estudos fitoquímicos da FAc do EmeOH de folhas da *Byrsonima fagifolia* (Malpighiaceae) desenvolvidos pelo laboratório de química orgânica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) revelaram a presença de alguns derivados de quercetina, ácido gálico, galato de metila e ácido galoil quinico como ilustrados na figura 7.

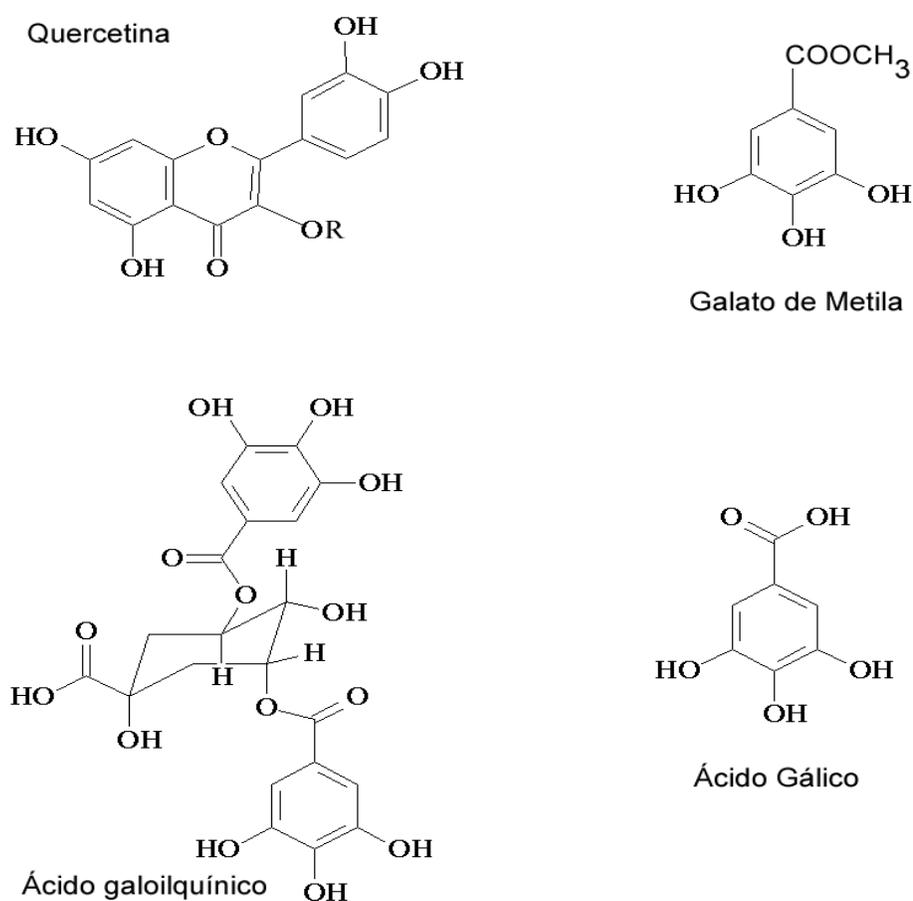


Figura 7: Estruturas químicas dos compostos fenólicos da FAc de *B. fagifolia*

Baratto et al (2003) demonstrou a propriedade antioxidante do ácido galoil quinico através da sua atividade positiva para o teste de DPPH, do seqüestro de radicais superóxido e radical hidroxila.

O ácido gálico apresenta forte atividade antioxidante, antimutagênica e atividade anticarcinogênica (Inoe et al., 1994; Inoe et al., 1995; Beljasnski e Crochet, 1994). Extrato bruto de *Anogeissus latifolia* ROXB constituída de 0,95% de ácido gálico revelou atividade antioxidante e antimicrobianno em modelo de indução de úlcera gástrica (Govindarajan et al., 2006).

Galato de metila é o principal constituinte fitoquímico dos chás verdes, uma conhecida bebida antioxidante (Chen e Zang ,2003). A atividade sequestrante de radicais livres e inibição da peroxidação lipíica tem sido comentada como a principal atividade do galato de metila. (Cho et al., 2003). Em adição, o galato de metila possui atividade antiplaquetária e protege o DNA contra danos provenientes do estresse oxidativo (Hsieh, 2004).

A cromatografia de separação por HPLC do EMeOH *B. Fagifolia* realizada no laboratório de química orgânica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) revelou a presença dos seguintes constituintes químicos; AG: ácido gálico; 3,4-di: ácido 3,4-digaloilquínico; 3,5-di: ácido 3,5-digaloilquínico; 3,4,5-tri: ácido 3,4,5-trigaloilquínico; 1,3,4,5-tetra: ácido 1,3,4,5-tetragaloilquínico.

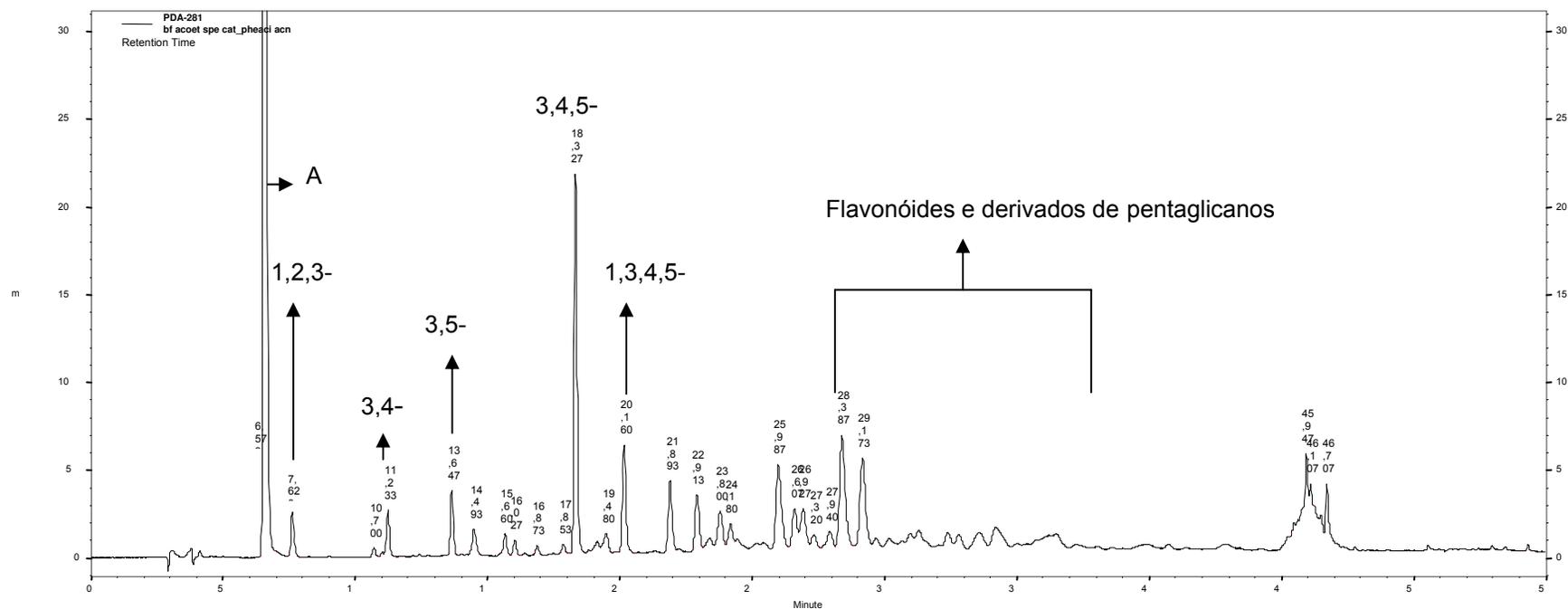


Figura 8: Cromatografia de separação por HPLC da FAc *B. Fagifolia*. EmeOH de *B. Fagifolia* (215nm). HPLC PU-2089/MD-2010 Jasco®. Coluna Synergi Hydro-RP18 (250 x 4,6 mm ID, 4 µm). FM: A = H2O+TFA 0,1%; B = ACN+TFA 0,1%. Gradiente de eluição. 5-17% B (15 min), 17-23% B (25 min), 23-100% B (10 min) 100% B isocrático (5 min).

2. OBJETIVOS

Pesquisar os possíveis mecanismos antioxidantes de *Byrsonima crassa* e *Byrsonima fagifolia* envolvidos na atividade antiulcerogênica em úlceras induzidas por etanol e por isquemia e reperfusão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material vegetal

Coleta das espécies em estudo

As folhas da *B. crassa* e *B. fagifolia* foram coletadas na estrada do Brejinho de Nazaré, município de Porto Nacional, estado de Tocantins pela prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma-Lima, da UNESP, Campus Botucatu-SP. A identificação botânica ficou a cargo do prof^o. Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos e as exsiccatas foram depositadas no herbário Universidade Federal do Tocantins sob os números 6398 e 3377, respectivamente.

Preparo dos Extratos

Folhas de *B. crassa* e *B. fagifolia* Nied (2 Kg e 1 Kg, respectivamente) foram secas e trituradas em moinho de facas e em seguida, foram submetidas às extrações por maceração em clorofórmio (CHCl_3) e metanol (MeOH) respectivamente. Após a evaporação dos solventes em rotaevaporador foram obtidos os extratos clorofórmico (ECHCl_3) e metanólico (EMeOH).

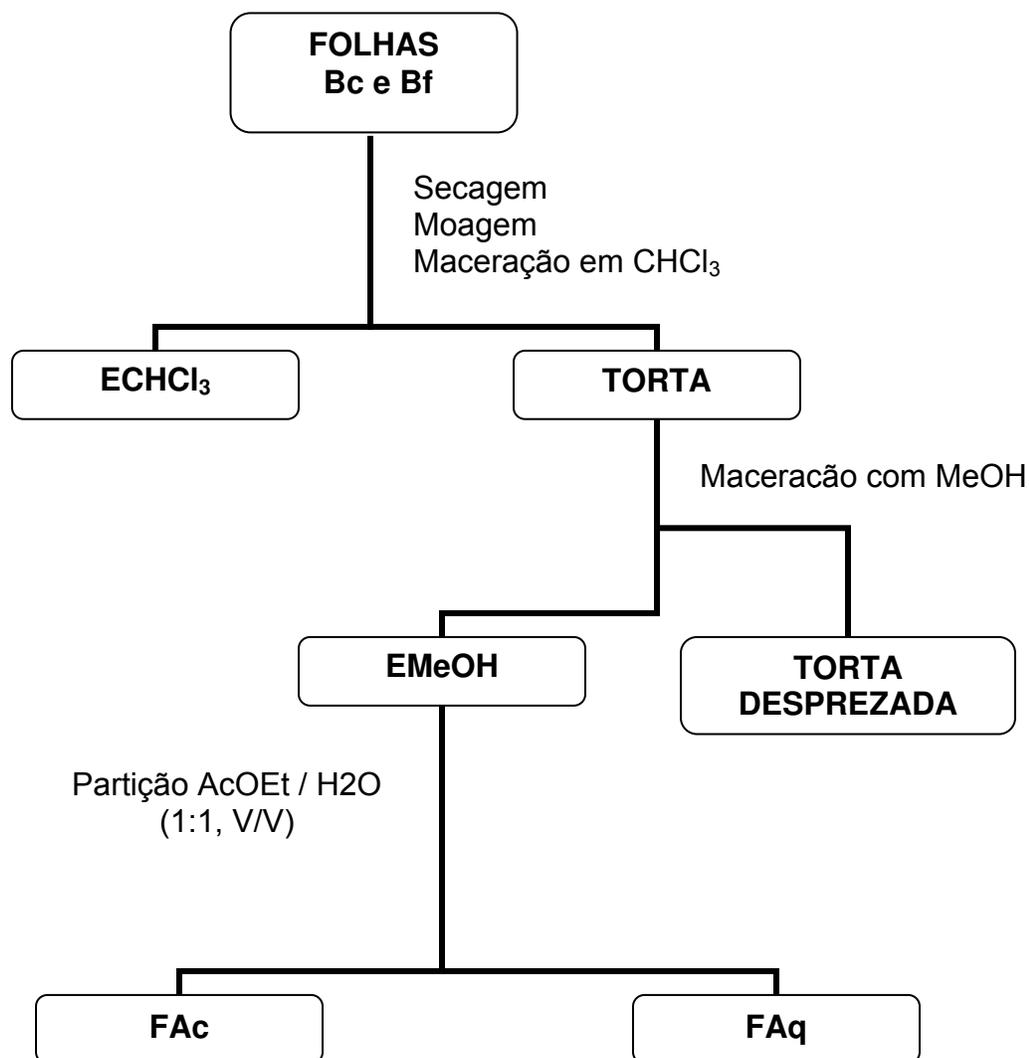
Tabela 2: Rendimento obtido dos extratos clorofórmicos e metanólicos preparados a partir de folhas de *B. crassa* e *B. fagifolia*.

Folhas Extratos	2 Kg de <i>B. crassa</i>	1 Kg de <i>B. fagifolia</i>
ECHCl₃ (g)	53,8 (2,7%)	47,3 (4,7%)
EMeOH (g)	158,3 (7,9%)	24,6 (2,5%)

Porções de 10g do extrato MeOH de *Byrsonima crassa* Nied e 8g do extrato MeOH de *Byrsonima fagifolia* Nied foram particionadas em uma mistura EtOAc/água (1:1, v/v) rendendo frações Acetato de etila (FAc) e frações Aquosa (FAq) de ambas as espécies.

Tabela 3: Rendimento obtido das FAc e FAq de *B. crassa* e *B. fagifolia* preparados a partir do EMeOH.

Extrato MeOH Frações	10 g de <i>B. crassa</i>	8 g de <i>B. fagifolia</i>
FAc	4,3 (43%)	3,5 (44%)
FAq	4,5 (45%)	3,9 (48%)



Fluxograma 1: Preparo do EmeOH e das FAc e FAq de *B. crassa* e *B. fagifolia*.

Animais utilizados em ensaios biológicos

Foram utilizados ratos Wistar machos (180 a 220 g) fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP, protocolo número 853-2). Os animais foram aclimatados às condições do biotério por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, com temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5 \%$ e ciclos claro-escuro controlados de 12 horas, alimentados com ração Nuvital (NUVILAB[®]) e água ad libitum. Os animais foram distribuídos ao acaso nos diferentes grupos experimentais e submetidos a períodos de 24 horas de jejum, de acordo com metodologias aplicadas.

Procedimentos Experimentais

Para determinar as doses das FAc de *B. crassa* e *B. fagifolia* que melhor protegem contra lesões ulcerativas, foram realizados experimentos de indução de úlcera por etanol, com doses crescentes das referidas doses, em ratos Wistar. Com as doses já definidas, foram realizados os experimentos de indução de úlcera por etanol por IR, modelos estes envolvidos no processo de liberação de radicais livres. A partir dos homogenatos de estômago obtidos dos experimentos de etanol e IR fez-se dosagens dos danos oxidativos à membrana e determinações enzimáticas.

Para cada um dos modelos experimentais foram utilizados grupos de animais com diferentes tratamentos: Tween 80[®] 12% (controle negativo), Rutina

200mg/kg (controle positivo), Sham (animal que sofreu o estresse da manipulação), grupo tratado com 50 mg/kg de FAc de *B. crassa* e grupo tratado com 25 mg/kg de FAc de *B. fagifolia*.

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

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

Indução de úlcera por administração de etanol

Esse modelo foi realizado de acordo com Morimoto et al. (1991). Após 24 horas de jejum, os animais foram divididos em grupos e submetidos a diferentes tratamentos 1 hora antes da indução da lesão pela administração de etanol. A lesão gástrica foi induzida pela administração oral de 1 ml de etanol absoluto. Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical; em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura. Após esse procedimento, foram determinados os índices de lesões ulcerativas (ILU). Em outro momento, este mesmo experimento foi realizado; porém, a mucosa foi raspada, homogeneizada e congeladas a -70°C para a realização dos testes antioxidantes.

Indução de Úlcera por Isquemia e Reperusão

Este modelo é descrito segundo metodologia descrita por Ueda (1989). Após 24 horas de jejum, os animais foram divididos em grupos e submetidos a diferentes tratamentos em seguida foram anestesiados com Ketamina (30 mg/Kg) e Xilazina (0,3 mg/Kg), por injeção intramuscular e submetidos à tricotomia. Decorridos 30 minutos após o tratamento fez-se uma incisão de aproximadamente 3cm do lado esquerdo e direito do abdômen. Após localização da artéria aorta, a artéria celíaca foi isolada e submetida a um processo de limpeza e eliminação de aderências; um “clamp” microvascular foi colocado nessa artéria. Transcorridos 30 minutos da isquemia o clamp foi retirado para permitir a reperusão da mucosa gástrica durante os 60 minutos seguintes. No final desse período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os estômagos então foram removidos, abertos ao longo da grande curvatura e lavados com solução salina.

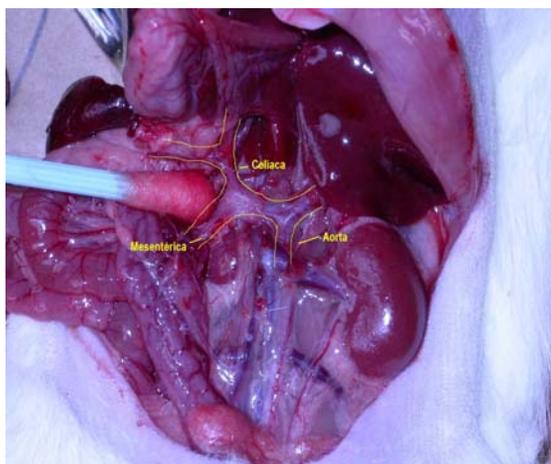


Figura 9: Identificação da artéria celíaca no estômago de rato Wistar.

Coleta do homogenato de tecido

Após os animais terem sido submetidos ao protocolo de etanol e IR, os estômagos foram removidos, lavados com solução salina (NaCl 0,9%) e raspados para coleta da amostra. As amostras após coletadas foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos com 1 ml de solução tampão fosfato tamponado (PBS), imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer (-70 °C). Para as dosagens bioquímicas, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 12.000 rpm, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi aproveitado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando como padrão albumina bovina.

Testes antioxidantes *in vivo*

Danos oxidativos de Membrana

Peroxidação lipídica (Ohkawa et al., 1979)

O homogenato de tecido estomacal deve ser misturado a KCl (0,15 M) na proporção de 1:10, v/v: 1 mL do raspado: 10 mL de KCl. Aliquotar 0,5 mL deste homogenato e adicionar: 0.2 mL de SDS (8.1%), 1.5 mL de ácido acético (20%, pH = 3.5, ajustado com NaOH), 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (0.8%, p/v) e H₂O destilada até completar 4 mL. Colocar as amostras em banho-maria, à temperatura de 95°C, por 1 hora. Após, resfriar as amostras, adicionar 1 mL de H₂O destilada + 5 mL da mistura de n-butanol + piridina (15:1, v/v). Fechar os tubos e agitar por 1 minuto, centrifugar a 2600g, por 10 minutos. A absorbância da capa orgânica será determinada a 532 nm. Para calcular a concentração, pode-se

utilizar o coeficiente de extinção de tetraetoxipropano como padrão. Valores expressos em pmol MDA/mg proteína.

Determinação de grupamentos sulfidril (Faure e Lafond, 1995)

As amostras foram centrifugadas (12000rpm, a 4°C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH = 7,4). A seguir, fez-se a leitura da absorbância de 100 µl da amostra, acrescidos de 100 µl de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura adicionou-se 20 µl de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01mM) e realizou-se nova leitura (A2), a 412 nm, decorridos 15 minutos de reação, para determinação de grupamentos sulfidril não protéicos(GSH). A concentração de grupamentos sulfidril (tiol) é dada por (A1-A2) x 1,57.

Atividade Enzimática

Determinação da atividade da GPx (Yoshikawa et al., 1993)

O homogenato de tecido estomacal foi diluído em tampão fosfato (1: 10). Em 100 µL desta solução adicionou-se 50 µL H₂O₂ (0.25 mM), 20 µL de Glutathione Reduzida (GSH) (10 mM), 20 µL NADPH (4mM), 10 µL (1 U) de enzima glutathione redutase em PBS, pH 7,8. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 365 nm.. Os resultados serão expressos em mM/min por mg de proteína.

Determinação da atividade da GR (Carlberg e Mannervik, 1985)

A atividade dessa enzima foi determinada seguindo-se espectrofotometricamente a oxidação de NADPH à 340 nm. A reação enzimática é constituída de 100 μL do homogenato previamente diluído em tampão fosfato (1:10), 50 μL de tampão fosfato (1M), pH=7, 10 μL de EDTA (0,2 mM), 20 μL de GSSG (1 mM) e 20 μL de NADPH (0,1 mM). O consumo de NADPH foi determinado pela diminuição da absorbância à 340 nm. A atividade da enzima é definida como mM NADPH consumido/min/mg de proteína. O coeficiente de extinção para o NADPH é $6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinação da atividade da SOD (Winterbourn et al., 1975)

A Atividade da SOD foi determinada pela inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo radical supéroxido gerado através do sistema hipoxantina/xantina oxidase (XO) à 37° C. O homogenato de tecido estomacal foi diluído em tampão fosfato (1: 10). Em 100 μL desta solução, adicionaram-se 40 μL de tampão fosfato 0.1 M (pH: 7.4), xantina 0.07U/ml, 20 μL de hipoxantina (100 μM) e 20 μL de NBT. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 560 nm.. Os resultados serão expressos em U/mg de proteína.

4. RESULTADOS

Byrsonima crassa na indução de úlcera por etanol

- Índice de lesão ulcerativa (ILU):

Na tabela 4 são apresentados os dados obtidos com a FAc de *B. crassa* com 3 níveis de dose; 25, 50 e 100 mg/kg após indução de úlcera por etanol.

Tabela 4: Efeito da FAc de *B. crassa* sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos.

Modelo Empregado	Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU	Inibição (%)
Etanol	Tween 80 12%	10 (ml/Kg)	6	48.8± 4.90	-
	<i>B. crassa</i>	25	5	45.4± 2.88	7
	<i>B. crassa</i>	50	5	12.8 ± 0.44*	74
	<i>B. crassa</i>	100	5	33.2 ± 1.48*	32

ANOVA: $F_{(3,17)} = 139.9$ para IU; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$

As doses de 50 e 100 mg/kg promoveram a inibição das lesões gástricas em cerca de 74% e 32%, respectivamente, quando comparadas com o controle negativo (Tween), indicando a presença do potencial efeito gastroprotetor. A dose de 50 mg/Kg foi a escolhida para prosseguimento nos ensaios antioxidantes por apresentar a melhor eficácia.

- Testes antioxidantes:

Danos oxidativos de membrana:

Determinação da peroxidação lipídica (LPO) e compostos sulfidrila (GSH)

Na tabela 5 são ilustrados dados referentes à determinação da LPO e GSH após tratamento com FAc de *B. crassa* e rutina em modelos de úlcera gástrica por etanol

Tabela 5: Mecanismos antioxidantes (LPO e GSH) das FAc *B. crassa* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	LPO (pmol MDA/mg proteína)	GSH (mM/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/Kg)	88.66 ± 0.98	0.17 ± 0.01
Sham	-	37.91 ± 0.60*	0.39 ± 0.03*
Rutina	200	27.39 ± 2.50*	0.29 ± 0.01*
<i>B. crassa</i>	50	69.40 ± 2.66*	0.34 ± 0.03*

ANOVA: $F_{(3,20)} = 304.1$ para LPO e $F_{(3,16)} = 17.43$ para GSH; com teste a posteriori de Dunnet
*p<0,01

Os tratamentos com rutina e FAc de *B. crassa* produziram uma redução estatisticamente significativa de LPO quando comparados com o grupo controle negativo (Tween); o tratamento com rutina apresentou uma diminuição significativa nos níveis de LPO em comparação aos níveis do grupo sham. Com relação a determinação de GSH, os tratamentos com rutina e FAc de *B. crassa* promoveram um aumento estatisticamente significativo na produção destas substâncias, quando comparados com o grupo controle negativo (Tween).

Atividade enzimática:

Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR)

Na tabela 6 são ilustrados dados referentes às atividades das enzimas antioxidantes (GPx) e (GR) após tratamento com FAc de *B. crassa* e rutina em modelos de úlcera gástrica por etanol.

Tabela 6: Mecanismos antioxidantes (atividade da GPx e GR) de FAc de *B. crassa* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	GPx (mM/min/mg proteína)	GR (mM/min/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/Kg)	17.58 ± 1.02	11.63 ± 0.70
Sham	-	35.95 ± 2.39**	17.10 ± 0.71*
Rutina	200	32.92 ± 2.49**	26.00 ± 2.64**
<i>B. crassa</i>	50	22.41 ± 1.69*	22.10 ± 2.10**

ANOVA: $F_{(3,16)} = 19.30$ para atividade da GPx e $F_{(3,19)} = 14.08$ para atividade da GR; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

A atividade da GPx após tratamentos com rutina e FAc *B. crassa* permitiram observar um aumento estatisticamente significativo na atividade desta enzima quando comparados com o grupo controle negativo (Tween); sendo restabelecidos os níveis do grupo sham após o tratamento com rutina. Com relação a GR, os tratamentos com rutina e FAc de *B. crassa* produziram um aumento significativo na atividade desta enzima quando comparados com o controle negativo (tween).

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Na tabela 7 são ilustrados dados referentes à atividade das enzimas antioxidantes (SOD) após tratamento com FAc de *B. crassa* e rutina em modelos de úlcera gástrica por etanol.

Tabela 7: Mecanismos antioxidantes (atividade da SOD) de FAc de *B. crassa* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	SOD (U/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/Kg)	34.68 ± 2.73
Sham	-	22.23 ± 0.81*
Rutina	200	4.38 ± 0.63*
<i>B. crassa</i>	50	19.75 ± 2.78*

ANOVA: $F_{(3,17)} = 39.68$ para atividade da SOD; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$.

Os tratamentos com rutina e FAc de *B. crassa* levaram a uma queda estatisticamente significativa da atividade da enzima SOD quando comparados com o grupo controle negativo (Tween); o tratamento com FAc de *B. crassa* possibilitou o restabelecimento dos níveis do grupo sham e o tratamento com rutina produziu uma melhora dos níveis de SOD do grupo sham em até 4 vezes.

Byrsonima fagifolia na indução de úlcera por etanol

- Índice de lesão ulcerativa (ILU):

Na tabela 8 são apresentados dados obtidos com a FAc de *B. fagifolia* em três níveis de dose: 12.5, 25 e 50 mg/kg após indução de úlcera por etanol.

Tabela 8: Efeito da FAc de *B. fagifolia* sobre úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos.

Modelo Empregado	Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU	Inibição (%)
Etanol	Tween 80 12%	10 (ml/Kg)	6	48.5 ± 4.9	-
	<i>B. fagifolia</i>	12.5	5	25.6 ± 2.0*	47
	<i>B. fagifolia</i>	25	5	14.8 ± 1.3*	69
	<i>B. fagifolia</i>	50	5	26.0 ± 2.1*	46

ANOVA: $F_{(3,17)} = 117.3$ para ILU; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$.

As três doses de FAc de *B. fagifolia* estudadas promoveram inibição das lesões gástricas em cerca de 47%, 69% e 46%, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo (Tween), indicando a presença do potencial efeito gastroprotetor. A dose de 25mg/Kg foi à escolhida para dar prosseguimento aos ensaios antioxidantes por apresentar melhor eficácia em comparação com as outras doses.

- Testes antioxidantes:

Danos oxidativos de membrana:

Determinação da peroxidação lipídica (LPO) e compostos sulfidrila (GSH)

Na tabela 9 são ilustrados dados referentes à determinação de LPO e GSH após tratamento com FAc de *B. fagifolia* e rutina em modelos de úlcera gástrica por etanol.

Tabela 9: Mecanismos antioxidantes (LPO e GSH) das FAc de *B. fagifolia* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	LPO (pmol MDA/mg proteína)	GSH (mM/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/Kg)	79.24 ± 5.39	0.17 ± 0.01
Sham	-	34.03 ± 2.29*	0.38 ± 0.02*
Rutina	200	26.65 ± 2.40*	0.29 ± 0.01*
<i>B. fagifolia</i>	25	28.53 ± 2.46*	0.29 ± 0.03*

ANOVA: $F_{(3,20)} = 51.97$ para LPO e $F_{(3,16)} = 22.33$ para GSH; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$

Os tratamentos com rutina e FAc de *B. fagifolia* produziram uma redução estatisticamente significativa da LPO quando comparados com o grupo controle negativo (Tween), sendo restabelecidos os níveis do grupo sham. Com relação à determinação de GSH, os tratamentos com rutina e FAc de *B. fagifolia* levaram a um aumento significativo na produção de GSH quando comparados com o grupo controle negativo (Tween); os níveis do grupo sham após os tratamentos foram restabelecidos.

Atividade enzimática:

Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR)

Na tabela 10 são ilustrados dados referentes às atividades das enzimas antioxidantes GPx e GR após o tratamento com FAc de *B. fagifolia* e rutina em modelos de úlcera gástrica por etanol.

Tabela 10: Mecanismos antioxidantes (atividade da GPx e GR) de FAc de *B. fagifolia* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	GPx (mM/min/mg proteína)	GR (mM/min/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/kg)	17.18 ± 0.87	12.32 ± 1.03
Sham	-	36.18 ± 1.99*	16.97 ± 0.64*
Rutina	200	32.92 ± 2.49*	26.06 ± 2.64**
<i>B. fagifolia</i>	25	8.07 ± 0.72*	10.32 ± 0.39

ANOVA: $F_{(3,17)} = 58.91$ para atividade da GPx e $F_{(3,19)} = 23.71$ para atividade da GR; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$;

A atividade da GPx após o tratamento com rutina apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparados com o grupo controle negativo (Tween); sendo restabelecidos os níveis do grupo sham. O tratamento com FAc de *B. fagifolia* levou a uma queda significativa na atividade da GPx quando comparado com o grupo controle negativo (Tween). Com relação a GR, o tratamento com rutina produziu aumento significativo na atividade da GR quando comparados com o grupo controle negativo (Tween) e os níveis sham foram restabelecidos com pequena melhora. O tratamento com FAc de *B. fagifolia* produziu uma diminuição estatisticamente significativa na atividade da GPx quando comparados com o grupo controle negativo (Tween).

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Na tabela 11 são ilustrados dados referentes à atividade das enzimas antioxidantes SOD após o tratamento com FAc de *B. fagifolia* e rutina em modelos de úlcera gástrica por etanol.

Tabela 11: Mecanismos Antioxidantes (atividade da SOD) de FAc de *B. fagifolia* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de etanol.

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	SOD (U/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/Kg)	26.10 ± 2.68
Sham	-	15.25 ± 1.93*
Rutina	200	6.76 ± 0.42*
<i>B. fagifolia</i>	25	8.34 ± 0.75*

ANOVA: $F_{(3,17)} = 32.74$ para atividade da SOD; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$.

Os tratamentos com rutina e FAc *B. fagifolia* apresentaram uma queda estatisticamente significativa da atividade da enzima SOD quando comparados com o grupo controle negativo (Tween). Os tratamentos permitiram observar uma melhora em relação aos níveis do grupo sham em cerca de duas vezes.

Byrsonima crassa na indução de úlcera por IR

- Índice de lesão ulcerativa (ILU):

Na tabela 12 são relatados os efeitos gastroprotetores de FAc de *B. crassa* rotina modelo de indução de úlcera por IR.

Tabela 12: Efeito da FAc de *B. crassa* sobre úlceras gástricas induzidas por IR em ratos.

Modelo Empregado	Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU	Inibição (%)
IR	Tween 80 12%	10 (ml/Kg)	8	77.16 ± 6.33	-
	Sham	-	7	9.12 ± 1.12 *	88.2 %
	Rutina	200	8	24.99 ± 1.96 *	67.6 %
	<i>B. crassa</i>	50	8	35.75 ± 4.49 *	53.7%

ANOVA: $F_{(3,17)} = 267.6$ para IU; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$

Os tratamentos com FAc de *B. crassa* e rutina promoveram uma diminuição significativa das lesões ulcerativas no estômago em até 67,6% e 53,7%, respectivamente, quando comparados ao controle negativo (Tween). O grupo sham é o controle do experimento, mostrando inibição da lesão ulcerativa em 88,2%, apresentando uma diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle negativo (Tween).

- Testes antioxidantes

Danos oxidativos de membrana:

Determinação da peroxidação lipídica (LPO)

Na tabela 13 são ilustrados dados referentes a determinação da peroxidação lipídica (LPO) após o tratamento com FAc de *B. crassa* e rutina em modelos de úlcera gástrica por IR.

Tabela 13: Mecanismos antioxidantes (LPO) da FAc de *B. crassa* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	LPO (pmol MDA/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/kg)	18.87 ± 1.92
Sham	-	10.91 ± 0.31*
Rutina	200	14.69 ± 1.24
<i>B. crassa</i>	50	15.22 ± 0.54

ANOVA: $F_{(3,24)} = 4,92$ para LPO; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$

Os tratamentos com FAc de *B. crassa* e rutina não apresentaram uma modificação estatisticamente significativa dos níveis de LPO quando comparados com o grupo controle negativo (Tween) e os níveis do grupo sham não foram restabelecidos.

Atividade enzimática:

Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR)

Na tabela 14 são ilustrados dados referentes à atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR em estômagos de ratos após o tratamento com FAc de *B. crassa* e rutina em modelos de úlcera gástrica por IR.

Tabela 14: Mecanismos Antioxidantes (atividade da GPx e GR) de FAc de *B. crassa* envolvido na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	GPx (mM/min/mg proteína)	GR (mM/min/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/kg)	16.10 ± 0.76	9.62 ± 0.65
Sham	-	53.58 ± 4.55*	17.36 ± 0.65*
Rutina	200	17.64 ± 1.28	25.53 ± 2.23*
<i>B. crassa</i>	50	19.32 ± 1.54	10.33 ± 0.72

ANOVA: $F_{(3,16)} = 51.13$ para atividade da GPx; e $F_{(3,26)} = 37.13$ para atividade da GR; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$.

Os tratamentos com rutina e FAc *B. crassa* não relataram uma diferença estatisticamente significativa na atividade da enzima GPx quando comparados com o grupo controle negativo (Tween). Com relação à GR, o tratamento com FAc *B. crassa* não apresentou uma modificação significativa na atividade da enzima SOD quando comparados com o controle negativo (Tween); entretanto, o tratamento com rutina permitiu o restabelecimento da atividade da GR.

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Na tabela 15 são ilustrados dados referentes à atividade das enzimas antioxidantes SOD em estômagos de ratos após o tratamento com FAc de *B. crassa* e rutina em modelos de úlcera gástrica por IR.

Tabela 15: Mecanismos Antioxidantes (atividade da SOD) de FAc *B. crassa* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	SOD (U/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/kg)	5.38 ± 0.58
Sham	-	2.87 ± 0.23**
Rutina	200	3.78 ± 0.37*
<i>B. crassa</i>	50	4.53 ± 0.33

ANOVA: $F_{(3,31)} = 5.97$ para atividade da SOD; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

O tratamento com FAc de *B. crassa* não apresentou diferença estatisticamente significativa na atividade da SOD quando comparado ao controle negativo (tween), não sendo os níveis do grupo sham restabelecidos. O tratamento com rutina permitiu observar uma queda estatisticamente significativa na atividade da enzima SOD quando comparados com o grupo controle negativo (Tween) e o restabelecimento da SOD aos níveis do grupo sham.

Byrsonima fagifolia na indução de úlcera por IR

- Índice de lesão ulcerativa (ILU):

Na tabela 16 são relatados o efeito gastroprotetor dos tratamentos FAc *B. de fagifolia* e rutina em estômagos de ratos após o tratamento com FAc de *B. crassa* em modelos de úlcera gástrica por IR.

Tabela 16: Efeito da FAc de *B. fagifolia* sobre úlceras gástricas induzidas por IR em ratos

Modelo Empregado	Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU	Inibição(%)
IR	Tween 80 12%	10 (ml/kg)	8	77.16 ± 6.33	-
	Sham		7	9.12 ± 1.12*	88.2 %
	Rutina	200	8	24.99 ± 1.96*	67.6 %
	<i>B. fagifolia</i>	25	5	24.01 ± 3.15*	68,8%

ANOVA: $F_{(3,19)} = 337.9$ para ILU; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$

Os tratamentos com FAc de *B. fagifolia* e rutina promoveram uma diminuição estatisticamente significativa das lesões ulcerativas em estômago de ratos em até 67,6% e 68,8%, respectivamente, quando comparados com o controle negativo (Tween).

- Testes antioxidantes:

Danos oxidativos de membrana

Determinação da peroxidação lipídica (LPO)

Na tabela 17 são ilustrados dados referentes a determinação da peroxidação lipídica (LPO) em estômagos de ratos após o tratamento com FAc de *B. fagifolia* e rutina em modelos de úlcera gástrica por IR.

Tabela 17: Mecanismos antioxidantes (LPO) das FAc de *B. fagifolia* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	LPO (pmol MDA/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/kg)	18.87 ± 1.92
Sham	-	10.91 ± 0.31*
Rutina	200	14.69 ± 1.24
<i>B. fagifolia</i>	25	16.96 ± 0.59

ANOVA: $F_{(3,24)} = 5.10$ para LPO; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$

Os tratamentos com FAc *B. fagifolia* e rutina não apresentaram uma alteração significativa de LPO quando comparados com o grupo controle negativo (Tween). Os níveis do grupo sham não foram restabelecidos.

Atividade enzimática:

Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR):

Na tabela 18 são ilustrados dados referentes à atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR em estômagos de ratos após o tratamento com FAc de *B. fagifolia* e rutina em modelos de úlcera gástrica por IR.

Tabela 18: Mecanismos Antioxidantes (atividade da GPx) de FAc de *B. fagifolia* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	GPx (mM/min/mg proteína)	GR (mM/min/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/kg)	16.10 ± 0.76	9.62 ± 0.65
Sham	-	53.58 ± 4.55*	17.36 ± 0.65*
Rutina	200	17.64 ± 1.28	25.53 ± 2.23*
<i>B. fagifolia</i>	25	16.44 ± 1.15	10.29 ± 0.88

ANOVA: $F_{(3,16)} = 56.08$ para atividade da GPx e $F_{(3,26)} = 35.89$ para atividade da GR; com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$.

Os tratamentos com FAc de *B. fagifolia* e rutina não permitiram observar uma modificação na atividade da enzima GPx quando comparado com o grupo controle negativo (Tween). Com relação à GR, após o tratamento com FAc de *B. fagifolia* e rutina não foram observadas diferenças significativas na atividade desta enzima, quando comparados com o controle negativo (Tween). Os níveis de atividade das enzimas GPx e GR do grupo sham não foram restabelecidos após os tratamentos com rutina e FAc de *B. fagifolia*.

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Na tabela 19 são ilustrados dados referentes à atividade das enzimas antioxidantes da SOD em estômagos de ratos após o tratamento com FAc de *B. fagifolia* e rutina em modelos de úlcera gástrica por IR.

Tabela 19: Mecanismos Antioxidantes (atividade da SOD) de Frações de *B. fagifolia* envolvidos na atividade antiulcerogênica de ratos submetidos ao modelo de IR

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	SOD (U/mg proteína)
Tween 80 12%	10 (ml/kg)	5.38 ± 0.58
Sham	-	2.87 ± 0.23**
Rutina	200	3.78 ± 0.37*
<i>B. fagifolia</i>	25	4.67 ± 0.44

ANOVA: $F_{(3,31)}=5.74$ para atividade da SOD; com teste a posteriori de Dunnet * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

O tratamento com rutina permitiu observar uma queda estatisticamente significativa na atividade da enzima SOD quando comparados com o grupo controle negativo (Tween) e os níveis do grupo sham foram restabelecidos. Após o tratamento com FAc *B. fagifolia* não foram observados efeitos da atividade da SOD quando comparado com o controle negativo (tween), não sendo os níveis do grupo sham restabelecidos.

5. DISCUSSÃO

Segundo Quan e Talley (2002) na patogênese da úlcera gástrica estão envolvidos a predisposição genética, secreção ácida alterada, rápido esvaziamento gástrico, problemas com os mecanismos de defesa da mucosa, estresse psicológico e físico, e tabagismo. Estudos revelam que em pelo menos 75% dos pacientes com úlcera péptica há uma infecção crônica pela bactéria *H. pylori* que, uma vez instalada, pode durar a vida inteira, a menos que seja erradicada por medicamentos antibacterianos (Guyton e Hall., 1998).

Procedimentos cirúrgicos no tratamento da úlcera péptica foram substituídos por intervenções farmacológicas, como a utilização de antagonistas de receptor H₂ e inibidores da bomba protônica, consideradas estratégias eficazes contra desordens gástricas (Brzozowski, 2003). Entretanto, esses agentes farmacêuticos não são completamente efetivos e podem provocar efeitos adversos (ALPER, 1993). Assim, extratos e princípios ativos de plantas serviriam como possíveis modelos para o desenvolvimento de novas drogas (Gonzales et al., 2000).

A atividade bioquímica e farmacológica dos constituintes químicos presentes em espécies vegetais, utilizadas como plantas medicinais por populações nativas, é a principal fonte de conhecimento e produção de medicamentos farmacêuticos (Souza Brito e Nunes, 1997). A presença de compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por apresentar inúmeras atividades farmacológicas, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo. Esses compostos englobam uma gama enorme

de substâncias, como: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas (Soares, 2002).

Baseado no conhecimento popular, fitoquímico e outras referências bibliográficas, a extração e o fracionamento das folhas de *Byrsonima crassa* Nied. e *Byrsonima fagifolia* Nied. tiveram como objetivo analisar o potencial efeito antioxidante das frações das mesmas na atividade antiulcerogênica, uma vez que estudos prévios realizados com extrato metanólico de *Byrsonima crassa* exibiu significativo efeito antiulcerogênico (Sannomiya et al., 2005)

A realização de uma análise fitoquímica preliminar pode identificar grupos de metabólitos secundários relevantes que estando ou não relacionados às atividades biológicas encontradas, puderam direcionar os rumos desta pesquisa. A FAc de *B. crassa* obtida através do extrato metanólico permitiu o isolamento de três flavonóides, dentre eles, os monoglicosilados (quercetina-3-*O*- α -L-arabinose e quercetina 3-*O*- β -D-galactoside) e um biflavonóide (amentoflavona) (Sannomiya et al., 2004).

Certos flavonóides, ou compostos com propriedades similares ao dos flavonóides, têm demonstrado atividade antiulcerogênica por proteger a mucosa em alguns modelos de indução de úlcera gástrica (Alarcón De La Lastra et al., 1992). Interesse especial é dado aos flavonóides que possuem um radical catecol, como os derivados da quercetina, que tem se revelado com expressiva atividade antioxidante (Gracioso et al., 2002; Gonzalez e Di Stasi., 2002). Dentre os muitos efeitos antioxidantes da quercetina está o seqüestro de radicais livres e inibição da enzima xantina oxidase (Chang et al., 1993). O efeito protetor do flavonóide quercetina frente alguns modelos de indução de úlcera gástrica, como nos

modelos de indução de úlcera por contenção e frio, ligadura de piloro (Martin et al., 1993) e administração de álcool absoluto (Alarcón De La Lastra et al., 1994).

Há também evidências do efeito antiinflamatório, antioxidante e antiulcerogênico de certos flavonóides, como a amentoflavona, descritos por Gambhir et al. (1978) e Goel et al. (1988).

O método baseado no reagente DPPH (2,2 di-fenil-2-pieryl-hidrazyl) é utilizado para analisar a atividade seqüestradora de radicais livres encontrada em extratos vegetais contendo polifenóis e aminas aromáticas, sendo uma técnica para triagem química de material biológico com potencial atividade antioxidante farmacológica (Ancerewicz et al., 1998).

Segundo Sannomiya et al (2003a), o fracionamento do extrato metanólico das folhas de *B. crassa* resultou no isolamento de quercetina-3-O-beta-D-galactopiranosídeo; a revelação com DPPH da placa contendo extratos e os flavonoídes isolados, mostrou que a atividade antioxidante de todos os constituintes foi positiva.

Diante da análise fitoquímica da FAc de *B. crassa* e de ensaio através da atividade de DPPH, além de referências na literatura, é sugerido um provável potencial antioxidante desta espécie, sendo este um dos mecanismos envolvidos na atividade antiulcerogênica e antiinflamatória desta planta.

Com relação a *B. fagifolia*, estudos realizados no Instituto de Química da UNESP da Araraquara revelaram a presença de compostos fenólicos, como alguns derivados de quercetina, ácido gálico, galato de metila e ácido galoil quinico. (Dados ainda não publicados)

Os antioxidantes, derivados dos compostos fenólicos, funcionam como seqüestradores de radicais livres e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. (Soares, 2002). Segundo Shahrzard et al. (2000) o ácido gálico apresenta forte atividade antioxidante, antimutagênica e atividade anticarcinogênica. Galato de metila é o principal constituinte fitoquímico dos chás verdes, uma conhecida bebida antioxidante bastante consumida na Ásia (Chen e Zang, 2003). A atividade seqüestrante de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica tem sido relatada como a principal atividade do galato de metila (CHO et al., 2003). Em adição, o galato de metila possui atividade antiplaquetária e protege o DNA contra danos provenientes do estresse oxidativo. Baratto et al. (2003) demonstraram a propriedade antioxidante do ácido galoil quínico através da sua atividade positiva para o teste de DPPH, do seqüestro de radicais superóxido e radical hidroxila.

Estudos etnofarmacológicos demonstraram o uso de espécies de *Byrsonima* no tratamento de problemas estomacais e de outras moléstias; desta forma, realizou-se o estudo da atividade antioxidante usando o reagente de DPPH para a espécie de *B. fagifolia* a fim de gerar subsídios para assegurar o uso desta planta pela população. A revelação dos extratos de *B. fagifolia* com DPPH demonstra a atividade antioxidante das frações e do extrato da folhas. (Sannomiya et al. 2003b).

Diante da análise fitoquímica da FAc de *B. fagifolia*, é sugerido que esta planta exerça uma provável atividade antioxidante, devido a presença de compostos fenólicos, como os flavonóides derivados da quercetina, ácido gálico, galato de metila e ácido galoil quínico, que apresentam atividade antioxidante já

descritas pela literatura. A atividade positiva de DPPH para FAc de *B. fagifolia* ressalta o potencial antioxidante da planta em estudo.

Com o intuito de comprovar os estudos etnofarmacológicos, após a análise fitoquímica, os experimentos farmacológicos foram iniciados. Para determinar as doses mais eficazes para execução dos experimentos o modelo de etanol foi referência para ambas as frações. Foram testados as FAc das *Byrsonimas* no modelo de indução de úlcera por etanol, sendo administrados aos animais, FAc *B. crassa* nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e FAc *B. fagifolia* nas doses de 12.5, 25 e 50 mg/Kg. Em relação aos resultados obtidos, as doses de 50 mg.kg⁻¹ para FAc *B. crassa* e 25 mg/kg para FAc *B. fagifolia* foram as escolhidas, visto que, as mesmas foram as mais significativas na avaliação de eficácia.

A atividade antioxidante das FAc de *B. crassa* e FAc de *B. fagifolia* é estudada na mucosa gástrica de ratos submetidos a úlceras gástricas por etanol e por IR, os quais atuam por diferentes mecanismos de geração de EROs e mimetizam a úlcera no homem.

A geração de EROs é apontada como um dos fatores mais importantes envolvidos no desenvolvimento da úlcera gástrica, sendo induzida por diversos fatores, como: etanol, antiinflamatórios não-esteroidais, estresse e isquemia e reperfusão (De la Lastra et al., 1997; El-Abhar et al., 2003; Hassan et al., 1997; Kwiecień et al., 2002).

A administração do etanol absoluto diretamente no estômago de animais causa edema no tecido, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias que podem contribuir para indução dos danos na mucosa e

geração de EROs (Kountouras et al., 2001). As úlceras aparecem devido à ação necrotizante do etanol na mucosa gástrica, com menor participação da secreção gástrica (Lewis e Hanson, 1991; Evans, 1996).

Os índices de lesão ulcerativa observados no modelo de etanol, permitiu a visualização de uma proteção com os tratamentos com FAc de *B. crassa* e FAc de *B. fagifolia* significativos em relação aos apresentados pelos controle negativo (tween), sugerindo um efeito gastroprotetor das espécies em estudo.

A geração de EROs no modelo de etanol é evidenciada pelo aumento na liberação de LPO da mucosa gástrica (Mizui et al., 1986; Kahraman et al., 2003) e diminuição na quantidade de GSH (Bagchi et al., 1998; Melchiorri et al., 1997). A liberação de O_2^- neste tipo de lesão pode estar relacionada à produção de acetaldeído, formado pela ação da álcool desidrogenase sobre o etanol. O acetaldeído serve como substrato para a xantina oxidase (enzima chave no metabolismo das purinas), a qual produz radicais livres (Hiraishi et al., 1999; Koch et al., 2004; Steinbeck et al., 1993). A infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, também pode se configurar como fonte de EROs (La Casa et al., 2000).

Nossos resultados estão de acordo com os descritos pela literatura sendo observado um aumento na LPO e depleção nos níveis de GSH nos animais expostos à ulceração por etanol. O decréscimo na quantidade de GSH pode estar ligado a sua oxidação por metabólitos tóxicos do etanol ou por sua ligação ao acetaldeído, sintetizado pela álcool desidrogenase ou, ainda, por uma diminuição em sua síntese (Bilici et al., 2002). Loguercio e colaboradores (1993) reportam que

o etanol pode reduzir drasticamente os níveis de cisteína, um importante aminoácido para a síntese de glutathione. O tratamento com FAc *B. crassa*, FAc *B. fagifolia* e rutina permitiu a manutenção da produção de LPO e depleção dos níveis de GSH.

Recentes estudos têm demonstrado que EROs, como os radicais O_2^- , os radicais $\cdot OH$ e peroxidação lipídica, desempenham um papel importante na patogênese da úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, pois as mesmas promovem severas mudanças celulares, conduzindo à morte celular. O ataque do etanol aos constituintes celulares, como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e peroxidação de ácidos graxos, resultam em formação de compostos tóxicos, como radicais peroxil, hidroperóxidos e fragmentação de lipídeos. (Kahraman et al., 2003).

Na úlcera induzida por etanol absoluto ocorrem diversas alterações no sistema de defesa antioxidante endógeno, como redução na atividade das enzimas GPx e GR, e aumento da atividade da SOD (Rukkumani et al., 2004). O ciclo “redox” da glutathione desempenha importante papel para garantir a integridade da mucosa em exposição ao etanol. Hiraishi e colaboradores (1999) demonstraram que a diminuição na síntese de GSH e inibição da GR implicaram em maior susceptibilidade à lesão das células epiteliais do estômago, *in vitro*.

Os resultados obtidos em nossos experimentos se mostraram de acordo com os descritos pela literatura, sendo observadas a queda na atividade da enzima GPx e GR e aumento na atividade da SOD para o grupo exposto à ação deletéria do etanol. No tocante ao estudo dos grupos tratados com FAc de *B.*

crassa, FAc de *B. fagifolia* e rutina, foi possível observar manutenção da atividade da SOD em comparação ao controle negativo. Os tratamentos com FAc de *B. crassa* e rutina promoveram manutenção da atividade das enzimas GPx e GR. A administração de rutina promove aumento na atividade da GPx e GR estando este de acordo com os resultados obtidos com o tratamento com etanol 50% (v/v), realizado por La Casa e colaboradores (2000). Com relação ao tratamento com FAc de *B. fagifolia* foi observado uma queda na atividade das enzimas GPx e GR, quando comparadas com o controle negativo, resultados esses que necessitam de experimentos complementares para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos.

A mucosa do trato gastrointestinal está exposta regularmente a substâncias potencialmente prejudiciais, incluindo aquelas ingeridas ou exógenas (álcool, aspirina, etc.) e secreções endógenas (ácido, sais biliares); eventualmente, a mucosa não é capaz de resistir aos danos causados por essas substâncias, mas tem uma notável capacidade reparativa quando o dano é produzido (Wallace e Devchand, 2005).

Os danos gerados no processo de indução de úlcera por etanol absoluto são multifatoriais, ou seja, podem se dar por diferentes mecanismos, como: ação direta do etanol sobre a mucosa gástrica, liberação de substâncias vasoativas, diminuição do muco, interferência na produção de cisteína, aumento da respiração celular devido à produção de acetaldeído, com ativação do sistema xantina oxidase. Estes mecanismos, de uma forma ou outra, acabam desencadeando na liberação de radicais livres ou mesmo interferindo na ação do sistema antioxidante

endógeno. A produção de radicais livres no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol se dá de uma forma indireta. Segundo Kim et al. (2005) a produção de EROs desempenha um papel crucial no desenvolvimento de úlceras gástricas induzidas pelo etanol.

O epitélio gástrico é coberto por uma camada contínua de muco aderente (Johansson et al. 2000). Esse gel mucoso, juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio, serve como uma barreira tamponante contra o ácido no lume (Lyn e Brooks, 1991). O muco, além de barreira física contra ação de substâncias lesivas, exerce também um importante papel na proteção da mucosa gástrica contra EROs. A ação das glicoproteínas presentes no muco confere a ele uma ação antioxidante (Mojzis, 2000). Um decréscimo de muco na mucosa gástrica deixa a mesma mais susceptível à ação de agentes oxidantes; o etanol tem a capacidade de degradar o muco aderente presente na porção glandular de estômago (Repetto, 2003).

A soma dos resultados observados no modelo de etanol, quanto ao índice de lesão ulcerativa e dosagens bioquímicas após tratamento com FAc de *B. crassa* e FAc de *B. fagifolia*, sugere significativa atividade antiulcerogênica. Entretanto, apenas com o modelo de etanol (visto que, o mesmo causa danos à mucosa gástrica por mecanismos multifatoriais) não se pode afirmar com precisão o efeito antioxidante protetor das FAc de *B. de crassa* e FAc de *B. de fagifolia*.

A proteção após o tratamento com as *Byrsonimas* pode se dar pela atividade seqüestrante de radicais livres ou modulação do sistema enzimático, ação exercida pelos flavonóides presentes em ambas as frações, ou mesmo pela

ação mecânica e seqüestrante de radicais livres pelo muco. Neste último caso, as *Byrsonimas* atuam sobre a modulação de PGE₂, uma vez que mecanismos de citoproteção através desta tem um papel muito importante na modulação da defesa e reparo na mucosa gástrica (Wallace e Ma, 2001). Lesões gástricas induzidas por etanol são dose-dependentes e podem ser impedidas pela ação de prostaglandinas endógenas (PGE₂), que inibem a motilidade gástrica e aumentam a secreção de muco (Araki et al., 2000).

Na úlcera gástrica induzida por um período de isquemia, seguido de reperfusão, a liberação de EROs é relatada como o evento patológico central (Brzozowski et al., 1999; Andrews et al., 1992; Itoh e Guth, 1985; Wadhwa et al., 1987; Yoshikawa et al., 1989). A utilização de compostos antioxidantes e “scavengers” de radicais livres têm se mostrado benéfico em animais expostos a este processo (Derin et al., 2004; Derin et al., 2005; Naito et al., 1999; Sakurai et al., 1994). A isquemia por si só é capaz de provocar lesões no tecido gástrico; entretanto, é após a reperfusão que ocorrem os principais eventos lesivos. Dependendo do tempo de exposição à isquemia e hipóxia, as lesões teciduais podem ser reversíveis ou irreversíveis (Campos e Yoshida, 2004).

Durante a isquemia, ocorre um aumento no nível de cálcio citosólico, levando a várias disfunções celulares, como a conversão de xantina desidrogenase à xantina oxidase e a catabolização de ATP à hipoxantina. Com a reperfusão, a hipoxantina é metabolizada pela xantina oxidase formando O₂⁻ e H₂O₂ (Derin et al., 2004). Outras fontes de geração de radicais livres no processo de IR são os neutrófilos que liberam O₂⁻, através da enzima NADPH oxidase, além

de proteases e collagenases (Andrews et al, 1994; Derin et al., 2004; Erkasap et al., 2003; Naito et al., 1998).

Os índices de lesão ulcerativa observados com os tratamentos de FAc de *B. crassa*, FAc *B. fagifolia* e rutina no modelo de indução de úlcera por IR, apresentam diminuição das lesões ulcerativas quando comparadas ao grupo controle negativo (tween), mostrando atividade antiúlcera significativa. Os tratamentos com FAc de *B. crassa* e FAc de *B. fagifolia* promoveram uma proteção em cerca de 53% e 69%, respectivamente. Estes resultados ressaltam o pressuposto de que os tratamentos com FAc de *B. crassa* e FAc de *B. fagifolia* exercem ação protetora sobre a mucosa gástrica em modelo de liberação de radicais livres. A proteção observada com o tratamento com rutina após o modelo de indução de úlcera por IR foi de cerca de 68%.

Campos e Yoshida (2004) descrevem que mucosas gástricas expostas a períodos de IR podem sofrer aumento na peroxidação lipídica devido à ação de EROs, as quais desenvolvem um papel importante na patogênese das injúrias gástricas.

Nossos resultados mostraram-se de acordo com os descritos pela literatura, sendo observados aumento de LPO no grupo controle negativo; entretanto, o tratamento com FAc de *B. crassa* não evitou estes danos oxidativos. Resultados similares foram observados no tratamento com FAc de *B. fagifolia*. O tratamento com rutina também se mostrou ineficaz na manutenção dos níveis de LPO. Uma explicação possível para este resultado seria a de que os flavonóides em estudo,

não apresentam uma glicosilação na posição C-7, a qual confere ao flavonóide a capacidade em inibir a LPO, conforme citado por Hodnick et al., (1997)

Diversos trabalhos mostram redução da atividade das enzimas SOD, GPx e GR na mucosa gástrica lesada pela oclusão da artéria celíaca, seguida de reoxigenação do estômago (Derin et al., 2004; El-Abhar et al., 2003; Kwiecień et al., 2002). De acordo com a literatura, o grupo não tratado e exposto ao modelo de IR, grupo controle negativo, apresentou uma diminuição nas atividades da GPx e GR. Em nossas condições experimentais, contrariando a literatura, as atividades da enzima SOD se mostraram aumentadas no controle negativo. Uma hipótese possível para este resultado se deve ao fato de que a IR promove um estado de estresse oxidativo, com grande liberação O_2^- , que por sua vez, aumenta a atividade da enzima SOD. Os tratamentos com FAc de *B. crassa*, FAc de *B. fagifolia* e rutina não proporcionaram alterações nas atividades destas enzimas.

Os flavonóides em estudo, quercetina e amentoflavona, apresentam em sua conformação estrutural a presença de hidroxilas na posição C3' e outra na C4' que confere aos mesmos a capacidade de seqüestrar radicais livres (Harbone e Williams, 2000; Di Carlo et al., 1999; Van Acker et al., 1998, BEECHER, 2003).

DI CARLO et al. (1999) sugeriram que o efeito gastroprotetor da rutina, um derivado da quercetina, poderia ser parcialmente explicado através da formação de um complexo citoprotetor na mucosa gástrica, que não dependeria de prostaglandinas, mas sim do aumento de glicoproteínas e da viscosidade do muco protetor na mucosa gástrica. Tais efeitos seriam devido à ação direta dos flavonóides sobre a mucosa gástrica. Estes mesmos autores referiram-se a uma

possível propriedade de seqüestrar radicais livres, a qual poderia também contribuir para a atividade antiulcerogênica do flavonóide rutina. O muco gástrico é um fator de proteção antiúlcera e no processo de IR há diminuição deste fator defensivo do epitélio gástrico aumentando a formação de úlceras pelo suco digestivo (Cabeza et al., 2001).

Uma possível explicação para o sistema enzimático não ter sido restabelecido aos níveis do grupo sham no modelo de IR pode ser pelo fato da liberação de radicais livres ser diretamente da artéria celíaca para a mucosa. Neste caso, a proteção mecânica do muco é pequena. A proteção na mucosa gástrica exercida pelo muco através do seqüestro de radicais livres que aliado aos compostos antioxidantes das frações em estudo, podem ser responsáveis pela atividade antioxidante.

Diante dos resultados obtidos do modelo de indução de úlcera por IR, através do ILU e análises bioquímicas é possível sugerir que o efeito antioxidante das FAc de *B. crassa* e *B. de fagifolia* pode se dar através do seqüestro de radicais livres aliados a outros mecanismos de proteção da mucosa gástrica exercidos pela ação dos flavonóides, como o da síntese de muco. Segundo Mojziz et al., (2001) alguns flavonóides estimulam a produção de muco e também exercem atividade antioxidante.

6. CONCLUSÕES

- As espécies de *Byrsonima* apresentam atividade antiulcerogênica nos modelos de indução de úlcera gástrica por etanol e isquemia/reperfusão através da inibição das lesões ulcerativas.
- O potencial antioxidante é evidenciado através dos parâmetros bioquímicos quantificados e análise da estrutura-atividade dos compostos majoritários das frações analisadas.
- O seqüestro de radicais livres é apontado como o mecanismo mais provável para esta ação antioxidante.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (dp) para índice de lesão ulcerativa (ILU); e média \pm erro padrão da média (epm) para os ensaios da atividade antioxidante. Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett, com nível de significância igual ou menor a 0,05 em comparação ao grupo controle negativo.

8. REFERÊNCIAS

Aherne SA, O'Brien, N M Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition* 2002; 18: 75-81.

Alarcón de La Lastra C, Martín MJ, Marhuenda E. Gastric anti-ulcer activity of silymarin, a lipoxygenase inhibitor, in rats. *J Pharm Pharmacol* 1992; 44(11): 929-31.

Alarcon de la Lastra C, Martin MJ, Motilva, V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology* 1994; 48(1):56-62.

Allen JC, Hamilton, RJ. Rancidity in foods. *Applied Science* 1983; 199.

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

Amarquaye A, Che CT, Bejar E, Malone MH, Fong HHS. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Med* 1994; 60(1): 85-86.

Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R et al. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(1):113-20.

Anderson WR. Malpighiaceae. Botany of the Guiana Highland- Part XI. *Bot Gard* 1981. p. 21-305. v.32.

Andreoli TE. Physiology in medicine: Free Radicals and oxidative stress. *American Journal Medicine* 2000; 108: 650-51.

Andrews FJ, Malcontenti C, O'Brien PE. Sequence of gastric mucosal injury following ischemia and reperfusion. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig.Dis.Sci* 1992; 37(9): 1356-61.

Andrews FJ, Malcontenti C, O'Brien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci* 1994; 39(2):366-373.

Araki H, Ukawa H, Sugawa Y, Yagi K, Suzuki K, Takeuchi K. The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of prostaglandin E2 in rat stomach. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 1:116-124.

Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biology e Medicine* 1996; 20(5): 675-705.

Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Krohn RL, Bagchi DJ, Garg A et al. Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *J Appl Toxicol* 1998; 18 (1): 3-13.

Baker RD, Cook CO, Goodwin DC. Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. *Biochem Bioph Res CO* 2004; 320(3):833-9.

Baratto MC, Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Romani A, Visioli, F et al. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. *Free Radic Res* 2003; 37(4): 405-12.

Barreiros ABS, David JM. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 2006; 1: 113-123.

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 2003; 133(10):3248S-3254S.

Beljanski M, Crochet S. Differential effects of ferritin, calcium, zinc and gallic acid on vitro proliferation of human glioblastoma cells and normal astrocytes. *J Lab Clin Med* 1994. 123: 547-55.

Bilici D, Süleyman H, Banoglu, ZN, Kiziltunç A, Avci B, Çiftçioglu, A et al. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci* 2002; 47 (4): 856-61.

Boreli F, Izzo AA. Review article: The plant Kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res* 2000; 14: 581-91.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Radical chemistry of flavonoid antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 1990; 264:165-70.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem* 1976; 72: 248-54.

Breecher GR. Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet. *Foods and Nutrition Consultant* 2003; 133: 3248S-3254S.

Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Stachura J et al. Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. *Eur.J.Pharmacol* 1999; 385(1): 47-61.

Brzozowski T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – Polish achievements. *J. Physiol. Pharmacol* 2003; 54(3): 99-126.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods enzymol* 1989; 303-310.

Cabeza J, Motilva, V., Martín, M.J., Alarcon de la Lastra, C. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sciences* 2001; 68: 1405-15.

Caceres A, Figueroa L, Taracena AM, Samayoa B. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases. Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. *J Ethnopharmacol* 1993; 39(1): 276-8.

Campos EBP, Yoshida WB. O papel do radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *J Vasc Br* 2004; 3(4): 357-66.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113: 484-490.

Chang YT, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xantine oxidase. *Anticancer Res* 1993; 13: 2165-70.

Chen A, Zhang L. The antioxidant (-)- epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation in vitro by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor- α receptor. *J Biol Chem* 2003; 278: 23381-9.

Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Shibahara N, Park JC. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicina* 2003; 10: 544-51.

Das D, Banerjee RK. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1993; 125: 115-25.

Das D, Bandypadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology e Medicine* 1997; 23(1): 8-18.

Das D, Bandypadhyay D, Banerjee RK. Oxidative inactivation of gastric peroxidase by site-specific generation of hydroxyl radical and its role in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology e Medicine* 1998; 24(3): 460-9.

De la Lastra CA, Cabeza J, Motilva V, Martin MJ. Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pineal Res* 1997; 23(2): 47-52.

Derin N, Agac A, Bayram Z, Asar M, Izgut-Uysal VN. Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochem.Funct* 2005. (Epub ahead of print).

Derin N, Izgut-Uysal VN, Agac A, Aliciguzel Y, Demir N. L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J.Physiol Pharmacol* 2004; 55(3): 595-606.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA; Capasso F. Review article: Flavonoids – Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 1999; 65(4): 337-53.

Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo; 2002. p.1-605 v.1.

El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J.Ethnopharmacol* 2003; 84(2-3): 251-8.

Erkasap N, Uzuner K, Serteser M, Koken T, Aydin Y. Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats. *Peptides* 2003; 24(8): 1181-7.

Evans, F. *The gastro-intestinal Tract. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of plant Material* 1996; 25-45.

Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In *Analysis of free radicals in biological systems*. Ed. Verla Bostonp; 1995. p.237-48.

Ferreira CM. O mercado de plantas medicinais em Manaus. In: *A floresta em jogo: o extrativismo na Amazônia Central*. São Paulo: Editora UNESP: Imprensa Oficial do Estado; 2000. p.177-81.

Gambhir SS, Goel RK, Das Gupta G. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activity of amentoflavone. *J Méd Res* 1978; 85: 689.

Gardner HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology e Medicine* 1989; 7: 65-86.

Gelejinse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonóide intakes with incident myocardial infarction: The Rotterdam study. *Am J. Clin Nutr* 2002; 75: 880-6.

Glavin G, Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB J* 1992; 6:825-31.

Goel RK, Gambhir SS, Das Gupta G. Mechanism of anti-ulcerogenic effect of amentoflavone. *Indian J Med Res* 1988; 88: 192-6.

Gonçalves F, Portella T, Stipp E, Di Stasi L. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Mautenus aquifolium*, *Sorocea blomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *J. Ethnopharm* 2001; 77: 441-7.

Gonzales E, Iglesias I, Carretero E, Villar A. Gastric cytoprotection of bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol* 2000; 70: 329-33.

Gonçalves FG, Di Stasi L. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine* 2002; 9(2):125-34.

Govindarajan R, Vijavakumar M, Singh M, Rao CHV, Shirwaikar A, Rawat AK; et al. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. *J Ethnopharmacol* 2006; 106(1): 57-66.

Gracioso JS, Vilegas W, Hiruma-Lima ACA, Souza-Brito ARM. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. On mouse gastric mucosa support the Turneracea as a new source of antiulcerogenic drus. *Biol Pharm. Bull* 2002; 25:487-91.

Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 584: 47-63.

Gretzer B, Ehrlich K, Maricic N, Lambrecht N, Respondek M, Peskar BM. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors and their influence on the protective effect of a mild irritant um the rat stomach. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 927-35.

Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores femain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995; 307:93-98.

Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday. *Molecular Aspect of Medicine* 2006; 27: 1-93.

Gutteridge JMC. Invited review free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Rad. Res. Commun* 1993; 19: 141-158.

Guyton AG, Hall JE. *Fisiologia Humana e Mecanismos de Doenças*. Rio de Janeiro. 6ª edição Ed. Guanabara Koogan; 1998.

Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *Faseb J* 1987; 1: 358-364.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press 1991.p. 543.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet* 1994; 344: 721-724.

Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Chem. Toxic* 1995; 33(7): 601-617.

Halliwell, B. Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radic Res* 1998; 29(6):469-86.

Halliwell B, Gutteridge JMC. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2ª ed. Oxford University Press; 1998.

Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31:261-72.

Halliwell, B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 355: 1179 -1180. 1187. 2000.

Hamburger M, Hostettman K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem* 1991; 30: 3864-74.

Harbone JF, Williams CA. Review - Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55:481-504.

Haruma K, Ito M. Review article: clinical significance of mucosal-protective agents: acid, inflammation, carcinogenesis and rebamipide. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 (1): 153-159.

Hassan M, Kashimura H, Matsumaru K, Nakahara A, Iwata R, Hayashi T et al. Gastric mucosal injury induced by local ischemia-reperfusion in rats. Role of endogenous endothelin-1 and free radical. *Dig.Dis.Sci*; 1983; 42(7): 1375-80.

Havsteen B. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 1141-8.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol e Therapeutics* 2002; 96 (2-3): 67-202.

Hawkey CJ e Rampton DS. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology*; 1985; 89: 1162-88.

Hawkey CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 2000; 119: 521-35.

Hawkey CJ, Lanas AI e Sardinia NS. Doubt and certainty about nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the year 2000: a multidisciplinary expert statement. *Am J Med* 2001; 110(1A): 79S-100S.

Hiraishi H, Shimada T, Ivey KJ e Terano A. Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289 (1): 103-109.

Hiruma-Lima CA., Calvo TR, Rodrigues CM, Andrade FDP, Vilegas W e Souza-Brito ARM. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneifolia*: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. *J Ethnopharmacology* 2005; 104: 215-224.

Hodnick WF e Sartorelli AC. Measurement of dicumarol-sensitive NADPH: (menadione-cytochrome c) oxidoreductase activity results in an artifactual assay of DT-diaphorase in cell sonicates. *Anal Biochem* 1997; 252(1): 165-168.

Hostettmann K. History of a plant: the example of *Echinacea*. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2003; 10 (1): 9-12.

Hsieh T, Liu T, Chia Y, Chen C, Lue F, Chuang M et al. Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 843-50.

Husain SR, Cillard J e Cillard P, *Phytochemistry* 1987; 26: 2489.

Imai H e Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(2): 145-69.

Inoe M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y e Yabu Y. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biophys Res Commun* 1994; 204:898-904.

Inoe M, Suzuki R, Sakaguchi N, Li N, Takeda T, Ogihara Y et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1526-30.

Itoh M e Guth PH. Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* 1985; 88(5 Pt 1): 1162-1167.

Ito M, Suzuki Y, Ishihara M, Suzuki Y. Anti-ulcer effects of antioxidants: effect of probucol. *European Journal of Pharmacology* 1998; 354: 189-196.

Johansson M, Synnerstand I, Holm L. Acid transport through channels in the mucous layer of rat stomach. *Gastroenterol* 2000; 119: 1297-1304.

Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol.Aspects Med* 2005; 26(4-5): 340-352.

Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals. *Flavonoids in health and disease* 1998; 137-161.

Júnior AAJ, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vanucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. *Medicina Ribeirão Preto* 1998; 31: 434-49.

Júnior LR, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metanólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova* 2001; 1: 112-119.

Kahraman A, Erkasap N, Köken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidant and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 2003; 183: 133-142.

Kawano S, Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *J. Gastroenterol. Hepatol* 2000; 15: D1-6.

Kim JM, Choi SM, Kim DH, Oh TY, Ahn BO, Kwon JW et al. Combined use of omeprazole and a novel antioxidative cytoprotectant for the treatment of peptic ulcer. Facilitation of ulcer healing in experimental animals. *Arzneimittelforschung* 2005; 55(7): 387-93.

Kitano M, Bernsand M, Kishimoto Y, Norlen P, Hakanson R, Haenuki Y et al. Ischemia of rat stomach mobilizes ECL cell histamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(5): G1084-G1090.

Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farre S et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med* 2004; 25 (1-2): 191-198.

KoNturek PK, Brozowski T, Konturek SJ, Dembinski A. Role of epidermal growth factor, prostaglandin and sulphhydryls in stress-induced gastric lesions. *Gastroenterology* 1990; 99: 1607-15.

Kountouras J, Chatzopoulos D, Zavos C. Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 743-51.

Kushima H. Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davila elliptica* St. e *Davila nitida* (Vahl) Kuitzki (Dilleniaceae). [Dissetação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2006.

Kutchai HC. Gastrointestinal secretions. In: principles of Physiology. St. Louis, Missouri: Ed. Berne RM, Levy MN; 1996. p.516-589.

Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J.Physiol Pharmacol* 2002; 53(1): 39-50.

La Casa C, Villegas I, De La Lastra A, Motilva V, Calero MJM. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J of Ethnopharmacology* 2000; 71 : 45-73.

Lewis DA, Hanson PJ. Anti-ulcer drugs of plant origin In: GP Ellis, GB West. *Progress Medicinal Chemistry*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers 1991; 28: 201-231.

Lewis DA, Shaw GP. A natural flavonóide and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 92-100.

Loguercio C, Taranto D, Beneduce F, Del Vecchio Blanco C, De Vincentiis A, Nardi G et al. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut* 1993; 34 (2):161-5.

Lorenzi H; Matos FJA. *Plantas Mediciniais no Brasil nativas e exóticas*. Intituto Plantarium 2002; 16.

Luiz-Ferreira A. *Atividade Antiulcerogênica da espécie Anacardium humile St. Hil (Anacardiaceae)*. [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2005.

Lynn RB, Brooks FP. "Ulcer Disease: Investigation and Basis for Therapy". New York: Ed. Swabb EA., Szabo S, Dekker M; 1991. p23-29.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga-Jr VF. Plantas Mediciniais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova* 2002; 25(3): 429-38.

Martin MJ, Motilva V, Alarcon De La Lastra C. Quercetin and naringenin, effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. *Phytotherapy research* 1993; 7 (2): 150-3.

Martinez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tunón MAJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutri. Hosp* 2002; 17: 271-8.

McCord, JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The Amer J of Med* 2000; 108: 652-9.

Melchiorri D, Sewerynek E, Reiter R., Ortiz GG, Poeggeler B, Nistico G. Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. *Br J Pharmacol* 1997; 121 (2): 264-70.

Mincis M, Chebli JM, Khouri ST, Mincis R. Ethanol and the gastrointestinal tract. *Arq Gastroenterol* 1995; 32(3): 131- 9.

Mizui T, Doteuchi M. Lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sciences* 1986; 38 (23): 2163-7.

Mojzis, J, Hegedusova R, Mirossay L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res* 2000; 49(4): 441-446.

Mojzis J, Hviscova K., Germanova D, Mirossay L. Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res* 2001; 50(5): 501-6.

Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 2003; 26(10): 1398-1402.

Montanari JI, Aspectos da Produção Comercial de Plantas Medicinais Nativas, Campinas/ BRASIL. CPQBA-UNICAMP; 2002.

Morimoto Y, Oshima S, Hara H, Sukamoto T. Effects of Kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jap. J. Pharmacol* 1991; 57: 495-505.

Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Yagi N, Arai M, Nakamura Y et al Effect of novel histamine H₂ receptor antagonist, IT-066, on acute gastric injury induced by ischemia-reperfusion in rats, and its antioxidative properties. *Europ J Pharm* 1995; 294: 47-54.

Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Yagi N, Arai M, Nakamura Y et al. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(3): 494-502.

Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Yagi N, Kasai K, Sugimoto N et al. Effect of vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in nitric oxide-depleted rats. *Aliment.Pharmacol.Ther* 1999; 13(4): 553-9.

Newman DJ, Gragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Product* 2003; 66: 1022-37.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal.Biochem* 1979; 95(2): 351-8.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamands EP, Soleas G, Goldberg D. The red wine phenolics trans- resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection in against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995; 219: 207-19.

Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am. J. Physiol* 1988; 254: 768G-74G.

Peres W. Radicais livres em níveis biológicos. Brasil: Ed. Universidade Católica de Pelotas 1994. p.49-81.

Perry MO. Oxygen free radical scavengers in acute ischemia and reperfusion syndromes. In: Ernest CB, Stanley JC. *Current Therapy in Vascular Surgery* 1991; 600-604.

Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63(7): 35-1042.

Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol or aspirin-induced gastric injury. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 1395-1401.

Quan C, Talley NJ. Management of peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or NSAIDs. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(12): 2950-61.

Repetto MG, Liesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002; 35: 523-34.

Repetto M, Maria A, Guzmán J, Giordano O, Llesuy S. Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 551-7.

Richardson CT. Úlcera péptica. In: Tratado de Medicina Interna. Ed. Guanabara Koogan; 1993. p. 663-667.

Rukkumani R, Aruna K, Varma PS, Rajasekaran KN, Menon VP. Comparative effects of curcumin and an analog of curcumin on alcohol and PUFA induced oxidative stress. *J Pharm Pharm Sci* 2004; 7(2): 274-283.

Sakurai T, Sugawara H, Saito K, Kano Y. Effects of the acetylene compound from *Atractylodes* rhizome on experimental gastric ulcers induced by active oxygen species. *Biol.Pharm.Bull* 1994; 17(10): 1364-1368.

Sanioto DL. Sistema digestivo: secreção e digestão. In: Fisiologia. Ed. Guanabara Koogan, 1991.

Sannomiya M, Hiruma-Lima C A, Souza-Brito ARM, Vilegas W. Atividade antioxidante de um flavonóide glicosilado isolado de *Byrsonima crassa*. VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais Out/ 2003, 2003(a).

Sannomiya M, Figueiredo ME, Tiene MRF, Hiruma-Lima CA., Souza-Brito, Vilegas W. Investigação da atividade antioxidante de *Byrsonima fagifolia*. VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Out/2003, 2003 (b).

Sannomiya M, Rodrigues CM, Coelho RG, Dos Santos LC, Hiruma-Lima CA. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). *Journal of Chromatography A* 2004; 1035: 47-51.

Sannomiya M, Fonseca VB, Silva MA, Rocha LRM, Santos LC, Hiruma-Lima CA et al. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J. Ethnopharmacol* 2005; 97: 1-6

Seno K, Joh T, Yokoyama Y, Itoh M. Role of mucus in gastric mucosal injury induced by local ischemia/reperfusion. *J Lab Clin Med* 1995; 126(3):287-93.

Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A., Bitsch I. Pharmacokinetics of Gallic Acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr* 131: 1207-1210, 2001.

Simões CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2002. p. 833

Silverthorn, D. U. *Fisiologia Humana: Uma abordagem Integrada*; 2003. 20: 603-634.

Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidants. *Rev Nutri* 2002; 15(1): 71-81.

Souza-Brito ARM, NUNES DS. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. *Ciência e Cultura* 1997; 49(5-6), 402-408.

Souza-Brito ARM. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. *J.Ethnopharmacol* 1996; 54: 131-8.

Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J Biol Chem* 1993; 268 (21): 15649-54.

Szabo S, Vattay P. Experimental gastric and duodenal ulcers. *Gastroenterology Clin N Am* 1990.19: 67-85.

Szelenyi I, Thiemer K. Distensions ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Arch. Toxicol* 1978; 41: 99-105.

Ueda S, Yoshikawa T, Takahashi S, Ichikawa H, Yasuda M, Oyamada H et al. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* 1989; 162: 55-8.

Van Acker SA, Van Balen GP, Van Den Berg DJ, Bast A, Van der Vijgh WJ. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1998, 56(8): 935-43.

Wadhwa SS, Perry MA. Gastric injury induced by hemorrhage, local ischemia, and oxygen radical generation. *Am J Physiol* 1987; 253(2 Pt 1): G129-G133.

Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *Faseb J* 1996; 10: 731-740.

Wallace JL, MA L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense e injury. *Exp. Biol. Med* 2001; 226: 1003-1115.

Wallace JL, Devchand PR. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. *Br J Pharmacol* 2005; 1-8.

Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J.Lab Clin.Med* 1975; 85(2): 337-341.

Wolfe MM, Soll AH. The physiology of gastric acid secretion. *N Engl J Med* 1988; 319 (26): 1707-15.

Yang K, Lamprecht SA, Liu Y. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis* 2000. 21: 1655- 60.

Yoshikawa T, Ueda S, Naito Y, Takahashi S, Oyamada H, Morita Y, Yoneta T, Kondo M. Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res Commun* 1989; 7(3-6): 285-291.

Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Inuma S et al. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 1993; 34(6): 732-7.

Wang, Y, Luo Y H, Yan J. Detection of cagA gene, CagA protein in *Helicobacter pylori* isolates and its antibody in serum of patients with gastric diseases by a recombinant protein CagA1. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; 34:223-229.

Yuan Y, Padol IT, Hunt RH. Peptic ulcer disease today. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3(2): 80-89.

Zimemerman BJ, Granger DN. Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: role in ischemia-reperfusion injury. *Hepatol Gastroenterol* 1994; 41: 337-42.

Zoppi CC, Antunes-Neto J, Castanho FO, Goulart FO, Motta e Moura N, Vaz de Macedo D. Alteração em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev Paul Edu Fis* 2003; 17: 119-130.