



UNICAMP  
Walber Toma BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**ATIVIDADE ANALGÉSICA E ANTIULCEROGÊNICA DE  
QUATRO EXTRATOS DE DIFERENTES POLARIDADES OBTIDOS A  
PARTIR DAS CASCAS DE *Quassia amara* L.**

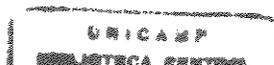
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato <u>Walber Toma</u>	e aprovada pela Comissão Julgadora. <u>Albonteiro</u> 07/05/2001
---	--

**Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular - Área de Concentração  
Fisiologia**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito**

2001

06541100



UTILIDADE	
N.º CHAMADA: T/UNICAMP	
T 59a	
V.	Ex.
TOMBO BC/ 46025	
PROC. 16-392/01	
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREC. R\$ 11,00	
DATA 15-02-01	
N.º CPD	

CM00158547-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Toma, Walber**

**T59a**

Atividade analgésica e antiulcerogênica de quatro extratos de diferentes polaridades obtidos a partir das cascas de *Quassia amara* L./Walber Toma. -- Campinas, SP.[s.n.], 2001.  
122f. ilus.

Orientadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito  
Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Úlcera péptica. 2. Analgesia. 3. Inflamação. 4. Plantas medicinais. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Data da defesa: 07 de Maio de 2001

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  Alba Regina Monteiro Souza Brito

### Membros da Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clélia Akiko Hiruma Lima 

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirtes Costa 

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

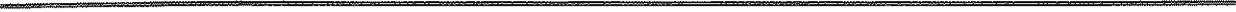
Prof. Dr. Wagner Vilegas 

**Apoio Financeiro: Fapesp**

**Processo: 99/00290-0**



*DEDICO*



Aos meus pais, Miguel e Teresinha, os grandes responsáveis pela realização deste sonho.

Ao meu irmão Wagner

Aos meus primos, tios e avós maternos e paternos

À minha madrinha Laurita.

Aos meus afilhados Pedro Henrique e Anna Lygia

À minha avó materna Ana "in memoriam".

À Marízia, meu amor, minha vida.

---

*AGRADECIMENTOS*

---

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito, orientadora deste trabalho, pela confiança e oportunidade.

Aos colegas de laboratório, Ana Beatriz, Ana Cláudia, Fernanda, Juliano, Luciana, Leônia e Sandro, pela amizade, apoio técnico e científico.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas do Departamento de Química Orgânica da Unesp Araraquara pela co-orientação.

Ao Fábio do Departamento de Química Orgânica da Unesp Araraquara pelo apoio durante os ensaios fitoquímicos.

Ao Rodrigo, pela amizade.

Ao Juliano e Hellen, pela amizade e apoio durante os momentos difíceis.

A todos os meus familiares que sempre torceram pelas minhas conquistas.

Ao meu irmão, pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais, por estarem sempre tão presentes na minha vida.

À minha noiva Marízia, pelo amor, carinho, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis



## *ÍNDICE*



## ÍNDICE

Resumo.....	xiii
Abstract.....	xvi
<b>I- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1- A Dor.....	2
1.2- Úlcera gástrica.....	8
1.3- Plantas Medicinais.....	16
<b>II- OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>III- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1- Coleta.....	24
3.2- Processos Extrativos.....	25
3.3- Drogas para a determinação da atividade analgésica.....	26
3.4- Drogas usadas no estudo da atividade antiulcerogênica.....	26
3.5- Animais.....	26
3.6- Procedimentos Experimentais.....	27
3.6.1- Toxicidade Aguda e DL <sub>50</sub> .....	27
3.6.2- Teste de Placa Quente.....	28
3.6.3- Antagonismo aos Receptores Opióides.....	29
3.6.4- Edema de Pata Induzido por Carragenina.....	29
3.6.5- Testes para Avaliação da Atividade Antiulcerogênica.....	30
3.6.5.1- Úlcera Gástrica Induzida por HCl-etanol.....	30
3.6.5.2- Úlcera Gástrica Induzida por “DAINE” Associada a um Agente Parassimpatomimético.....	31

3.6.5.3- Úlcera Gástrica Induzida por Imobilização e Frio (Estresse).....	31
3.6.5.4- Análise dos Parâmetros Bioquímicos do Conteúdo Gástrico de Camundongos Submetidos à Ligadura do Píloro.....	32
3.7- Análise Estatística.....	33
3.8- Análise Fitoquímica dos Extratos de <i>Quassia amara</i> .....	33
3.8.1- Fracionamento do Extrato Hexânico.....	33
3.8.2- Análise Cromatográfica dos Extratos e Frações de <i>Quassia amara</i> .....	34
<b>IV- RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
4.1- Toxicidade Aguda e Determinação da DL <sub>50</sub> .....	36
4.2- Teste de Placa Quente com Administração Prévia dos Extratos por Via Oral.....	37
4.3- Teste de Placa Quente com Administração Prévia dos Extratos por Via Intraperitoneal.....	39
4.4- Mecanismo de Ação da Atividade Analgésica.....	44
4.4.1 Teste de Placa Quente com Naloxana.....	44
4.5- Avaliação da Atividade Antiedematogênica.....	47
4.5.1- Edema de Pata Induzido por Carragenina.....	47
4.6- Avaliação da Atividade Antiulcerogênica.....	48
4.6.1- Úlcera Gástrica Induzida por HCl/etanol.....	48
4.6.2- Úlcera Gástrica Induzida por “DAINE” Associada a um Agente Parassimpatomimético.....	50

4.6.3- Úlcera Gástrica por Contenção e Frio (Estresse).....	51
4.7- Análise dos Parâmetros Bioquímicos do Conteúdo Gástrico	
Após a Ligadura do Píloro em Camundongos.....	52
4.8- Análise da Relação Dose-Dependência dos Extratos das cascas	
de <i>Quassia amara</i> .....	56
4.9- Análises Fitoquímicas dos Extratos de <i>Quassia amara</i> .....	58
4.9.1- Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	58
4.9.2- Análises Fitoquímicas das Frações do Extrato HEX de	
<i>Quassia amara</i> .....	62
4.9.2.1- Fração 5/8.....	62
4.9.2.2- Fração 30/32.....	64
4.9.2.3- Fração 44/54.....	66
4.9.2.4- Fração 56/57.....	68
4.10- Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do	
Extrato HEX de <i>Quassia amara</i> .....	70
<b>V- DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>VI-CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
<b>VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>

---

*RESUMO*

---

*Quassia amara* L. é um arbusto de 2 a 6 metros de altura encontrado na Venezuela, Suriname, Colômbia, Panamá e nas Guianas; no Brasil é cultivada desde a divisa com as Guianas até o estado do Maranhão. As cascas de sua madeira são popularmente utilizadas como antimicrobiana, antianêmica, antimalárica, e no tratamento de problemas do trato gastrointestinal, dentre estes a úlcera gástrica. Análises fitoquímicas de *Quassia amara* revelaram a existência de numerosos compostos, incluindo alcalóides indólicos e cantinônicos, triterpenos, esteróides e os princípios amargos quassinóides. Considerando-se o uso popular das cascas de *Quassia amara* e a variedade de compostos químicos destas cascas, avaliamos as atividades analgésica e antiinflamatória de quatro extratos de diferentes polaridades utilizando os modelos da placa quente e edema de pata em camundongos. Nenhum dos extratos administrados por via oral (250 mg/kg), exibiram atividade; entretanto, os extratos diclorometano (DCM) (100 mg/kg) e hexano (HEX) (100, 250 e 500 mg/kg), quando administrados por via intraperitoneal, produziram aumento significativo no limiar da dor. HEX, o extrato mais ativo, produziu um aumento dose-dependente da atividade analgésica. A administração prévia do antagonista opióide, naloxana produziu uma reversão desta atividade indicando que HEX pode apresentar princípio(s) ativo(s) do tipo opióide. As substâncias presentes em HEX, com este tipo de atividade, são provavelmente alcalóides e esteróides. A atividade antiulcerogênica destes extratos, todos administrados por via oral na dose de 100 mg/kg, também foi investigada. Os extratos etanólico (EtOH), DCM e HEX diminuíram o índice de lesões ulcerativas em úlceras induzidas por HCl-etanol em camundongos. No modelo de úlcera induzida por indometacina-

betanecol, DCM e HEX inibiram significativamente as lesões ulcerosas. Na úlcera gástrica induzida por contenção e frio (estresse) em camundongos, todos os extratos investigados inibiram o índice de lesões ulcerativas. Quando os parâmetros da secreção gástrica foram estudados em camundongos submetidos à ligadura do piloro, EtOH, DCM e HEX aumentaram o pH e reduziram o volume e a concentração de íons  $H^+$  do conteúdo gástrico. Os mecanismos pelos quais os extratos de *Quassia amara* exercem atividade antiulcerogênica não foram investigados. Entretanto, é possível que os quassinóides estejam envolvidos no aumento dos mecanismos de defesa da mucosa e/ou mecanismos antissecretórios. De modo geral, os resultados até aqui obtidos justificam a utilização pela medicina popular das cascas de *Quassia amara* para o tratamento de processos dolorosos e ulcerosos gástricos.

---

*ABSTRACT*

---

*Quassia amara* L., is a small tree 2-6 m in height, which occur in northern Brazil, Venezuela, Surinam, Colombia, Panamá and Guiana; in Brazil, this species is cultivated from the border with Guiana to the state of Maranhão. The bark wood of this plant is reputed in traditional medicine as having antimicrobial, antianemic and antimalarial activities, as well as being useful for the treatment of digestive disorders, including the gastric ulcers. Moreover *Quassia amara* is knowed by folk medicine by your narcotic properties. Phytochemical analysis has identified numerous compounds from *Quassia amara*, including indole and cantinones alkaloids, triterpenes, steroids, and many bitter compounds know as quassinoids. Considering the use of this plant in Brazilian folk medicine and the numerous chemical substances identified from *Quassia amara* bark, we have evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory effects of four bark extracts of different polarities using the hot-plate analgesic test and paw edema in mice. The possible mechanism's involved in the antinociceptive effect of this plant were investigated. When the extracts were administered by oral route (250 mg/kg), it was no observed that significant results in the paw edema and hot plate test ( $p>0.05$ ); however, The DCM (100 mg/kg) and HEX extracts (100, 250 and 500 mg/kg) when administered in the hot plate test by intraperitoneal route showed an increase in the pain threshold. HEX the more active extract showed an increase in the pain threshold at dependent dose. We performed the hot plate test with the pre-treatment with naloxone, a specific opioid antagonist to evaluate the possible involvement of this activity with the opioid or opioidergic system. The data showed that this analgesic effect of these extracts was reverted by previously administration of naloxone ( $p<0.05$ ). The compound(s) in the HEX extract

are probably the alkaloids and/or steroids. The antiulcerogenic activities of these extracts administered by oral route at dose of 100 mg/kg. The ethanolic (EtOH), DCM and HEX extracts reduced the ulcerative lesion index in experiments which lesions were induced with HCl-ethanol in mice. In ulcers induced by NSAIDs-parasympathomimetic drugs in mice, the DCM and HEX extracts inhibited significantly the ulcerogenic lesions. The gastric ulcer induced cold and restraint (stress) in mice, showed that all the extracts inhibited the lesion index. When evaluated the biochemical parameters in the pylorus ligation, the EtOH, DCM and HEX increased pH and reduced the amount of volume and ionizable H<sup>+</sup> ions of gastric content. The antiulcerogenic mechanism remains uncertain. However, in the antiulcerogenic activities we emphasize the presence of bitter principles quassinoids. Most probably this group of compounds seems to be involved in an increase of the defense mechanisms of gastric mucosa and/or antisecretory mechanisms. These results confirmed the utilization by folk medicine of bark from *Quassia amara* to treatment of the dolorous process and gastric ulcers.

---

## *I- INTRODUÇÃO*

---

## **I- Introdução**

### **1.1- A Dor**

A Associação internacional do estudo da dor define-a como “uma experiência desagradável e sensorial, associada a uma destruição tecidual” (Siddall & Cousins, 1995).

A dor aguda é biologicamente útil como sinal de injúria ou doença com cura progressiva. Em contraste, a dor crônica não se resolve espontaneamente e não favorece funções biológicas. Uma revisão recente demonstra que um em cada três cidadãos americanos tem experiências de dor crônica necessitando atenção médica por todo período de vida; mais de 50 milhões de pessoas estão parcial ou totalmente incapacitadas pela dor crônica no mundo, o que resulta em custos de \$ 80-90 bilhões aos serviços de saúde pública (Markenson, 1996).

Assim, a pesquisa de substâncias potencialmente analgésicas é relevante, considerando-se que o isolamento químico da morfina foi relatado em 1806 (Reisine & Pasternak, 1996) e que novos analgésicos de ação periférica ou central há muito não são descobertos e colocados à disposição da população.

Os mecanismos básicos envolvidos no processo doloroso não são ainda bem conhecidos. Além disso, é importante distinguir dor propriamente dita de nocicepção. Esta última refere-se à recepção de sinais no SNC, evocada pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), os quais fornecem informações sobre o tecido lesado ou danificado; porém, nem todos os estímulos nocivos que ativam os nociceptores são necessariamente experiências de dor. Isto traz grandes dificuldades no estudo de tal processo, uma vez que o

mesmo tem natureza subjetiva, o que impossibilita a identificação de sua origem, definição, diagnóstico e tratamento (Jessel & Kelly, 1991).

Muitos tipos de dor surgem a partir da ativação ou sensibilização dos chamados nociceptores. Estes são terminações nervosas livres, com diversos tipos de fibras e em número significativo, distribuídos por todo o corpo. Tais fibras são mielinizadas do tipo A- $\delta$  e A- $\beta$ , que conduzem o estímulo doloroso de natureza rápida (5-30 m/seg), e não mielinizadas do grupo C ou nociceptores polimodais (PMN), as quais conduzem estímulos dolorosos de natureza lenta e tardia (0.5-2 m/seg). Funcionalmente, os nociceptores podem ser classificados de acordo com suas respostas a diferentes formas de estímulo intenso (mecânico, térmico e/ou químico), conforme demonstrado na figura 1. A sensibilidade de um tecido a um estímulo nocivo é proporcional à quantidade de terminações nociceptoras (Campbell *et al.*, 1989).

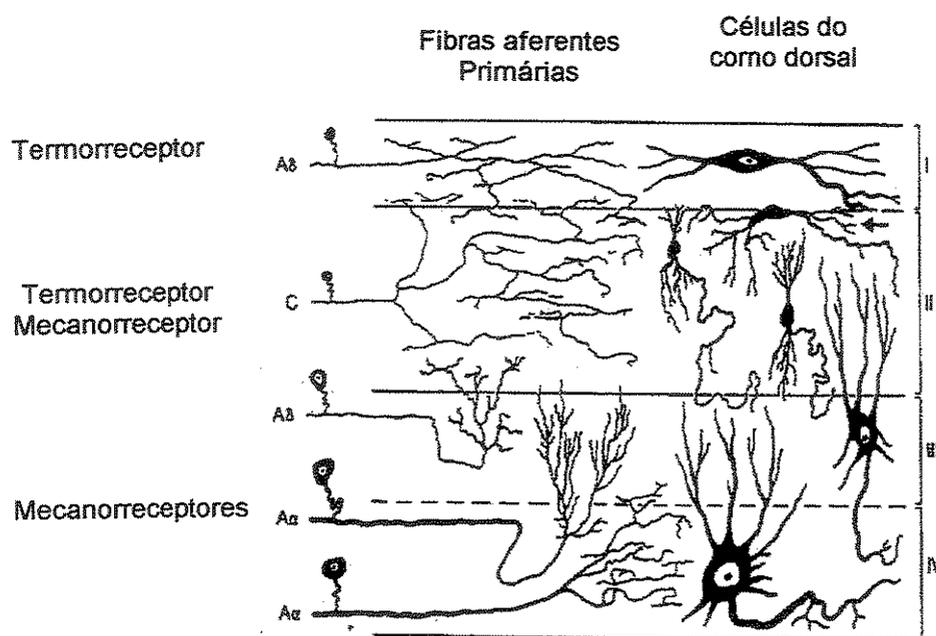


Figura 1: Diagrama esquemático em corte transversal da organização do corno dorsal na medula espinhal (Siddall & Cousins, 1995)

Além da transmissão de sinais aferentes, os nociceptores também tem funções neuroefetoras. Quando um tecido é danificado, são liberados por ele e pelos tecidos adjacentes, alguns mediadores químicos que são capazes de estimular os nociceptores, resultando em aumento da resposta ao estímulo doloroso ou hiperalgesia. Dentre estes mediadores encontram-se potássio, serotonina, bradicinina, substância P, histamina, o gene relacionado à proteína calcitonina (CGRP) e precursores do ácido aracdônico (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (Perl, 1976; Foster & Ramage, 1981; Levine *et al.*, 1993). É este estímulo dos nociceptores conseqüente à da liberação dos diversos mediadores químicos que promove o processo doloroso. A figura 2 demonstra os mediadores químicos envolvidos no processo doloroso.

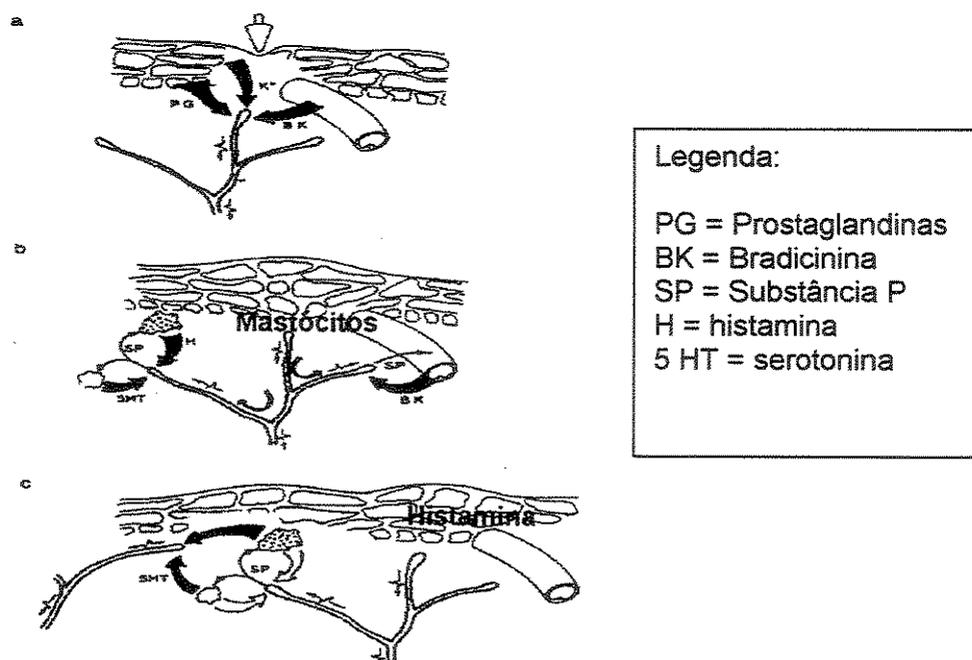


Figura 2: Eventos levando à ativação, sensibilização e expansão dos nociceptores das fibras aferentes primárias com conseqüente liberação de mediadores químicos (Siddall & Cousins, 1995).

A hiperalgesia ou o aumento da sensibilidade aos estímulos nociceptivos envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas, quanto a facilitação central da transmissão no corno dorsal. O componente periférico é devido à ação dos mediadores sobre as terminações nervosas, ao passo que o componente central reflete a facilitação da transmissão sináptica.

Sabe-se que os receptores opióides ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), adrenérgicos ( $\alpha_2$ ), N-metil-D-aspartato (NMDA), serotoninérgicos (5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>3</sub>) e gabaérgicos (GABA), são os principais receptores envolvidos no processo de redução da dor atuando centralmente.

Tendo em vista a complexidade e magnitude dos mecanismos e mediadores envolvidos na hiperalgesia, o efeito reverso ou analgesia pode ser obtido por intermédio de diferentes drogas, com distintos mecanismos de ação, os quais podem atuar tanto central quanto periféricamente. As substâncias analgésicas conhecidas podem ser divididas em duas grandes classes: analgésicos opióides e drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINES), que além de antiinflamatórios, são analgésico antipiréticos (Reisine & Pasternak, 1996). Ao primeiro grupo pertence a morfina e seus análogos. O termo opióide aplica-se a qualquer substância que produza efeitos semelhantes aos da morfina, os quais são bloqueados por antagonistas do tipo naloxana. Este grupo inclui vários neuropeptídios e análogos sintéticos, cuja estrutura pode ser bastante diferente daquela da morfina. O termo mais antigo, opiáceo, é mais restritivo e significa medicamentos estruturalmente análogos a morfina excluindo-se dessa forma, os peptídios e muitos análogos sintéticos (Reisine & Pasternak, 1996). Tais drogas atuam em receptores específicos denominados Mu( $\mu$ ), Sigma( $\delta$ )

e Kappa( $\kappa$ ). Relatam-se também diversos subtipos destes receptores, porém não há ainda evidências farmacológicas ou fisiológicas concretas.

A maioria das drogas opióides utilizadas clinicamente, como é o caso da morfina, é relativamente seletiva para os receptores  $\mu$  (Dickenson, 1991). Além disso, a morfina e outros agonistas opióides- $\mu$  inibem seletivamente vários reflexos nociceptivos e induzem analgesia profunda quando administrados por via intratecal ou instilados localmente no corno dorsal da medula. Parece que pelo menos três mecanismos estão envolvidos: 1) os receptores de opióides, nas terminações dos nervos aferentes primários, medeiam a liberação de neurotransmissores, incluindo a substância P; 2) a morfina também antagoniza os efeitos da substância P exógena por exercer ações inibidoras pós-sinápticas dos interneurônios e nos neurônios de efluxo do feixe espinotalâmico que transportam a informação nociceptiva para os centros mais altos no cérebro; 3) os agonistas  $\delta$  e  $\kappa$  parecem agir da mesma maneira; todavia, os agonistas  $\kappa$  só suprimem discretamente os estímulos térmicos nocivos e seus efeitos máximos na dor visceral são nitidamente menores (Lewis *et al.*, 1987).

Apesar da eficácia farmacológica da morfina, seu uso abusivo representa um problema social grave. Além disso, o uso da morfina e opióides correlatos, determinam um leque de efeitos indesejáveis, incluindo depressão respiratória, náusea, vômito, tonteira, sudorese, prurido, constipação, retenção urinária, hipotensão e dependência (Reisine & Pasternak, 1996). Tais problemas continuam estimulando pesquisas em busca de analgésicos potentes que não produzam dependência e com menor grau de efeitos colaterais.

Outro grupo de analgésicos é o das DAINES, que incluem os salicilatos; aspirina, derivados da pirazolona (fenilbutazona), derivados da parafenolamina (fenacetina, paracetamol), indometacina, ácido mefenâmico, tolmetina, derivados do ácido propiônico (ibuprofeno) e outros. A maioria das drogas disponíveis é capaz de inibir tanto a atividade da cicloxigenase-1 (COX-1, constitucional), quanto a da cicloxigenase-2 (COX-2, induzida em presença da resposta inflamatória); desta forma as DAINES inibem a síntese de mediadores químicos tais como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, envolvidos no processo doloroso (Reisine & Pasternak, 1996). Entretanto, nem os produtos do ácido aracdônico, nem a liberação e atividade da histamina e 5-HT não são grandemente afetadas por estas drogas.

As DAINES, além de antiinflamatórios, são analgésicos suaves sendo eficazes somente contra dor moderada. Este efeito analgésico é provavelmente devido à prevenção da sensibilização do nociceptor, já que reduz a liberação dos mediadores químicos. O uso de DAINES para reduzir a dor e a inflamação de condições tais como artrite reumatóide e osteoartrite também é benéfico sob o ponto de vista de uso a curto prazo (Siddall & Cousins, 1995).

Entretanto, as DAINES compartilham efeitos colaterais indesejáveis. O mais comum é a tendência a produzir ulceração gástrica ou intestinal que, em alguns casos, pode acompanhar-se de anemia devida ao sangramento resultante. Dados epidemiológicos relatam que pacientes que usam DAINES por períodos longos tem risco relativo três vezes maior de desenvolver complicações gastrointestinais colaterais, em comparação com os pacientes que não usam estes medicamentos (Brunton, 1996).

Considerando-se que drogas analgésicas com atuação central ou periférica com eficácia clínica significativa e poucos efeitos colaterais, são raras, torna-se evidente a necessidade da pesquisa na busca de novas substâncias potencialmente analgésicas.

## 1.2- Úlcera gástrica

O fato mais importante da fisiologia gástrica é a secreção ácida na forma de HCl. O estômago normal contém aproximadamente 1 bilhão de células parietais (Johnson, 1997) e secreta aproximadamente 2.5 litros de suco gástrico diariamente (Rang & Dale, 2001). O suco gástrico normal é uma mistura da secreção parietal (HCl e fator intrínseco) e das secreções não parietais, muco, bicarbonato,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e pepsinogênio (Kutchai, 1996).

Os mecanismos moleculares da secreção de ácido clorídrico, pela célula parietal, iniciam-se através do estímulo de proteínas específicas de membrana por seus respectivos agonistas ou acoplamento agonista-receptor (Wolfe & Sol, 1988; Sachs *et al.*, 1994; Hirschowitz *et al.*, 1995). Os neurotransmissores básicos ou hormônios que estimulam diretamente a secreção pelas glândulas gástricas por esse acoplamento são acetilcolina, gastrina e histamina. Todos eles atuam primeiro pela interação com receptores nas células secretoras; em seguida, os receptores ativam os processos secretores (Guyton, 1993).

A acetilcolina, atuando em receptores muscarínicos, provavelmente  $M_3$ , liberada pelos neurônios aferentes vagais, estimula a secreção ácida da célula parietal por elevar os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  (Hirschowitz *et al.*, 1995; Kutchai, 1996). Além disso, este hormônio também estimula secreções de: a) pepsinogênio, pelas células pépticas; b) muco, pelas

células mucosas e c) gastrina, pelas células G (Guyton, 1993). A excitabilidade inicial para estas secreções está associada a estímulos provenientes do olfato, visão, paladar ou mastigação e por neurônios locais da parede gástrica que são estimulados pela distensão das paredes do estômago (Hirschowitz *et al.*, 1995; Kutchai, 1996).

Tanto os sinais nervosos do nervo vago, quanto aqueles dos reflexos entéricos locais, a presença de proteínas,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Al}^{+3}$  nos alimentos e a alcalinização do antro, além de causarem estimulação direta da secreção glandular das secreções gástricas, também fazem com que a mucosa no antro gástrico secrete o hormônio gastrina. Esse hormônio é secretado pelas células G nas glândulas pilóricas. A gastrina é absorvida pelo sangue e transportada para as glândulas oxínticas no corpo do estômago; aí ela estimula intensamente as células parietais e, talvez, também as células pépticas, mas em menor extensão. Assim, o efeito realmente importante é o de aumentar a secreção de ácido clorídrico, muitas vezes por até 8 vezes. Por sua vez, o ácido clorídrico excita ainda outra atividade reflexa entérica que não só aumenta ainda mais a secreção de ácido clorídrico, como também estimula secundariamente a secreção de enzimas pelas células pépticas, que pode ser aumentada por até 2 a 4 vezes (Guyton, 1993). Todo esse mecanismo de secreção ocorre devido à estimulação da gastrina aos receptores CCK-B da célula parietal, aumentando os níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelulares (Dockray *et al.*, 1996 *et al.*; Kutchai, 1996).

A histamina, um derivado de aminoácido, também estimula a secreção de ácido pelas células parietais. Uma pequena quantidade de histamina, formada continuamente na mucosa gástrica quer em resposta ao ácido no estômago ou por outras razões, causa secreção muito

pequena de ácido. Entretanto, sempre que acetilcolina ou gastrina estimulam simultaneamente as células parietais, mesmo as pequenas quantidades de histamina, aumentam muito a secreção de ácido (Guyton, 1993).

Atuando em receptores  $H_2$ , a histamina é liberada através de um mecanismo parácrino por células enterocromafins-like (ECL), semelhantes aos mastócitos. As ECL existentes na lâmina própria do estômago e dispostas em íntimo contato com as células parietais liberam histamina que, promove aumento da secreção ácida por elevar os níveis intracelulares de AMPc (Sachs *et al.*, 1994; Hirschowitz *et al.*, 1995; Dockray *et al.*, 1996; Sandor *et al.*, 1996).

Os mecanismos celulares envolvidos com a secreção ácida iniciam-se com estímulos proporcionados pelos diferentes agonistas que atuam sinergicamente, conferindo elevada eficiência ao processo gástrico.

O  $H^+$  secretado resulta da combinação de  $H_2O$  com  $CO_2$  produzido pela atividade metabólica da célula. A célula parietal tem um sistema de transporte ativo, dependente de ATP, em sua superfície luminal que acumula  $K^+$  em troca do  $H^+$  secretado. O  $HCO_3^-$  restante sai pela porção basolateral da célula, passando à circulação.

O aumento da secreção de  $H^+$ , que acompanha uma refeição por exemplo, leva ao aumento do  $HCO_3^-$  plasmático ou “maré” alcalina. Parte do movimento do  $HCO_3^-$  através da membrana basolateral ocorre em troca da entrada de  $Cl^-$ ; a entrada de  $Cl^-$  parece estar acoplada à entrada de  $Na^+$  na célula. O  $Cl^-$  passa para o lado luminal da célula por transporte facilitado, que pode ou não estar ligado ao efluxo de  $K^+$  que acompanha a elevada secreção de HCl. O resultado final dos sistemas de transporte

da célula parietal é a secreção de HCl. Além dos sistemas de transportes especiais, as células parietais possuem uma bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase na superfície basolateral, que mantém os gradientes intracelulares de concentração para esses dois íons.

Vários fatores agem para proteger a mucosa gástrica de autodigestão, recebendo coletivamente a designação de “barreira mucosa”. As células superficiais e mucosas do colo no estômago e duodeno secretam uma fina camada de muco que consiste em um gel viscoelástico insolúvel na água. Esse gel é também impermeável às grandes moléculas do tipo pepsina. Sua produção é estimulada pelo ácido luminal e pela estimulação vagal, com sua liberação pelas células mucosas sendo aumentada pelas prostaglandinas (Berne & Levy, 1991). Dentre as funções do muco destacam-se: (a) proteção às células adjacentes das forças mecânicas da digestão; (b) lubrificação da mucosa; (c) retenção de água e (d) impedimento mas não bloqueio da difusão dos íons  $\text{H}^+$  da luz para a membrana apical das células epiteliais (Morimoto *et al.*, 1994; Wallace & Granger, 1996; Tabata *et al.*, 1996).

Tanto as células superficiais do estômago quanto as glândulas de Brunner do duodeno, secretam bicarbonato e o lançam na zona limítrofe de muco aderido, criando um microambiente relativamente alcalino imediatamente à superfície celular. A secreção gástrica de bicarbonato é aproximadamente 5 a 10% da secreção ácida máxima, sendo estimulada por ácido luminal, irritantes leves, estimulação vagal e prostaglandinas. Deste modo, a superfície da mucosa do estômago fica protegida; coberta com um gel que possui um elevado pH em relação à luz do estômago e que, em condições normais, irá neutralizar os íons  $\text{H}^+$  da secreção ácida-gástrica que irão difundir-se através desta camada de muco,

estabelecendo-se assim um gradiente de pH entre a luz e as células epiteliais (Curtis *et al.*, 1995; Kutchai, 1996; Wallace & Granger, 1996;).

As células epiteliais mucosas estão unidas umas às outras por junções intercelulares apertadas, criando uma barreira para a difusão retrógrada dos íons  $H^+$ . Quando o epitélio sofre ruptura, o reparo ocorre rapidamente; as células existentes migram ao longo da membrana basal exposta para preencher os “defeitos” criados pela descamação das células. Além disso, as células epiteliais gástricas também replicam rapidamente em resposta a uma lesão (Johnson, 1997).

A somatostatina, um hormônio anti-secretagogo armazenado nas células D localizadas na mucosa do fundo e do antro gástrico e, principalmente no pâncreas, também contribui na citoproteção da mucosa gástrica inibindo a função secretória das células ECL e células G de gastrina (Sachs *et al.*, 1994 ).

Já as prostaglandinas (PG's) dos tipos E, F e I são encontradas nas mucosas gástrica e intestinal, sendo responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato e pelo aumento do fluxo sanguíneo da mucosa. As PG's da mucosa do duodeno estimulariam ainda a secreção basal de bicarbonato duodenal e sua resposta ao ácido luminal, além de propriedades citoprotetoras que auxiliam na regulação dos mecanismos de defesa da mucosa (Eberhart & Dubois, 1995; Tabata *et al.*, 1996).

O suprimento sanguíneo da mucosa gástrica consiste em capilares extensamente ramificados que garantem o necessário para: a) fornecimento de oxigênio, bicarbonato e nutrientes às células epiteliais; e b) remoção do ácido que sofreu difusão retrógrada. Este fluxo mucoso é regulado por mediadores vasoativos locais, particularmente óxido nítrico endógeno (gerado pelas células endoteliais), prostaglandinas e

neuropeptídios; um aumento no fluxo sanguíneo é observado simultaneamente à estimulação da secreção ácida (Johnson, 1997).

As úlceras pépticas são lesões remitentes e recidivantes diagnosticadas mais freqüentemente em adultos de meia idade ou mais velhos, mas que podem tornar-se evidentes pela primeira vez no início da vida adulta. Aparecem com freqüência sem influências desencadeantes óbvias e, a seguir, após um período de semanas a meses de doença ativa, podem cicatrizar com ou sem terapia. Entretanto, até mesmo com a cicatrização, a propensão para o surgimento de úlceras pépticas persiste (Johnson, 1997).

Para Szabo, 1987 e Katsura *et al.*, 1991 e, as úlceras pépticas são resultantes de um desequilíbrio entre os fatores defensivos da mucosa, que representam forças de resistência ao suco gástrico, como as secreções de muco e bicarbonato, e aqueles agressivos, como por exemplo, as secreções de ácido, de pepsina e fator intrínseco, que levam à sua lesão.

O ácido gástrico e a pepsina são pré-requisitos para todas as ulcerações pépticas. A importância do ácido é evidenciada pela síndrome de Zollinger-Ellison com suas múltiplas ulcerações pépticas, em virtude do excesso na secreção de gastrina e na produção de ácido.

A base para a hiperacidez, quando presente, nem sempre é clara. As possíveis causas são uma maior massa de células parietais, uma maior sensibilidade aos estímulos secretórios, um maior impulso secretório ácido basal, ou uma menor inibição dos mecanismos estimulantes, como a liberação de gastrina.

Além dos fatores analisados, o papel da *Helicobacter pylori* na úlcera péptica recebe cada vez mais ênfase, pois esta infecção está

presente em 90 a 100% dos pacientes com úlcera duodenal e em 70% daqueles com úlcera gástrica. A ulcerogênese gástrica resulta presumivelmente da ação da urease (que gera amônia) e da protease bacterianas (que desmembra as glicoproteínas no muco gástrico). O dano da camada mucosa protetora expõe as células epiteliais subjacentes à influência lesiva da digestão ácido-péptica e, dessa forma, pode resultar em inflamação. A mucosa inflamada cronicamente é ainda mais susceptível à lesão ácido-péptica e, portanto, mais propensa à ulceração péptica (Johnson, 1997).

O uso de DAINES e cigarros também são considerados agentes ulcerogênicos importantes já que afetam a cicatrização e favorecem a recidiva; estes fatores atuam possivelmente, pela supressão da síntese de prostaglandinas (Rang & Dale, 2001). A personalidade e o estresse psicológico são outros fatores importantes na patogenia da úlcera péptica (Johnson, 1997).

Durante séculos os antiácidos foram a única classe de medicamentos utilizadas para o acometimento da dor promovida pelas úlceras (Brunton, 1996); são compostos básicos que neutralizam o ácido na luz gástrica, sendo o hidróxido de alumínio e magnésio os mais comumente empregados (Casparly, 1982).

No entanto, ensaios clínicos conduzidos por Black e colaboradores (1972), utilizando antagonistas específicos dos receptores H<sub>2</sub>-histaminérgicos, forneceram uma classe mais específica de inibidores da secreção do ácido gástrico (Brunton, 1996); estas drogas inibem, competitivamente, a secreção ácida-gástrica estimulada pela histamina e também aquela induzida pela gastrina e, em menor grau, a induzida por agonistas muscarínicos (Powell & Donn, 1984). Os principais

representantes deste grupo de drogas são a cimetidina e a ranitidina (Brogden *et al.*, 1982).

Os antagonistas de receptores muscarínicos também são drogas utilizadas no tratamento da úlcera péptica. Relatos experimentais indicam que estes conseguem reduzir a secreção gástrica basal de ácido em 40 a 50%. A primeira droga utilizada desta classe de medicamentos foi a atropina, porém, mais recentemente foi desenvolvida a pirenzepina, um antagonista muscarínico  $M_1$ , com propriedades farmacológicas semelhantes, porém com efeitos colaterais menores devido à maior seletividade (Texter & Reilly, 1982; Baldi *et al.*, 1983).

Outros fármacos, agentes “citoprotetores”, também foram desenvolvidos, em virtude do papel desempenhado pelas prostaglandinas no estômago; estes, além de inibirem a secreção ácida-gástrica, estimulam os mecanismos de proteção da mucosa, ou seja, a secreção de muco e bicarbonato, o que produz uma barreira física sobre a superfície da úlcera (Robert *et al.*, 1979). O misoprostol é o representante mais conhecido desta classe de substâncias.

Outra droga utilizada clinicamente é a carbenoxolona. Esta droga provém do extrato de *Glycyrrhiza glabra* ou alcaçuz, e atua aumentando a síntese de glicoproteínas; atuaria ainda inibindo as enzimas que inativam as prostaglandinas e suprimindo a ativação de pepsinogênio (Barrowman & Pfeiffer, 1982 ). Assim sendo, a carbenoxolona parece alterar tanto a composição, quanto a quantidade de muco, reforçando a barreira mucosa ao HCl (Brunton, 1996).

As drogas mais recentes da terapia ulcerosa são os inibidores da bomba protônica  $H^+K^+ATPase$ ; estes agentes oferecem um meio eficaz de bloquear seletivamente a bomba de prótons responsável pela

secreção de ácido pela célula parietal. O principal agente é um substituto benzimidazol, o omeprazol. Atuando através do bloqueio da  $H^+K^+ATPase$ , este inibe de forma acentuada a secreção basal de ácido gástrico (Sachs & Shin, 1995).

Por último, devido à resistência pelo *H. pylori*, múltiplos fármacos são necessários para o tratamento em alguns pacientes. Os compostos de bismuto não tem capacidade substancial para neutralizar o ácido-gástrico e seus efeitos benéficos foram atribuídos à citoproteção; eles podem ser secundários à atividade antibacteriana de compostos de bismuto contra o *H. pylori* na mucosa gastroduodenal. As terapias antimicrobianas triplas (metronidazol, composto bismútico e claritomicina), em combinação com agentes antissecretores, estão sendo usadas com êxito para tratar úlceras péptica devidas, pelo menos em parte, à infecção por *H. pylori* (Perng *et al.*, 1998).

Apesar da diversidade de drogas utilizadas no tratamento da úlcera péptica, e do avanço científico-tecnológico das indústrias farmacêuticas na busca de novos medicamentos não há uma droga que produza 100% de remissão nas úlceras gastroduodenais (Alper, 1993).

### **1.3- Plantas Medicinais**

Uma parcela considerável dos fármacos atuais continua sendo obtida a partir das plantas medicinais. Estima-se que, em nosso país cerca de 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas (Garcia *et al.*, 1996). Além disso, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis; o restante, encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas

plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (Di Stasi, 1996).

O estudo das plantas medicinais, necessário e urgente (Elisabetsky, 1999) pode ser abordado por diferentes estratégias. Entre elas, a abordagem etnofarmacológica para a seleção da espécie, baseia-se na “exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (Souza Brito, 1996; Elisabetsky, 1999).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (Dias, 1996) de um total estimado entre 350.000 a 550.000. Dentre estas espécies, encontra-se *Quassia amara* L., um arbusto de 4 a 8 m de altura, pertencente à família Simaroubaceae (Pio Corrêa, 1984). Seu nome deriva de um curandeiro do Suriname de nome Quassi, que em meados do século XVIII adquiriu fama em sua comunidade utilizando esta planta para o tratamento de processos febris.

*Quassia amara* possui folhas alternas, compostas, imparipinadas, de poucos folíolos alado-peciolados, opostos, inteiros e glabros. Suas flores são tubulosas, vermelhas, grandes, dispostas em racemos terminais. Apresenta frutos drupa, roxo-escuros, coriáceos, de quase 2 cm (figura 3) (Pio Corrêa, 1984).

Este arbusto é muito encontrado em bosques secos ou úmidos nos países da América Latina (Cáceres, 1996). No Brasil é encontrada na região norte desde as Guianas até o estado do Maranhão (Pio Corrêa, 1984). Em virtude da ampla distribuição geográfica, apresenta grande variação de nomenclatura popular. No Brasil é popularmente conhecida como “Murubá”, “Murupá”, “Quina”, “Quina de Caiena”, “Pau de Surinã”,

“Pau Amargo” e “Quassia”. Nos demais países tem como sinônimas “Quassiaholz”, “Cuassia de Surinam”, “Guavito”, “Palo Isidoro”, “Palo Quinina” e “Hombre Grande” (Pio Corrêa, 1984; Cáceres, 1996).



Figura 3: *Quassia amara* L.

As indicações populares de *Quassia amara* são também diversas. A madeira deste arbusto é muito utilizada para combater afecções digestivas tais como diarreias, flatulência, dispepsias, halitose e dores do estômago; malária, gonorréia, diabetes, anemia, mordeduras de serpentes, afecções hepáticas e processos febris, são outras indicações de uso para *Quassia amara*. Além disso, a planta em estudo é classificada como uma planta narcótica (Cáceres, 1996).

Diversos componentes químicos já foram identificados a partir da madeira de *Quassia amara*. Dentre estes encontram-se os alcalóides indólicos e cantinônicos (3-metil-cantin-2-6-diona,  $\beta$ -1-metoxi-carbonil-carbonila, 5-hidroxi-4-metoxi-3-metil-cantin-2-6-diona, 3-metil-cantin-5-6-

diona (Barbetti *et al.*, 1987, Barbetti *et al.*, 1990), 5-hidroxi-4-metoxi-cantin-6-ona (Grandolini *et al.*, 1987); 2-metoxi-cantin-6-onas (Njar *et al.*, 1993; Njar *et al.*, 1995); os triterpenos paraína e iso-paraína (Grandolini *et al.*, 1987), quassimarina (Streelman *et al.*, 1978), quassina (Clark, 1937, Valenta *et al.*, 1961; Wagner *et al.*, 1975; Nestler *et al.*, 1980; Robins *et al.*, 1984), 12-hidroxi-quassina e 14-15-dehidro-quassina (Robins *et al.*, 1984), 11-acetil-paraína, 11- $\alpha$ -acetil-paraína, 13-18-dehidro-12- $\alpha$ -hidroxi-paraína e 1- $\alpha$ -O-metil-quassina (Barbetti *et al.*, 1993), 18-hidroxi-quassina (Casinovi *et al.*, 1966; Robins *et al.*, 1984), iso-quassina (Casinovi *et al.*, 1966), neo-quassina (Clark, 1937; Clark, 1942; Valenta, *et al.*, 1961; Casinovi *et al.*; 1966), 11-dihidro-12-nor-neo-quassina (Grandolini *et al.*, 1987; Barbetti *et al.*, 1993), 16- $\alpha$ -O-metil-neo-quassina, 16- $\alpha$ -O-metil-11- $\alpha$ -O-( $\beta$ -D glucopiranosídeo)-neo-quassina (Barbetti *et al.*, 1993) e 16- $\alpha$   $\gamma$  16- $\beta$ -neo-quassina (Robins *et al.*, 1984). Além disso, são encontrados alcanos de C4-Metil-D-glucosídeo (Barbetti *et al.*, 1993) e esteróides como a  $\beta$ -sitostenona e  $\beta$ -sitosterol (Lavie & Kaye, 1963).

Atividades biológicas e toxicológicas diversas já foram estudadas a partir dos extratos obtidos de *Quassia amara*. Dentre estas destacam-se as atividades antitumoral em ratos e antimicrobiana in vitro dos extratos obtidos das cascas de *Quassia amara* contra protozoários, fungos e bactérias (Cáceres, 1996). *Quassia amara* também é classificada como uma planta com propriedades narcóticas (Duke, 1992); este autor acredita que esta atividade pode vir acompanhada de uma possível atividade analgésica, a qual deveria ser melhor explorada. Por último, não foram evidenciados sinais de toxicidade em ratos quando o extrato

aquoso da madeira foi administrado em altas doses por via oral; por via intraperitoneal, 500 mg/Kg produzem sinais de toxicidade aparentemente relacionados à sedação (Cáceres, 1996).

Nenhum estudo foi realizado ainda tentando evidenciar as atividades analgésica, antiinflamatória e antiulcerogênica de extratos obtidos de *Quassia amara*.

---

## *I- OBJETIVOS*

---

## II- Objetivos

Considerando-se: a) os usos populares de *Quassia amara* L. e o critério utilizado na seleção da espécie; b) a existência, nesta espécie, de inúmeros compostos biologicamente ativos anteriormente isolados; c) a importância farmacológica de estudar substâncias potencialmente ativas em úlceras gastrointestinais e na dor e, finalmente, d) os resultados biológicos já obtidos e que constam da literatura, foram objetivos deste projeto:

- 1) determinar a DL<sub>50</sub> e investigar possíveis efeitos tóxicos agudos dos diferentes extratos preparados a partir das cascas da planta, uma vez que a população utiliza a espécie com fins medicinais;
- 2) estudar a atividade antiulcerogênica dos quatro extratos de diferentes polaridades obtidos a partir das cascas de *Quassia amara* L.;
- 3) analisar, com as mesmas amostras vegetais, se as atividades “narcótica” e antipirética, descritas popularmente para a planta, são devidas a um possível efeito antinociceptivo, periférico ou central;
- 4) estudar os possíveis mecanismos de ação envolvidos com estas atividades;
- 5) tentar isolar os princípios farmacologicamente ativos a partir das frações ativas, pelo menos no que diz respeito às suas classes químicas.

---

### *III- MATERIAIS E MÉTODOS*

---

### III- Materiais e Métodos

#### 3.1- Coleta

As cascas da madeira de *Quassia amara* L (Exsicata 2114, Jardim Botânico de Sto Domingo, RD, 84374) foram coletadas a partir da planta identificada pela equipe de botânicos do Enda-Caribe (E. Rueda, B. Hernández e E. Palma); depois de secas (figura 4) estas cascas foram enviadas ao laboratório do Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, que obteve quatro extratos de diferentes polaridades: Etanólico 70% (EtOH 70%), etanólico absoluto (EtOH), diclorometânico (DCM) e hexânico (HEX). As análises fitoquímicas dos extratos vegetais também foram analisados neste mesmo laboratório.

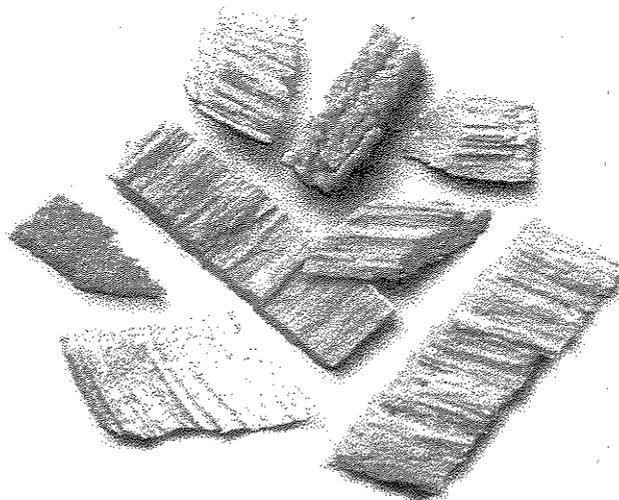
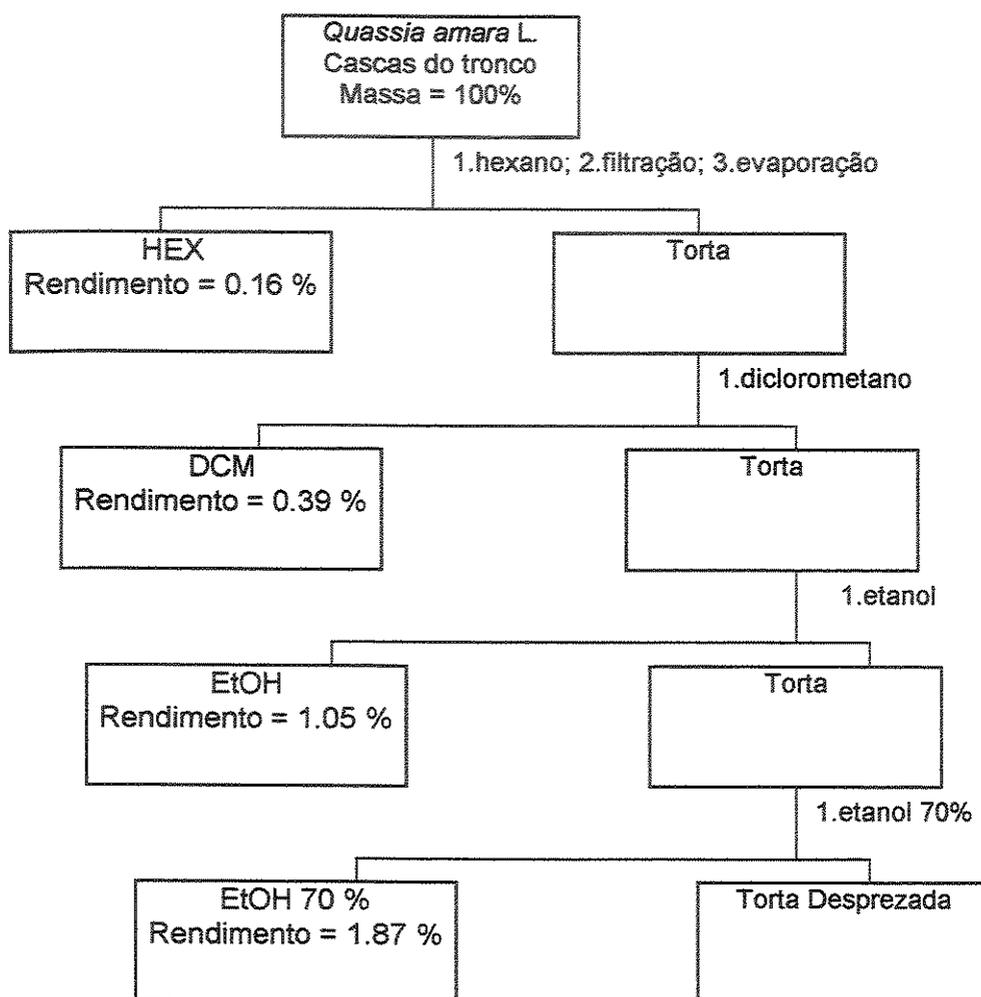


Figura 4: cascas secas do tronco de *Quassia amara* .L

### 3.2- Processos extrativos

As cascas secas de *Quassia amara* L foram trituradas e moídas em moinho de facas. O material foi então submetido ao processo de maceração por um período de uma semana em solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (HEX → DCM → EtOH → EtOH 70%). Ao final de cada extração, as soluções foram filtradas e concentradas em rotaevaporador, obtendo-se os respectivos, como será apresentado no esquema 1 seguinte:



Esquema 1: Procedimentos de preparação/obtenção dos extratos HEX, DCM, EtOH e EtOH 70% das cascas do tronco de *Quassia amara* L.

### **3.3- Drogas para a determinação da atividade analgésica**

Para a determinação da atividade analgésica da espécie, as seguintes drogas foram utilizadas: ácido acético, morfina hidrocloreídica, indometacina (Sigma Chemical CO, USA). Os extratos foram dissolvidos em Tween 80<sup>®</sup> solução a 12% (Synth, Brazil).

### **3.4- Drogas usadas no estudo da atividade antiulcerogênica**

Para a determinação da atividade antiulcerogênica da espécie em estudo as seguintes drogas foram utilizadas: ácido clorídrico, etanol, indometacina, betanecol, cimetidina, lansoprazol (Sigma Chemical CO, USA). Os extratos foram sempre dissolvidos em Tween 80<sup>®</sup> solução a 12% (Synth, Brazil).

### **3.5- Animais**

Nos experimentos relacionados à dor e úlcera gástrica foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-40 g) obtidos da Anilab, Paulínia, SP, aclimatados às condições do biotério por pelo menos 7 dias antes da manipulação experimental sob temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (12 h) controlados, alimentados com ração Nuvital e água "ad libitum". Os animais foram distribuídos ao acaso nos vários grupos. Os tratamentos foram feitos pelas vias oral ou intraperitoneal, após período de jejum variável de acordo com a metodologia utilizada, mas sempre com água "ad libitum". O número de animais de cada grupo foi indicado em cada um dos experimentos.

Todos os procedimentos experimentais empregados tiveram seus protocolos submetidos à Comissão de Ética em Experimentação Animal,

Instituto de Biologia, Unicamp (CEEA-IB-UNICAMP) onde após aprovação receberam o certificado de número 053-1.

### **3.6- Procedimentos Experimentais**

Para os testes de determinação da atividade analgésica e antiulcerogênica, foram utilizados camundongos tratados com EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara*, solubilizados em Tween 80<sup>®</sup> 12% administrados em volume final de 10 ml/Kg, por via oral, intraperitoneal ou intraduodenal. Um grupo controle negativo foi sempre utilizado, recebendo o mesmo volume do veículo utilizado na dissolução das amostras vegetais. Um grupo controle adicional (positivo) foi também utilizado onde os animais foram tratados com drogas padrão indicadas em cada metodologia.

Os animais foram sempre mantidos em gaiola especial, sem maravalha, e submetidos a jejum por tempo variável dependendo do procedimento empregado.

#### **3.6.1- Toxicidade Aguda e DL<sub>50</sub>**

Grupos de camundongos pesando entre 25 e 35 g foram tratados, em dose única, com até 5000 mg/Kg dos extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara*. Procedeu-se a observação diária durante 14 dias, para determinar a DL<sub>50</sub> (Lietchfield & Wilcoxon, 1949) e posterior avaliação de alterações de peso corporal, pêlos e mucosas, presença de estereotipia, diarreia, convulsões e estados de depressão ou excitação nervosa (Souza-Brito, 1994).

### 3.6.2- Teste de Placa Quente

Para determinar a latência de instalação de dor neste experimento foi utilizado o aparelho Hot Plate (Ugo Basile, Model DS 37), mantido a uma temperatura constante de  $56 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os animais foram colocados em um cilindro de vidro de 24 cm de diâmetro com calor na sua superfície. O tempo decorrente entre o primeiro contato do animal com a placa até o momento em que o mesmo lambe suas patas dianteiras ou então efetua um salto repentino, foi determinado como latência.

A latência foi determinada para camundongos do grupo controle negativo, para animais controles positivos pré-tratados com morfina (10 mg/Kg s.c.) e para aqueles tratados com os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM ou HEX, nas doses de 100 ou 250 mg/Kg, administrados pelas vias oral ou intraperitoneal. Estas substâncias foram administradas 30 min antes do início do experimento de determinação da latência. Dois outros controles foram realizados: análises preliminares para avaliação comparativa da latência dos animais 24 horas antes de se iniciar o experimento e aquele obtido no momento (tempo 0) do procedimento; a finalidade destes controles é padronizar os animais utilizados, evitando assim animais subsensibilizados ou hipersensibilizados. Não foram encontradas diferenças significativas entre estas latências. Todos os animais foram observados antes (0) e 30, 60, 90, 120 e 240 min após administração das drogas. O período de latência de 20 s foi estabelecido como analgesia completa (Eddy & Leimback, 1953).

### **3.6.3- Antagonismo aos Receptores Opióides**

Para analisar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo dos extratos de *Quassia amara* L. foi utilizado o mesmo modelo do experimento anterior; neste caso os animais foram pré-tratados com naloxana (5 mg/Kg, i.p.), 15 min antes da administração dos extratos testados e dos controles positivo e negativo.

### **3.6.4- Edema de Pata Induzido por Carragenina**

O experimento realizado foi similar ao descrito por Henriques *et al.* (1987), onde grupos de camundongos, pesando entre 30 e 32 g, foram utilizados para determinar a atividade antiedematogênica das amostras vegetais de *Quassia amara* L.. Os animais foram pré-tratados com os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX, na dose de 250 mg/Kg por via oral; 30 mg/Kg de indometacina (controle positivo), administrada por via subcutânea e 10 ml/Kg de Tween 80<sup>®</sup> a 12% (controle negativo). Trinta min após os tratamentos foi administrada uma injeção de 250 µg de carragenina (1% em suspensão salina 0,9%, estéril) na pata posterior esquerda do animal; a pata contralateral recebeu volume similar de salina 0,9% estéril. Três horas após a administração de carragenina os animais foram sacrificados, as patas foram amputadas na altura da articulação tibiotársica e pesadas. O aumento de peso da pata causado pela administração do agente irritante foi determinado pela diferença de peso entre as patas.

### **3.6.5- Testes para Avaliação da Atividade Antiulcerogênica**

Nos testes de atividade antiulcerogênica foram sempre utilizados 6 grupos de animais: os 4 extratos obtidos de *Quassia amara* e os outros

dois funcionaram como grupos controles positivo e negativo. O volume final das substâncias administradas por via oral aos animais foi sempre de 10 ml/Kg. Ao final de cada metodologia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados e inflados com 2,0 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%) e abertos ao longo da curvatura maior. Em seguida os estômagos retirados permaneceram em formalina 5% durante um período de 30 min para fixação e posterior determinação das lesões.

As lesões ulcerativas foram contadas e classificadas de acordo com sua severidade (Szelenyi & Thiemer, 1978) em:

Lesões nível 1 (< 1 mm), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas, ≥ 3 mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) de acordo com a seguinte equação:

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

#### **3.6.5.1- Úlcera Gástrica Induzida por HCl-etanol**

A metodologia utilizada neste experimento foi descrita por Mizui & Doteuchi (1983). Após 24 h de jejum, grupos de camundongos foram tratados com 30 mg/Kg de lansoprazol (controle positivo), 10 ml/Kg do controle negativo, 100 mg/Kg dos extratos EtOH, 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara*, 50 min antes da indução da lesão gástrica. Ainda neste modelo experimental foram utilizadas 3 outras doses (25, 50 ou 75 mg/Kg) dos extratos administrados por via oral.

A lesão gástrica foi induzida pela administração, via oral, de 0.2 ml de uma solução de HCl 0.3 M/etanol 60%. Os animais foram sacrificados

1 hora após a administração do agente lesivo e os estômagos retirados para posterior contagem das lesões.

#### **3.6.5.2- Úlcera gástrica induzida por DAINÉ associado a um agente parassimpatomimético**

Neste experimento foi utilizada a metodologia descrita por Rainsford (1978). Foram utilizados grupos de camundongos Swiss, machos, pesando entre 30-35 g, deixados em jejum por um período de 24 h. A estimulação parassimpática foi induzida pela administração i.p. de betanecol, na dose de 5 mg/Kg, preparado em solução de NaCl 0.15 M imediatamente antes do uso. A indometacina, também preparada imediatamente antes da utilização em solução de NaHCO<sub>3</sub> 5% foi administrada concomitantemente ao betanecol, na dose de 30 mg/Kg, por via subcutânea.

Os tratamentos com 100 mg/Kg dos extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara*, 100 mg/Kg de cimetidina (controle positivo) e 10 ml/Kg do controle negativo, foram realizados 30 min antes da administração dos agentes indutores, por via oral. Os animais foram sacrificado 4 horas após aplicação dos estímulos lesivos. Os estômagos foram removidos para contagem das lesões.

#### **3.6.5.3- Úlcera Gástrica Induzida por Imobilização e Frio (Estresse)**

A metodologia utilizada na indução do estresse foi descrita por Levine (1971), com algumas modificações realizadas em nosso laboratório. Após 36 h de jejum camundongos pesando entre 40 ± 2 g foram tratados com os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX.

Cimetidina (100 mg/Kg) foi utilizada como controle positivo; o controle negativo Tween 80<sup>®</sup> 12 % foi o veículo empregado na solubilização dos extratos. Todas as substâncias foram administradas 30 min antes da indução das lesões ulcerosas por imobilização dos animais em contensores de PVC. Em seguida os animais foram deixados a 4° C por 3 horas. Após este período os animais foram sacrificados e os estômagos retirados para contagem das lesões.

#### **3.6.5.4- Análise dos Parâmetros Bioquímicos do Conteúdo Gástrico de Camundongos Submetidos à Ligadura do Píloro**

O método empregado neste experimento foi aquele descrito por Shay *et al*, 1945, para ratos, porém com algumas modificações para utilização em camundongos. Após 36 h de jejum, camundongos, pesando entre 35-40 g sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para que se procedesse a ligadura do píloro. A administração das amostras, 100 mg/Kg dos extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara*, 100 mg/Kg de cimetidina (controle positivo) e 10 ml/Kg de Tween 80<sup>®</sup> 12% (controle negativo), foi realizada por via intraduodenal logo após a ligadura do píloro, sendo as incisões então suturadas. Três horas após a cirurgia os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, as incisões reabertas e, após ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico), os estômagos foram retirados. O conteúdo estomacal de cada animal foi coletado e, em seguida, foram determinados: volume, pH e concentração de íons H<sup>+</sup> do suco gástrico. Para tal, adicionou-se água destilada ao conteúdo estomacal até completar um volume final de 10 ml. Esta

solução foi então centrifugada por 10 min a 3000 rpm e o sobrenadante foi titulado com NaOH 0.01 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração total de ácido foi expressa em mEq/ml/3 hs.

### **3.7- Análise Estatística**

Os resultados apresentados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (epm). Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnet, com nível de significância mínimo de  $p < 0,05$  para todas as análises.

### **3.8- Análise Fitoquímica dos Extratos de *Quassia amara***

#### **3.8.1- Fracionamento do Extrato Hexânico**

Para avaliação fitoquímica mais refinada do(s) composto(s) presentes em *Quassia amara*, foi realizado fracionamento do extrato HEX. Para tanto, 500 mg deste extrato foram triturados com pequena quantidade de sílica para poder ser aplicado em uma coluna de sílica de 2 cm d.i. preparada com 20 g de sílica. A eluição foi desenvolvida no modo gradiente com misturas hexano/acetato de etila em polaridade crescente, iniciando com 100 % de hexano puro e finalizando com 100 % de acetato de etila puro. Foram coletadas 60 frações de 10 ml cada. As frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) (Sílica; hexano/acetato de etila 8:2). As frações semelhantes e que se apresentaram mais puras foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN H) e por Espectroscopia de Massas (ES-MS).

### **3.8.2- Análise Cromatográfica dos Extratos e Frações de *Quassia amara***

Foram preliminarmente analisados por cromatografia de camada delgada (CCD), os extratos brutos hexânico, diclorometânico e etanólico de *Quassia amara* L.. As amostras dos extratos foram aplicadas em placa de sílica gel eluída no sistema de solventes tolueno, acetona e ácido acético na proporção 7:3:0.5. A placa assim obtida foi revelada sob luz UV e iodo. Uma outra placa foi obtida visando análise dos 4 extratos e as frações obtidas a partir do extrato HEX de *Quassia amara*, após revelação com anidrido acético/ácido sulfúrico.



8

## *IV-RESULTADOS*



## IV- Resultados

### 4.1- Toxicidade Aguda e Determinação da DL50

**Tabela 1:** Toxicidade Aguda e determinação da DL<sub>50</sub> dos Extratos de *Quassia amara* administrados pela via oral na dose de 5000 mg/Kg

Tratamentos	Via	Dose (mg/kg)	n	Morte
EtOH 70 %	v.o	5000	10	00
EtOH	v.o	5000	10	00
DCM	v.o	5000	10	00
HEX	v.o	5000	10	00
Tween 80 12 %	v.o	10ml/Kg	10	00

A tabela acima demonstra a avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL<sub>50</sub> dos extratos de *Quassia amara* administrados pela via oral na dose de 5000 mg/Kg. Conforme pode-se observar, nenhum dos extratos foi capaz de promover a morte dos animais utilizados. Além disso nenhum sinal de toxicidade aguda foi relatado durante os 14 dias de observação, demonstrando com isso a inocuidade tóxica das substâncias presentes nestes extratos.

**Tabela 2:** Toxicidade Aguda e determinação da DL<sub>50</sub> dos Extratos de *Quassia amara* administrados pela via intraperitoneal na dose de 1000 mg/Kg

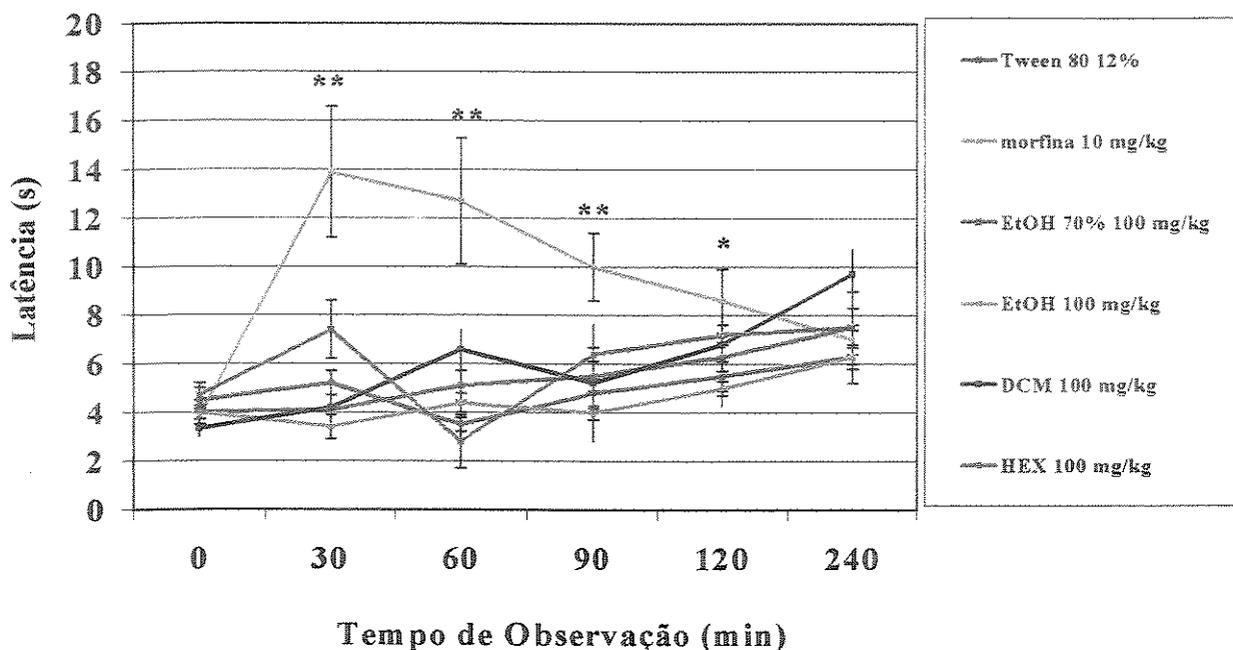
Tratamentos	Via	Dose (mg/kg)	n	Morte
EtOH 70 %	i.p	1000	10	00
EtOH	i.p	1000	10	00
DCM	i.p	1000	10	00
HEX	i.p	1000	10	05
Tween 80 12 %	i.p	10ml/Kg	10	00

A tabela acima demonstra a avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL<sub>50</sub> dos extratos de *Quassia amara* administrados pela via intraperitoneal na dose de 1000 mg/Kg. Novamente os extratos EtOH 70%, EtOH e DCM não foram capazes de provocar a morte de nenhum dos animais utilizados, bem como nenhum sinal de toxicidade aguda foram relatados. Já com a administração do extrato HEX por esta via, este foi capaz de provocar a morte de 50% da população utilizada bem como sinais de toxicidade aguda foram relatados durante os 14 dias de observação.

#### **4.2- Teste de Placa Quente com Administração Prévia dos Extratos por Via Oral**

Os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX, foram inicialmente testados nas doses de 100 e 250 mg/Kg por via oral, em camundongos. Os resultados obtidos nestes experimentos estão demonstrados nas figuras 5 e 6, respectivamente.

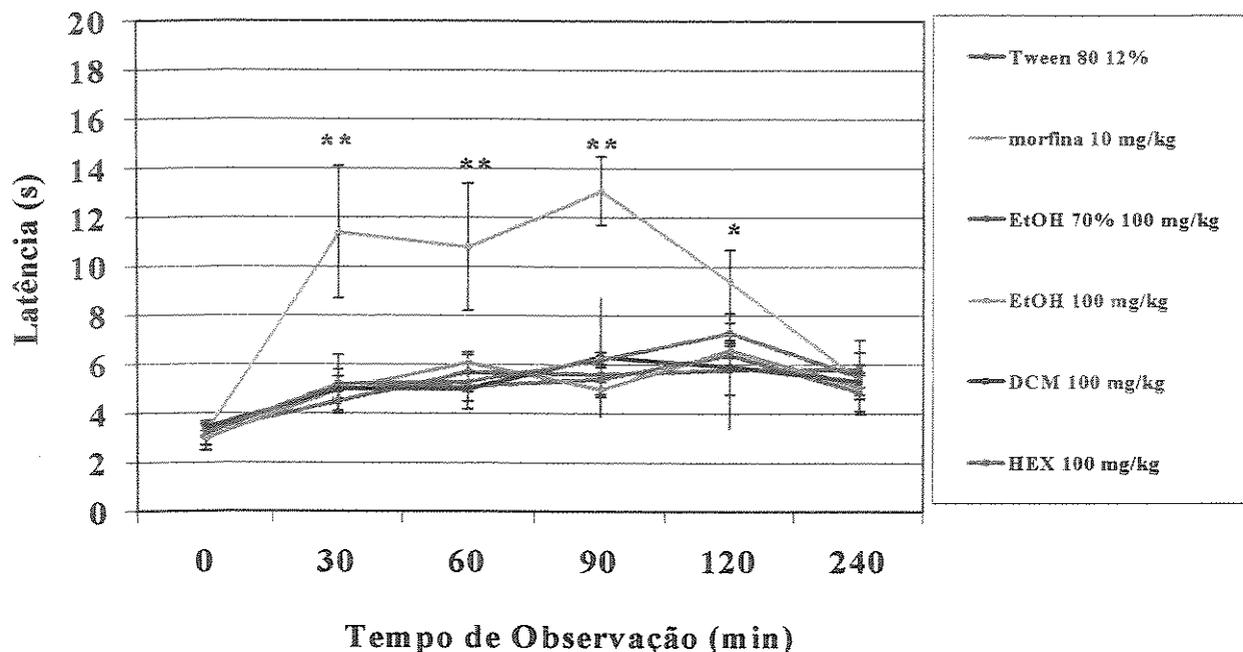
**Figura 5:** Efeitos dos extratos de *Quassia amara*, administrados oralmente, na dose de 100 mg/Kg e morfina, no teste de placa quente em camundongos.



Diferenças estatísticas estabelecidas em comparação com o grupo controle para cada tempo de observação para cada grupo de 5-6 animais. ANOVA  $F_{(5,29)}$ ; 30 min = 10.86; 60 min = 8.15; 90 min = 7.41; 120 min = 2.71;  $p < 0.05$ , Teste de Dunnett, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

Observou-se que, nas condições testadas, nenhum dos extratos apresentou diferenças significativas no limiar analgésico em relação aos animais controles, em nenhum dos tempos de avaliação.

**Figura 6:** Efeitos dos extratos de *Quassia amara* administrados oralmente, na dose de 250 mg/kg, e morfina, no teste de placa quente em camundongos.

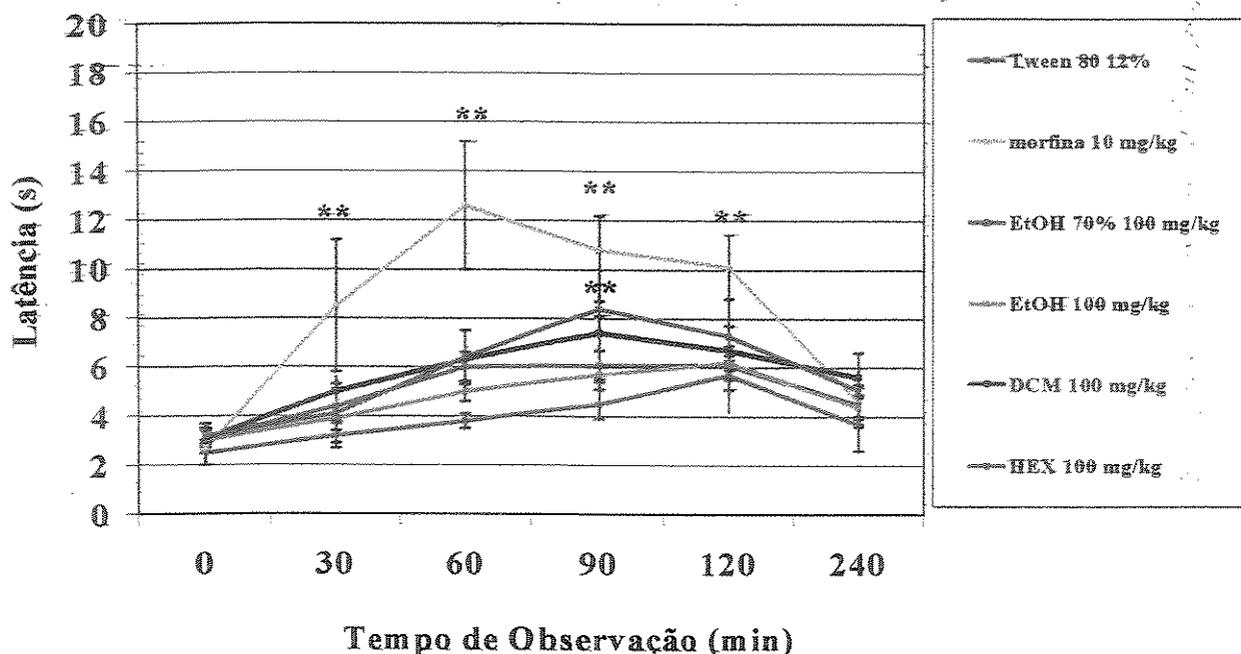


Diferenças estatísticas estabelecidas em comparação com o grupo controle para cada tempo de observação para cada grupo de 7-8 animais. ANOVA  $F_{(5,40)}$ ; 30 min = 13.98; 60 min = 7.96; 90 min = 8.99; 120 min = 1.96;  $p < 0.05$ , Teste de Dunnett, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

#### 4.3- Teste de Placa Quente com Administração Prévia dos Extratos por Via Intraperitoneal

A figura 7 apresenta os resultados obtidos das latências (evolução temporal da nocicepção) da morfina (10mg/Kg), administrada por via subcutânea, e dos extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX das cascas de *Quassia amara* L., na dose de 100 mg/Kg, administrados por via intraperitoneal, em camundongos, nos tempos de observação discutidos anteriormente.

**Figura 7:** Efeitos dos extratos de *Quassia amara* administrados intraperitonealmente, na dose de 100 mg/kg, e morfina, no teste de placa quente em camundongos.

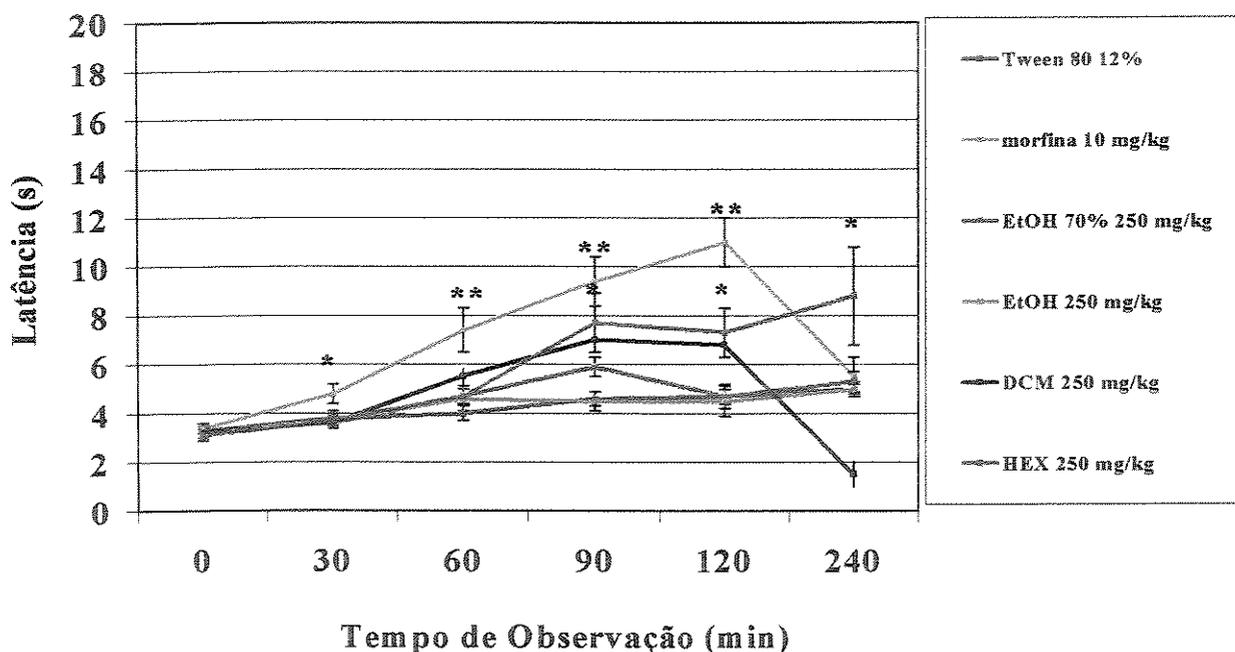


Diferenças estatísticas estabelecidas em comparação com o grupo controle para cada tempo de observação para cada grupo de 8 animais. ANOVA  $F_{(5,42)}$ ; 30 min = 5.43; 60 min = 18.12; 90 min = 10.15; 120 min = 4.06  $p < 0.05$ , Teste de Dunnett, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

Foi possível observar que a administração dos extratos DCM e HEX aumentou significativamente a latência de resposta dos animais no tempo de observação 90 min, fato que não ocorreu com os extratos EtOH 70 % e EtOH. Já a morfina, utilizada como droga padrão, apresentou significativo aumento de latência de resposta dos animais nos tempos 30, 60, 90 e 120 min, quando os mesmos foram comparados aos valores do grupo controle.

A figura 8 apresenta os resultados obtidos das latências induzidas pela morfina, administrada por via subcutânea (10 mg/Kg), e por EtOH 70 %, EtOH, DCM e HEX das cascas de *Quassia amara* L., na dose de 250 mg/Kg, administrados por via intraperitoneal, nos tempos de observação dos experimentos anteriores.

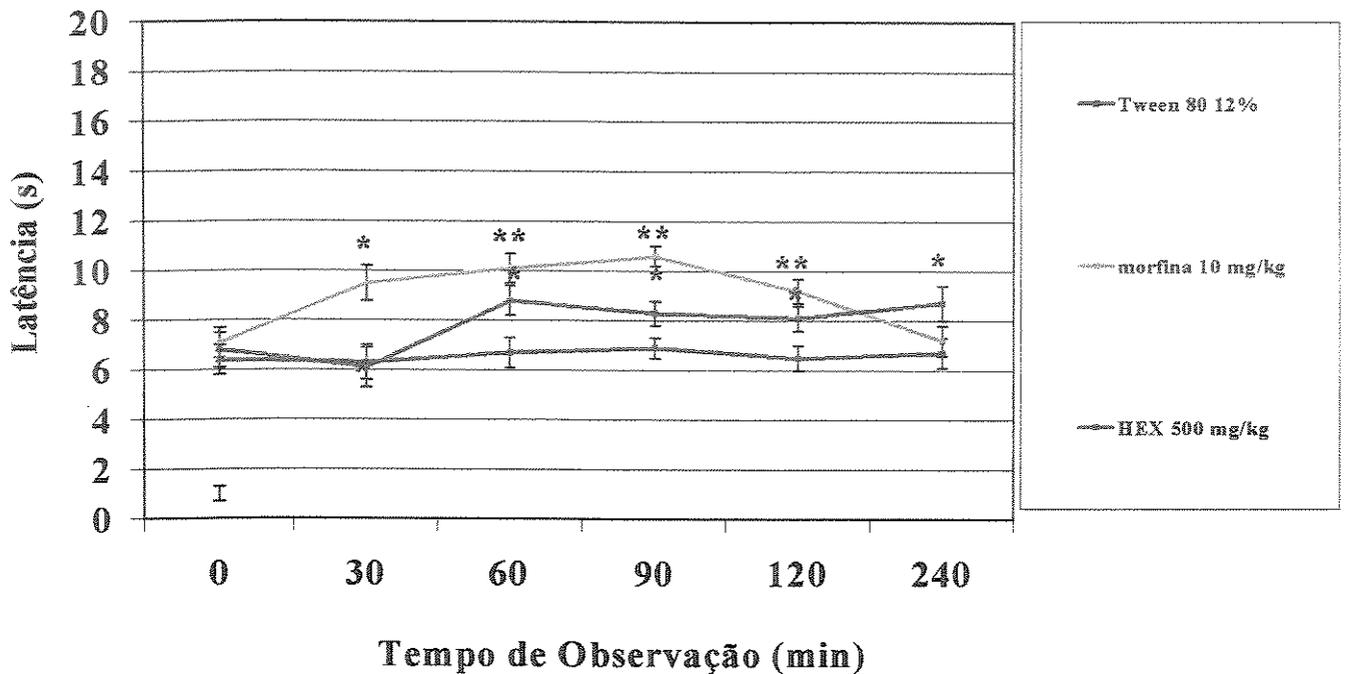
**Figura 8:** Efeitos dos extratos de *Quassia amara*, administrados intraperitonealmente, na dose de 250 mg/kg, e morfina, no teste de placa quente em camundongos.



Diferenças estatísticas estabelecidas em comparação com o grupo controle para cada tempo de observação para cada grupo de 8 animais. ANOVA  $F_{(5,42)}$ ; 30 min = 3.31; 60 min = 6.12; 90 min = 7.79; 120 min = 13.08  $p < 0.05$ , Teste de Dunnett, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

A morfina, como esperado, apresentou aumento significativo na latência de resposta dos animais à temperatura, nos tempos 30, 60, 90 e 120 min, quando comparada aos valores do grupo controle. O extrato DCM, apesar do aumento da dose, não apresentou atividade analgésica significativa. Mais uma vez, os extratos EtOH 70% e EtOH não demonstraram diferenças significativas na resposta dos animais. O extrato HEX, novamente, não só apresentou aumento significativo na latência da resposta dos animais testados a partir do 90° min de observação, como também manteve tal atividade até o último tempo de observação (240 min). Fato interessante é que neste tempo, a morfina já apresentava sinais de redução de sua atividade.

**Figura 9:** Efeitos do extrato HEX de *Quassia amara*, administrado intraperitonealmente na dose de 500 mg/kg, e morfina, no teste de placa quente em camundongos.



Diferenças estatísticas estabelecidas em comparação com o grupo controle para cada tempo de observação para cada grupo de 8-9 animais. ANOVA  $F_{(2,26)}$ ; 30 min = 6.85; 60 min = 7.96; 90 min = 19.04; 120 min = 8.61; 240 min = 2.61  $p < 0.05$ , Teste de Dunnett, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

Os resultados apresentados na figura 9 novamente demonstram a atividade analgésica do extrato HEX, quando este foi administrado pela via intraperitoneal na dose de 500 mg/kg. Com o aumento da dose utilizada, o início da atividade evidenciada adiantou-se (60 min) em relação às doses anteriores, que demonstraram início da atividade

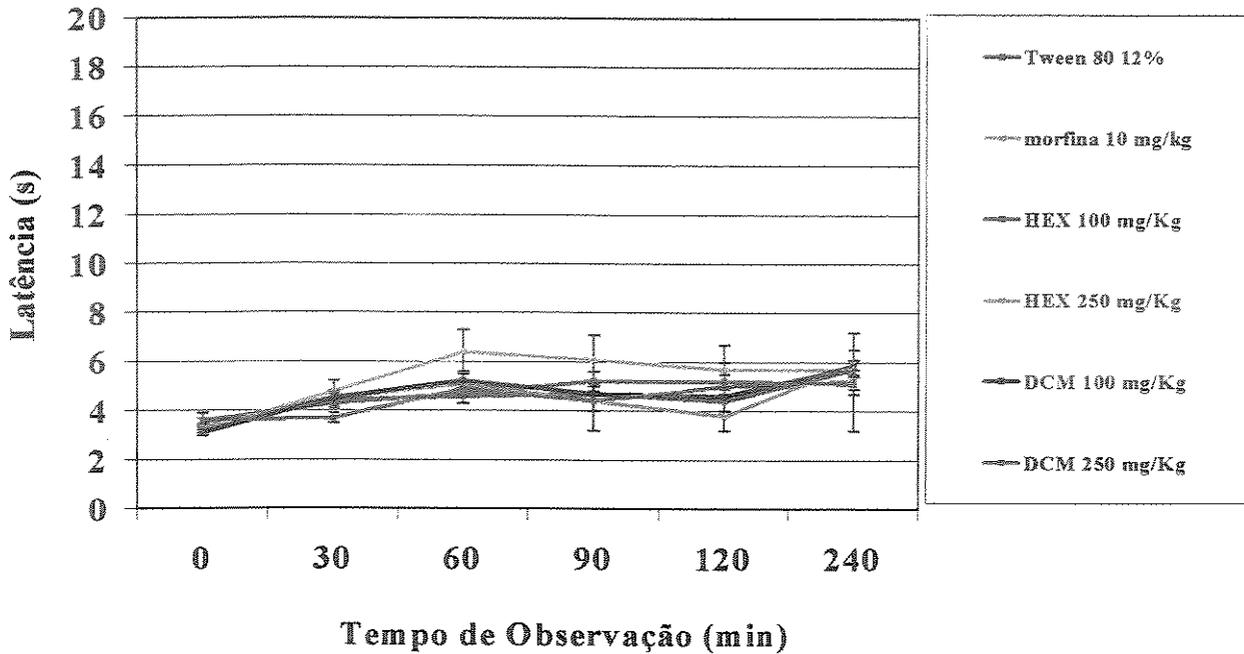
somente no tempo de 90 min. A analgesia apresentada por HEX permaneceu até o tempo final de observação.

#### **4.4- Mecanismo de ação da atividade analgésica**

##### **4.4.1- Teste de placa quente com naloxana**

Após ter sido observada a atividade analgésica dos extratos DCM (100 mg/Kg via i.p.) e HEX (100, 250 e 500 mg/Kg, via i.p.) foi avaliada a possível participação de receptores opióides nesta atividade dos extratos. O modelo empregado foi o da placa quente em camundongos, porém, com administração prévia de naloxana (5 mg/Kg, via i.p.), um antagonista de receptores opióides. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 10 e 11.

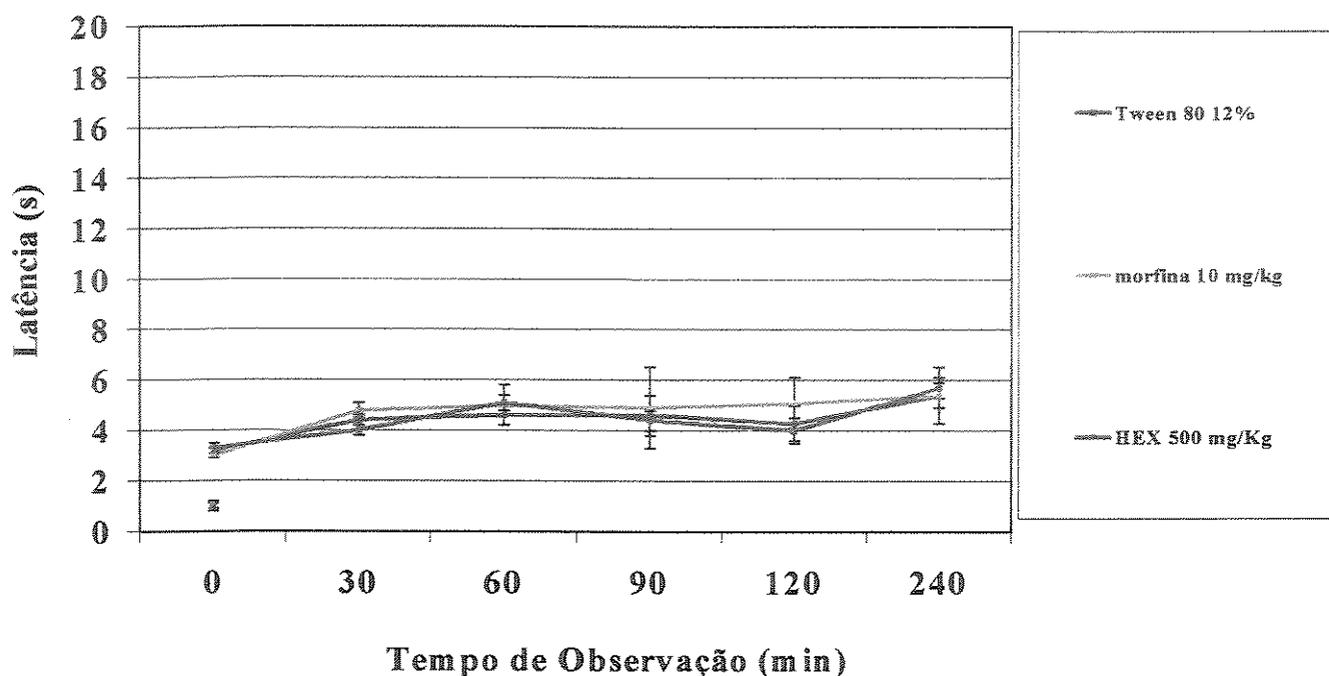
**Figura 10:** Efeitos dos extratos DCM e HEX de *Quassia amara*, administrados intraperitonealmente nas doses de 100 e 250 mg/kg, e morfina (s.c.), no teste de placa quente em camundongos, após administração prévia do antagonista naloxana.



Diferenças estatísticas estabelecidas em comparação com o grupo controle para cada tempo de observação para cada grupo de 8 animais. ANOVA  $F_{(5,42)}$  0 min = 1.71; 30 min = 1.37; 60 min = 1.71; 90 min = 0.76; 120 min = 1.54; 240 min = 0.26  $p > 0.05$ .

Conforme demonstrado nos resultados na figura 10, pode-se observar a reversão da atividade analgésica evidenciada nos experimentos anteriores tanto dos extratos DCM e HEX, quanto da droga padrão morfina.

**Figura 11:** Efeitos do extrato HEX de *Quassia amara*, administrado Intraperitonealmente na dose de 500 mg/kg, e morfina, no teste de placa quente em camundongos, após administração prévia do antagonista naloxana.



Diferenças estatísticas estabelecidas em comparação com o grupo controle para cada tempo de observação para cada grupo de 8 animais. ANOVA  $F_{(4,51)}$  0 min = 1.005; 30 min = 1.190; 60 min = 1.069; 90 min = 0.815; 120 min = 3.223; 240 min = 0.290  $p > 0.05$ .

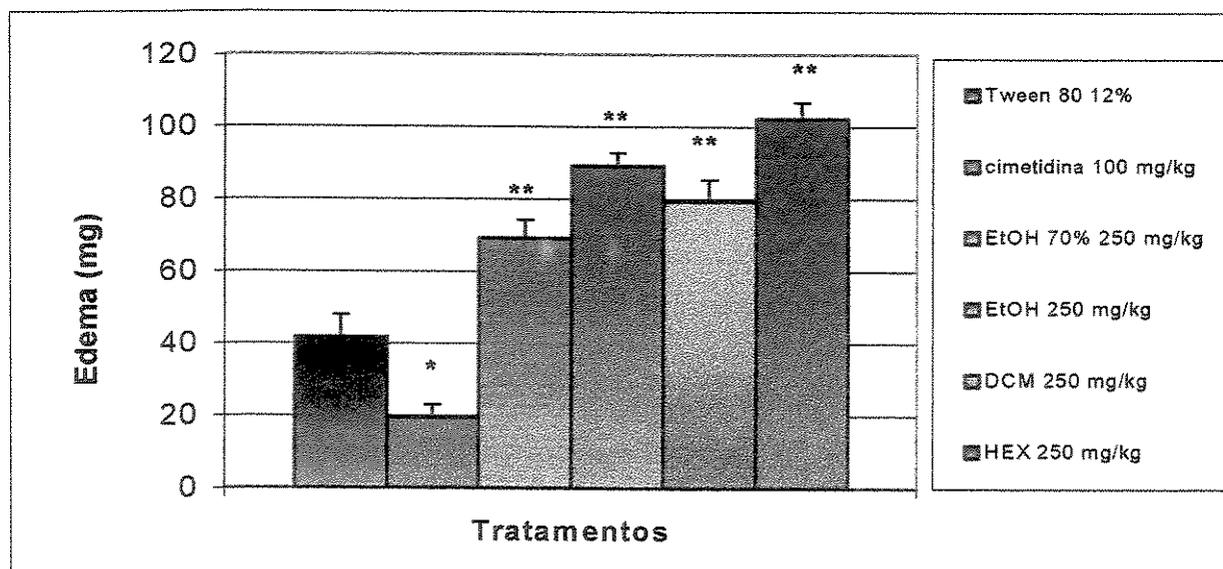
O antagonista naloxana reverteu também a atividade analgésica anteriormente demonstrada pelo extrato HEX, mesmo após a administração da dose, ou seja, 500 mg/kg.

## 4.5- Avaliação da Atividade Antiedematogênica

### 4.5.1-Edema de pata induzido por carragenina

O possível efeito antiinflamatório dos extratos foi avaliado no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX foram administrados na dose de 250 mg/Kg, por via oral 30 min antes da administração de carragenina. Os resultados obtidos encontram-se expressos na figura 12.

Figura 12: Edema de pata induzido por carragenina em camundongos pré-tratados oralmente com os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara*.



Os valores expressos representam a média do edema de pata para cada grupo de animais tratados (n=8). ANOVA  $F_{(5,66)} = 40.781$   $p < 0.05$ ; Teste de Dunnett \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$

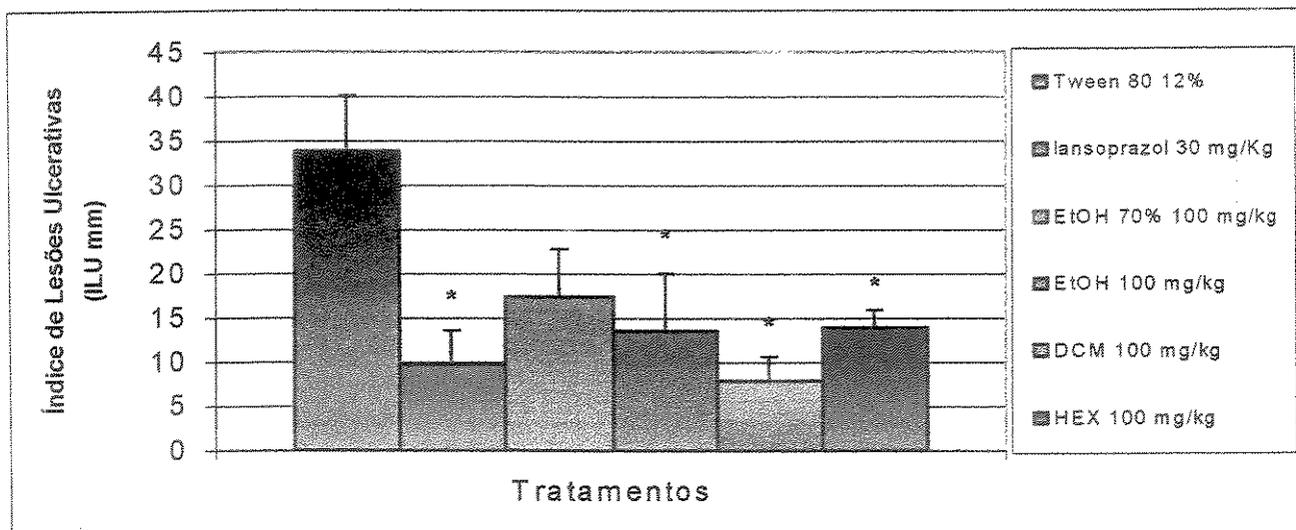
Nenhum resultado significativo (diminuição do edema) foi encontrado. Ao contrário do esperado, todos os extratos apresentaram aumento significativo no edema induzido nas patas dos animais pela carragenina. A hipótese de uma possível atividade antiedematogênica dos extratos foi assim descartada.

#### **4.6- Avaliação da Atividade Antiulcerogênica**

##### **4.6.1- Úlcera gástrica induzida por HCl/etanol**

A atividade antiulcerogênica dos extratos EtOH 70 %, EtOH, DCM e HEX das cascas de *Quassia amara*, foi inicialmente investigada no modelo experimental de úlcera gástrica induzida por HCl/etanol. Todos os extratos foram administrados por via oral, na dose de 100 mg/kg, 30 minutos antes do agente indutor. Os dados obtidos neste ensaio estão apresentados na figura 13.

**Figura 13:** Índice de lesões ulcerativas induzidas por HCl-etanol em camundongos pré-tratados com extrato EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara* na dose de 100 mg/kg por via oral



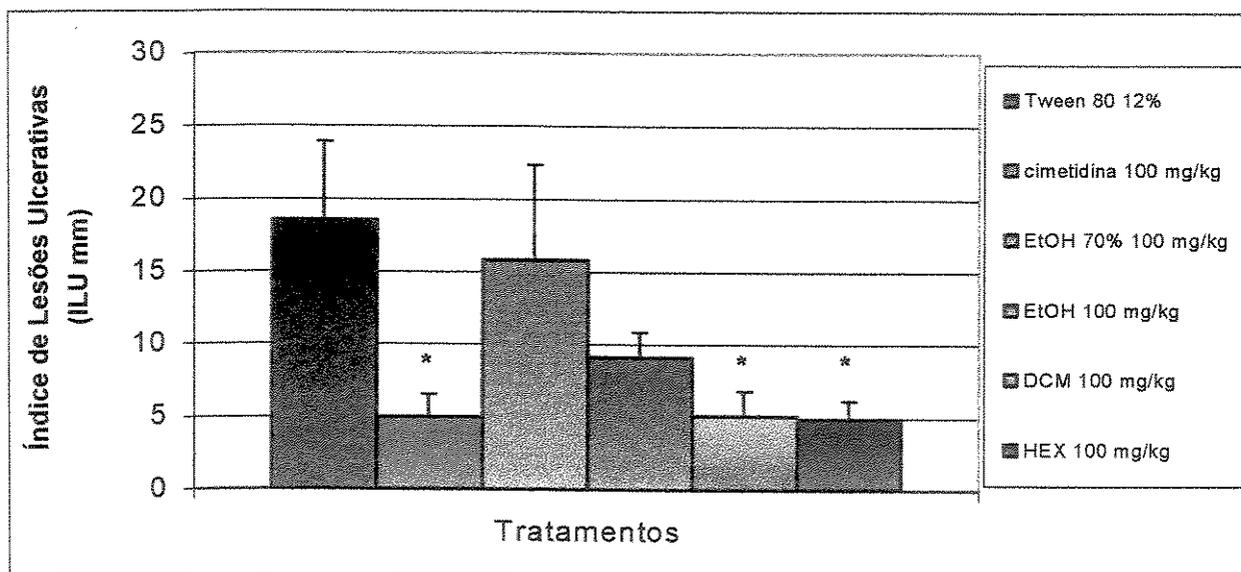
Os valores expressos representam a média  $\pm$  erro padrão do ILU para cada grupo de animais tratados (n=6). ANOVA:  $F_{(5,30)} = 7.054$   $p < 0.05$ , Teste de Dunnett: \* $p < 0.05$ .

Os resultados demonstraram que o extrato EtOH 70 % não apresentou inibição significativa sobre as lesões ulcerogênicas produzidas por HCl/etanol. Já os extratos EtOH, DCM e HEX apresentaram inibição significativa do ILU de 60.1 %, 76.6 % e 58.9 %, respectivamente quando comparados ao controle. O controle positivo cimetidina demonstrou 71 % de inibição das lesões.

#### 4.6.2- Úlcera gástrica induzida por Daine associada a um agente parassimpatomimético

Os agentes indutores de úlceras foram aplicados 30 min após o tratamento dos animais, por via oral, com 100 mg/kg de cada extrato ou cimetidina administrada pela mesma via e na mesma dose. Os resultados obtidos estão expressos na figura 14.

**Figura 14:** Índice de lesões ulcerativas induzidas por Indometacina-betanecol em camundongos pré-tratados com o extrato EtOH 70 %, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara* na dose de 100 mg/kg, por via oral



Os valores expressos representam a média  $\pm$  erro padrão do ILU para cada grupo de animais tratados ( $n = 8$ ). ANOVA:  $F_{(5,42)}=2.156$   $p<0.05$ ; Teste de Dunnett:  $*p<0.05$ .

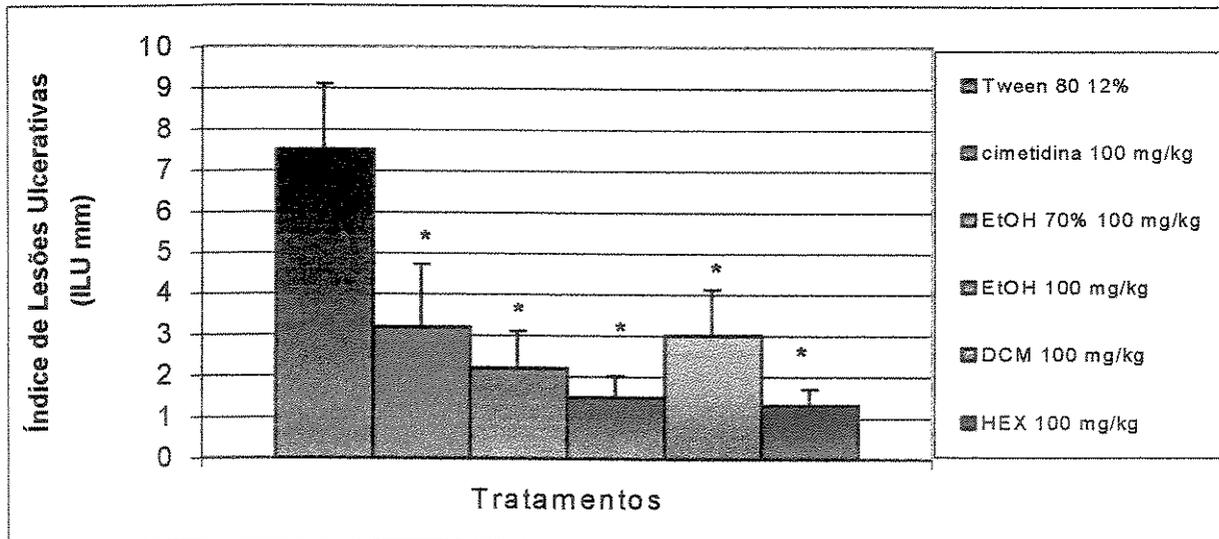
Os extratos mais polares, EtOH 70 % e EtOH, não apresentaram inibição significativa sobre as lesões estudadas; pelo contrário, só os extratos apolares, DCM e HEX assim como a cimetidina, demonstraram

inibição das lesões em cerca de 73.0% quando comparados ao grupo controle.

#### 4.6.3- Úlcera gástrica por contenção e frio (estresse)

Os resultados obtidos no modelo de úlcera gástrica induzida por contenção e frio (estresse) em camundongos, estão apresentados na figura 15. Como nos demais experimentos, todos os extratos foram administrados, por via oral, na dose de 100 mg/kg, 30 min antes dos animais terem sido contidos e submetidos ao frio.

**Figura 15:** Índice de lesões ulcerativas induzidas por imobilização e frio (estresse) em camundongos pré-tratados com os extratos EtOH 70 %, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara* na dose de 100 mg/kg, por via oral.



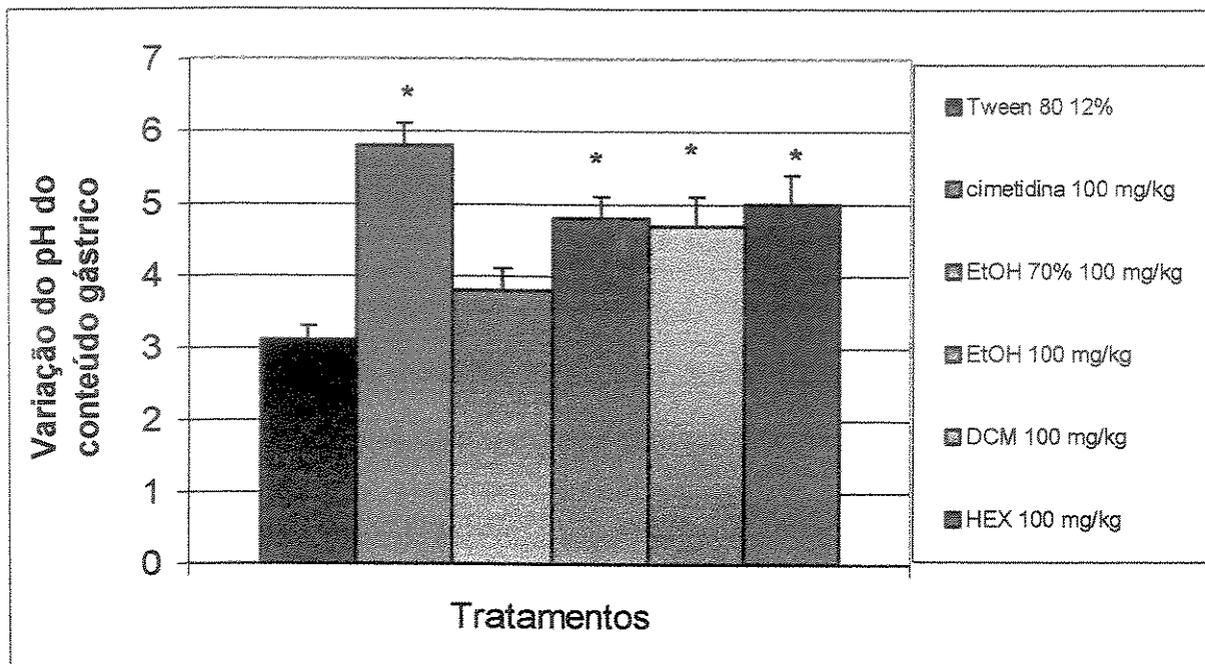
Os valores expressos representam a média  $\pm$  erro padrão do ILU para cada grupo de animais tratados (n=6). ANOVA:  $F_{(5,30)} = 4.021$   $p < 0.05$ ; Teste de Dunnett: \* $p < 0.05$ .

Todos os extratos inibiram significativamente o aparecimento das lesões induzidas por estresse. Estes resultados demonstraram uma potente atividade, principalmente EtOH e HEX, em inibir o ILU, quando comparados ao grupo controle. As inibições apresentadas pelos extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX foram de 71 %, 80 %, 60 % e 83 %, respectivamente. Foi possível notar ainda que as porcentagens de inibição foram superiores àquelas obtidas para o controle positivo cimetidina (57%) administrada na mesma dose.

#### **4.7- Análise dos Parâmetros Bioquímicos do Conteúdo Gástrico Após Ligadura do Píloro em Camundongos**

Foram avaliados os parâmetros bioquímicos, pH, volume e concentração hidrogeniônica, do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura do píloro, com subsequente administração intraduodenal dos extratos EtOH 70 %, EtOH, DCM e HEX das cascas de *Quassia amara*. As figuras 16, 17 e 18 mostram os resultados obtidos

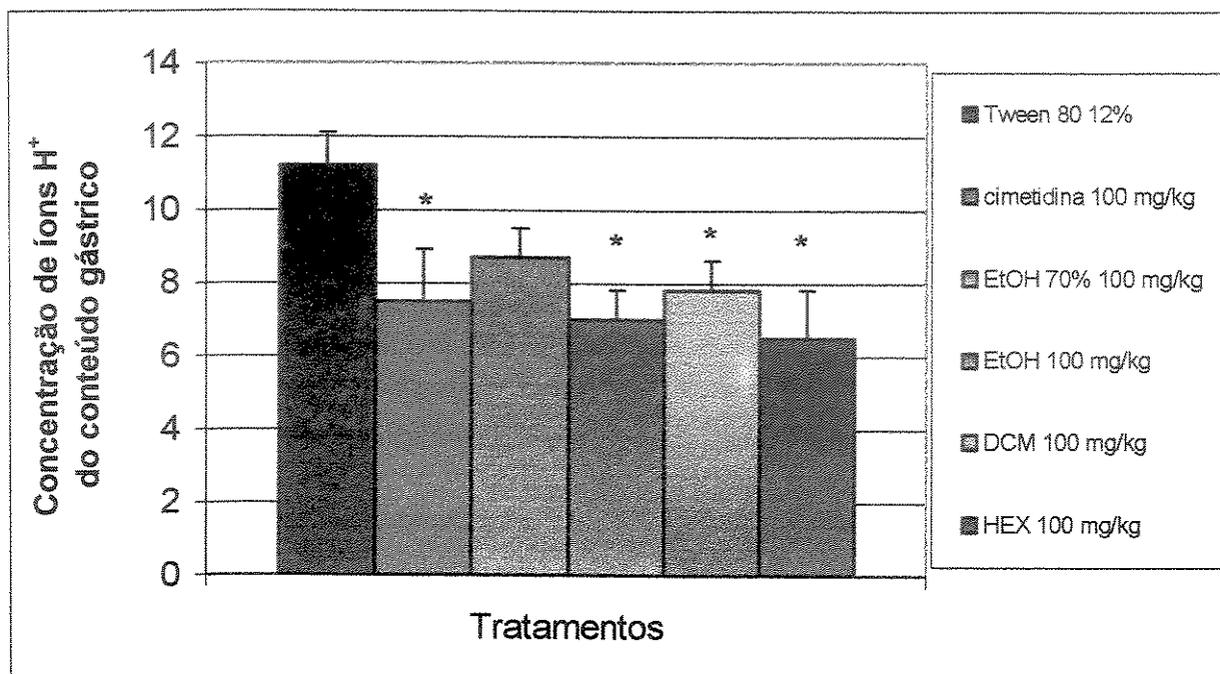
**Figura 16:** Variação do pH do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura do piloro, tratados com EtOH 70 %, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara* (100 mg/Kg), por via intraduodenal



Os valores expressos representam a média ± erro padrão dos valores de pH para cada grupo de animais tratados (n= 15-20). ANOVA  $F_{(5,100)} = 9.036$   $p < 0.05$ , Teste de Dunnett: \* $p < 0.05$

Os extratos EtOH, DCM e HEX, assim como a cimetidina, apresentaram valores de pH mais básicos que aqueles do grupo controle; o extrato EtOH 70% não modificou significativamente os valores de pH do conteúdo gástrico em relação aos observados com o grupo controle.

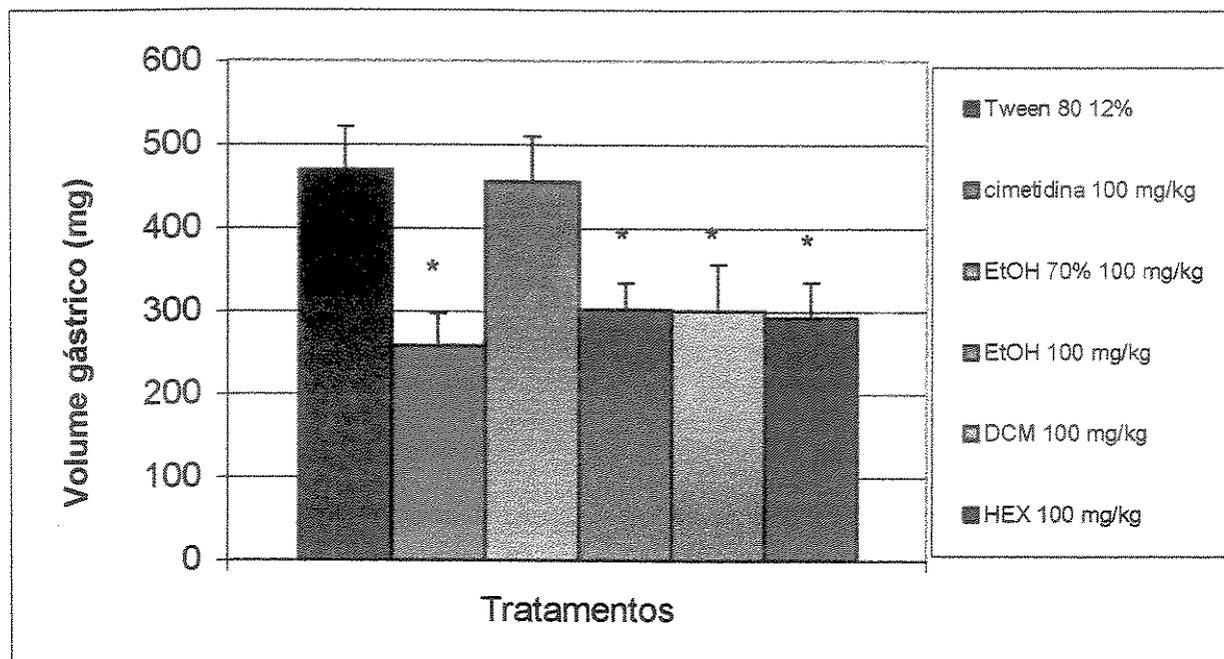
**Figura 17:** Concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura do piloro, tratados com EtOH 70 %, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara* (100 mg/Kg), por via intraduodenal.



Os valores expressos representam a média  $\pm$  erro padrão dos valores da concentração hidrogeniônica para cada grupo de animais tratados (n= 15-20). ANOVA  $F_{(5, 100)} = 3.101$ ,  $p < 0.05$ ; Teste de Dunnett  $*p < 0.05$ .

Como esperado, aqueles extratos ou a cimetidina, que elevaram o pH do suco gástrico, o fizeram graças a uma diminuição na concentração hidrogeniônica da secreção. O extrato EtOH 70% não produziu alterações estatisticamente significativas no parâmetro analisado, em relação aos valores obtidos para o grupo controle.

**Figura 18:** Volume de secreção gástrica de camundongos submetidos à ligadura do piloro, tratados com EtOH 70 %, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara*, por via intraduodenal



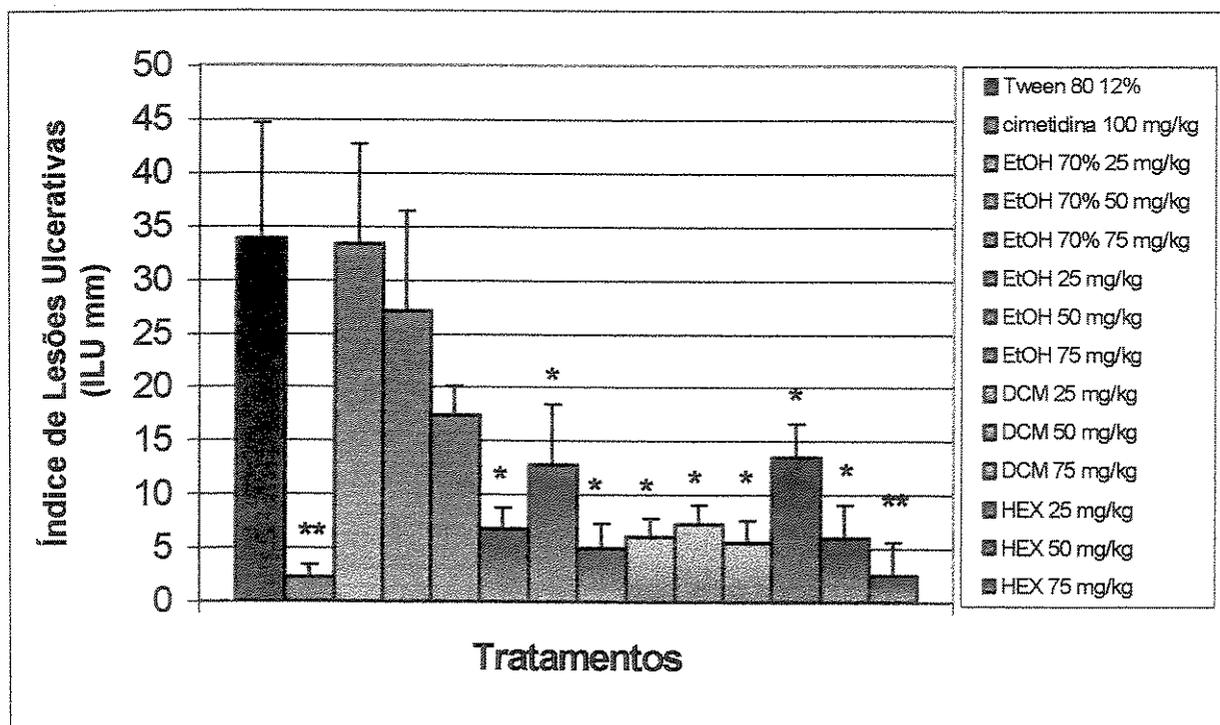
Os valores expressos representam a média  $\pm$  erro padrão dos valores da secreção gástrica (volume) para cada grupo de animais tratados (n=15-20). ANOVA  $F_{(5, 100)} = 3.895$ ,  $p < 0.05$ ; Teste de Dunnett \* $p < 0.05$ .

Do mesmo modo, os extratos EtOH, DCM e HEX, bem como cimetidina, reduziram significativamente o volume da secreção gástrica, enquanto que EtOH não modificou o parâmetro estudado quando comparados aos parâmetros do grupo controle (figura 18).

#### 4.8- Análise da relação dose-dependência dos extratos das cascas de *Quassia amara*

Para tanto, o modelo empregado foi o de lesões ulcerogênicas induzidas por HCl-etanol em camundongos. Neste ensaio, os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX foram testados, nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, por via oral. Os resultados destes experimentos encontram-se resumidos na figura 19.

**Figura 19:** Índice de lesões ulcerativas induzidas por HCl-etanol em camundongos pré-tratados com os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara* nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg por via oral



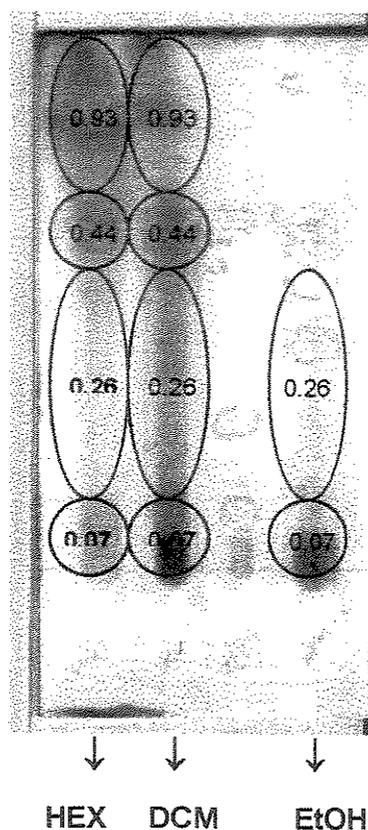
Os valores expressos representam a média  $\pm$  erro padrão do ILU para cada grupo de animais tratados ( $n=7-8$ ). ANOVA:  $F_{(13, 97)} = 4.609$   $p < 0.05$ ; Teste de Dunnett: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ .

O extrato EtOH 70% não inibiu as lesões ulcerativas em nenhuma das doses utilizadas. Já os extratos EtOH, DCM e HEX apresentaram inibição significativa das lesões ulcerativas em todas as doses utilizadas. Além disso, o extrato HEX, na dose de 75 mg/kg, demonstrou redução significativa do ILU de maneira similar ao controle positivo, lansoprazol.

## 4.9- Análises Fitoquímicas dos Extratos de *Quassia amara*

### 4.9.1- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Figura 20: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos Extratos EtOH, DCM e HEX de *Quassia Amara*



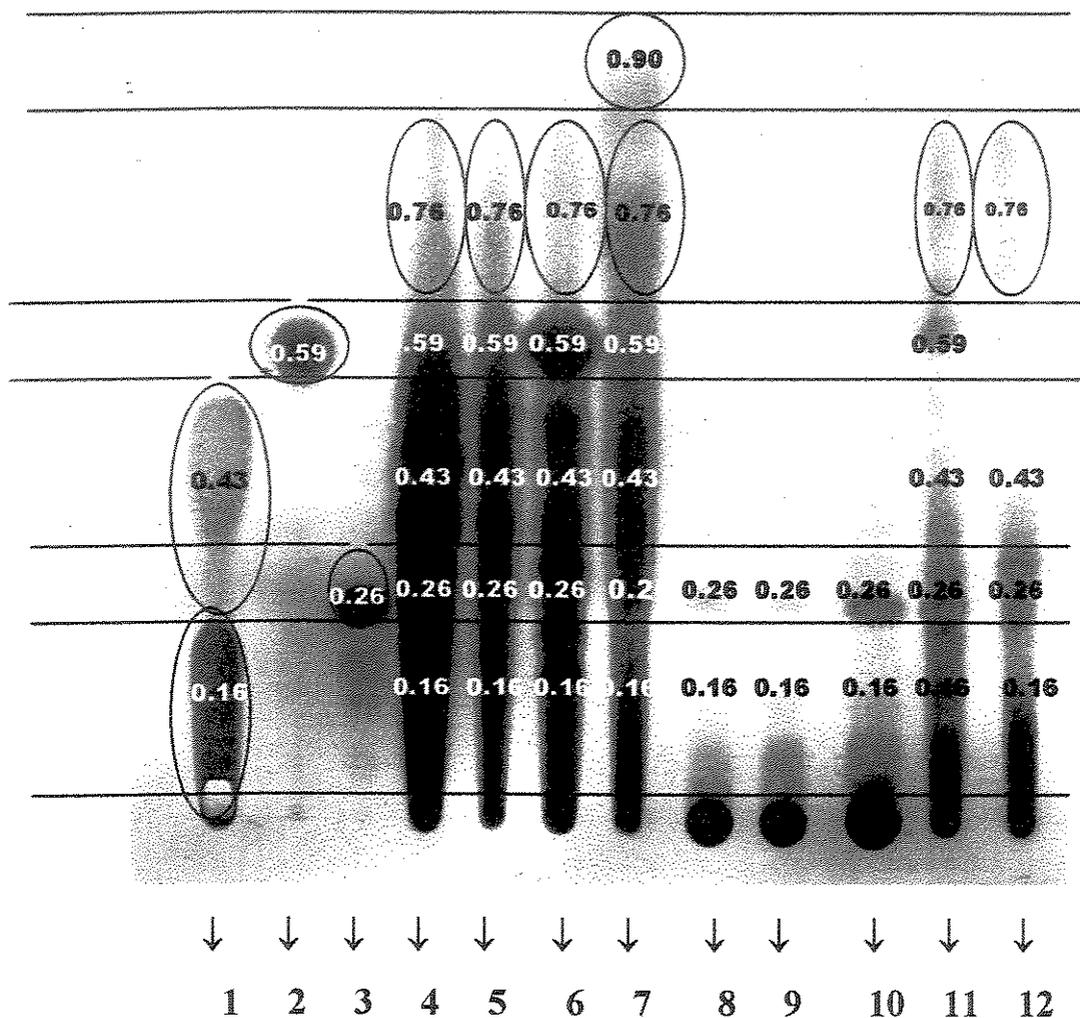
Fase estacionária: sílica gel; eluente: tolueno, acetona, ácido acético (7:3:0.5); revelador iodo

A revelação da placa esquematizada acima mostrou que os extratos HEX e DCM apresentam um grupo de substâncias com valores de  $R_f = 0.44$  e  $0.93$ ; a presença destas substâncias não foi detectada, nas condições empregadas para o extrato EtOH. Similaridades entre

todos os extratos aparecerem para a(s) substância(s) com valores de  $R_f = 0.07$  e  $0.26$ .

A partir destes resultados uma nova cromatografia foi realizada para comparação entre os valores de  $R_f$  obtidos para os extratos em estudo com aqueles de substâncias padrão, cujos  $R_f$  já são amplamente conhecidos. Os resultados encontram-se apresentados na figura 21 e os detalhes da obtenção dos mesmos estão explicitados na legenda.

**Figura 21:** Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos e frações de *Quassia amara* comparativa aos padrões conhecidos



- |                                     |                   |
|-------------------------------------|-------------------|
| 1) CORONARIDINA (Padrão alcalóides) | 7) FRAÇÃO HEX 5/8 |
| 2) SITOSTEROL (Padrão esteróides)   | 8) CHÁ            |
| 3) QUASSINA (Padrão quassina)       | 9) EtOH 70%       |
| 4) FRAÇÃO HEX 56/57                 | 10) EtOH          |
| 5) FRAÇÃO HEX 44/54                 | 11) DCM           |
| 6) FRAÇÃO HEX 30/32                 | 12) HEX           |

Fase estacionária: sílica gel; eluente: tolueno (7): acetona(3): ácido acético (0,5%);  
Revelador: anidrido acético - ácido sulfúrico

A CCD demonstra uma análise dos extratos (EtOH 70%, EtOH, DCM, HEX e algumas frações obtidas a partir do extrato HEX) em comparação com alguns padrões conhecidos (coronaridina, padrão para alcalóides indólicos; sitosterol, padrão para esteróides e quassina, padrão para quassinóides. Para a detecção das substâncias foi realizada a reação de Liebermann-Burchard (anidrido acético-ácido sulfúrico concentrado) que é empregada na detecção de esteróides e triterpenos; os primeiros desenvolvem coloração mutável com o tempo, enquanto que os últimos desenvolvem coloração estável.

Após revelação, os padrões coronaridina, sitosterol e quassina demonstram valores de  $R_f = 0.16$  e  $0.43$ ;  $0.26$  e  $0.59$ , respectivamente. Pode-se observar nos extratos de *Quassia amara* a presença de substâncias com  $R_f$  idêntico ao padrão coronaridina. Estes componentes parecem ser menos abundantes nos extratos mais polares (chá, EtOH 70% e EtOH), quando comparados aos extratos DCM, HEX.

Com relação ao padrão quassina, este também apareceu em todos os extratos e frações avaliados. Mais uma vez a polaridade dos extratos obtidos da planta em estudo parece influenciar na concentração da substância retida.

O padrão sitosterol apresenta  $R_f = 0.59$ . Este apareceu nos extratos DCM e frações HEX, porém está ausente nos extratos polares. Além disso, surge um grupo de substância(s) com  $R_f = 0.76$ , o qual não é comparável a nenhum dos padrões utilizados. Esta substância (ou grupo de substâncias) aparece nos extratos DCM, HEX e suas frações, mas não nos demais extratos avaliados. Já na fração do extrato HEX 5/8 aparece muito fracamente substância(s) com  $R_f = 0.90$ , valor este que não se compara a nenhum dos padrões utilizados.

Dados fitoquímicos complementares foram obtidos com análises químicas das frações do extrato HEX por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de massas (ES/MS) e cromatografia gasosa (HPLC), conforme demonstrado nos resultados abaixo. Deu-se prioridade a este extrato em virtude de sua significativa atividade analgésica.

#### **4.9.2- Análise fitoquímica das frações do extrato HEX de *Quassia amara***

##### **4.9.2.1- Fração 5/8**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração 5/8 (figura 22) mostra picos na região entre  $\delta$  0.68 e  $\delta$  2.29, com o pico mais intenso em  $\delta$  1.25. Esse perfil é compatível com a presença de derivados de ácidos graxos de cadeia longa misturados a terpenos; o quarteto próximo a  $\delta$  4.10 é característico de H presente em carbono oxigenado, como por exemplo, o hidrogênio da posição 3 dos triterpenos e esteróides. Os sinais na região de  $\delta$  5.0 – 5.36 referem-se a hidrogênios de ligações duplas, o que também é comum em derivados de ácidos graxos, triterpenos e esteróides.

Ainda no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração 5/8 do extrato hexânico, um conjunto de sinais é visível na região entre  $\delta$  7.46 e  $\delta$  7.82, caracterizando a presença de substâncias aromáticas. Tendo em vista a presença de alcalóides cantinônicos e indólicos em *Quassia amara* (Barbetti *et al.*, 1987; Barbetti *et al.*, 1990; Njar *et al.*, 1993) é possível que essas substâncias sejam as responsáveis por esse conjunto de sinais.

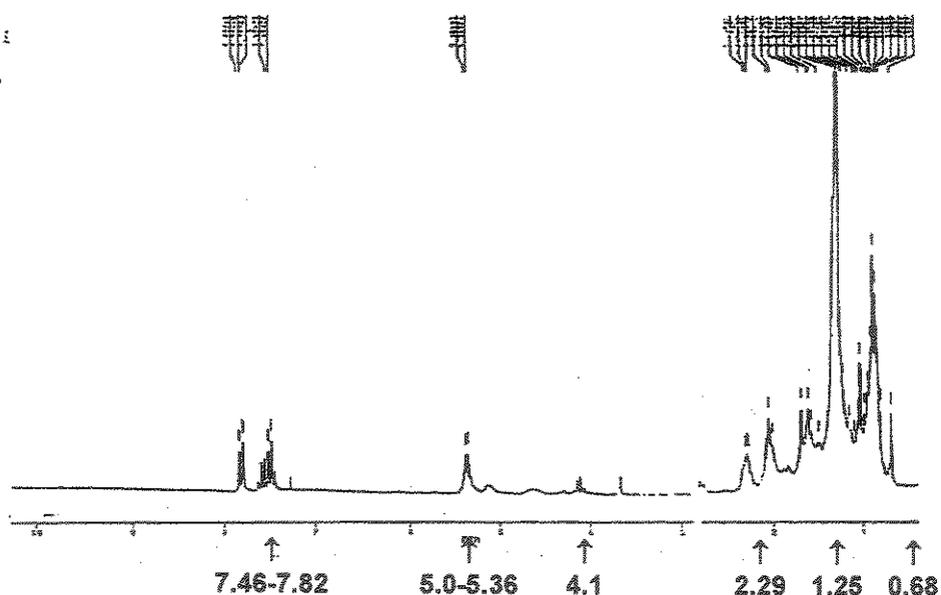


Figura 22: RMN<sup>1</sup>H da fração HEX 5/8 de *Quassia amara*

Foram registrados os espectros de ES-MS nos modos positivo e negativo (figura 23). Não foram observados sinais com  $m/z$  250 ou 259, referentes aos alcalóides cantinônicos já isolados de *Quassia amara* (Njar *et al.*, 1993). Contudo, isso pode ser devido ao fato de não se ter empregado ionização com potência necessária para haver ionização. Por outro lado, observa-se um sinal intenso de  $m/z$  353 no espectro do modo negativo, que pode ser referente a uma série de alcalóides indólicos tal como a coronaridina, demonstrada na CCD. O sinal em  $m/z$  413 no espectro registrado no modo positivo é compatível com a presença do estigmasterol e/ou sitostenona também demonstrados na CCD dos extratos em estudo através do  $R_f = 0.59$ .

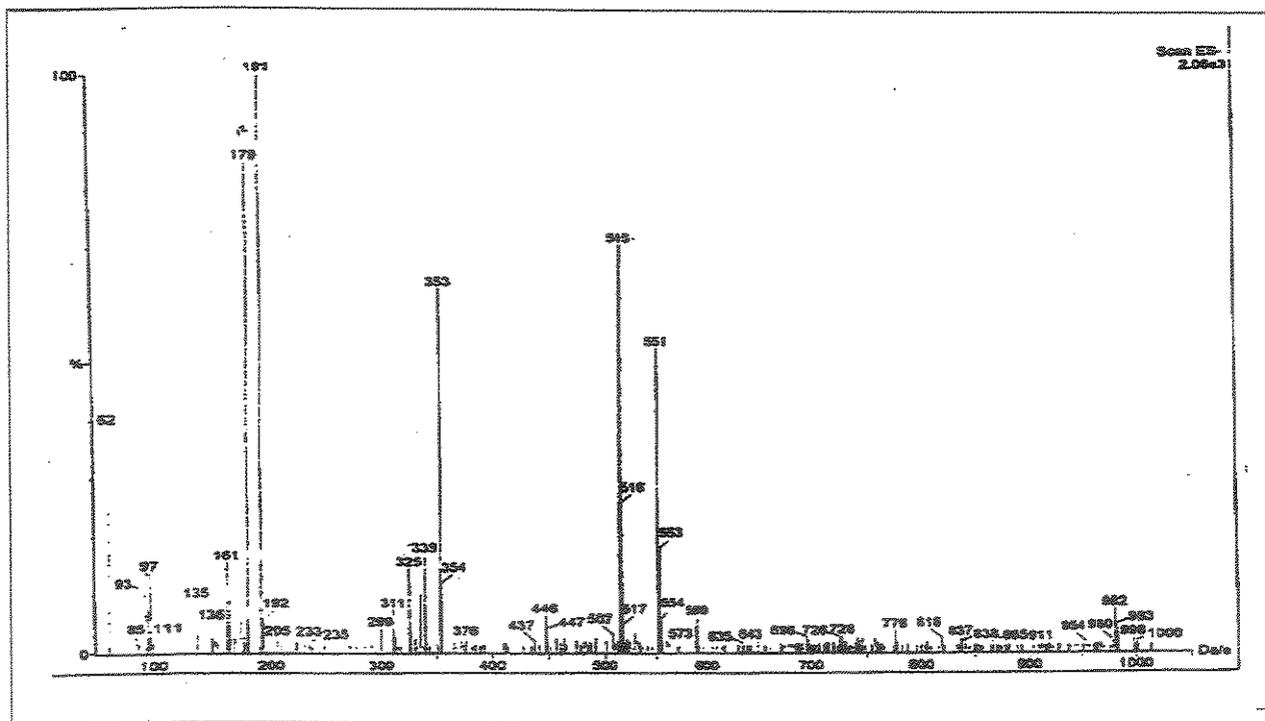


Figura 23: ES/MS da fração HEX 5/8 de *Quassia amara*

#### 4.9.2.2- Fração 30/32

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 24) mostra sinais entre  $\delta$  0.66 e  $\delta$  2.27, característico de triterpenos ou esteróides. Os sinais próximos a  $\delta$  3.7 são referentes ao H-3 desse metabólitos. Os sinais na região entre  $\delta$  5.0 e 5.31 são referentes aos H de ligações duplas, comuns em triterpenos e esteróides. Esses sinais são semelhantes a aqueles do estigmasterol, sendo que o sinal em  $\delta$  5.31 refere-se ao H-6, enquanto que o multipletto em redor de  $\delta$  5.0 refere-se aos H-22 e H-23 do estigmasterol.

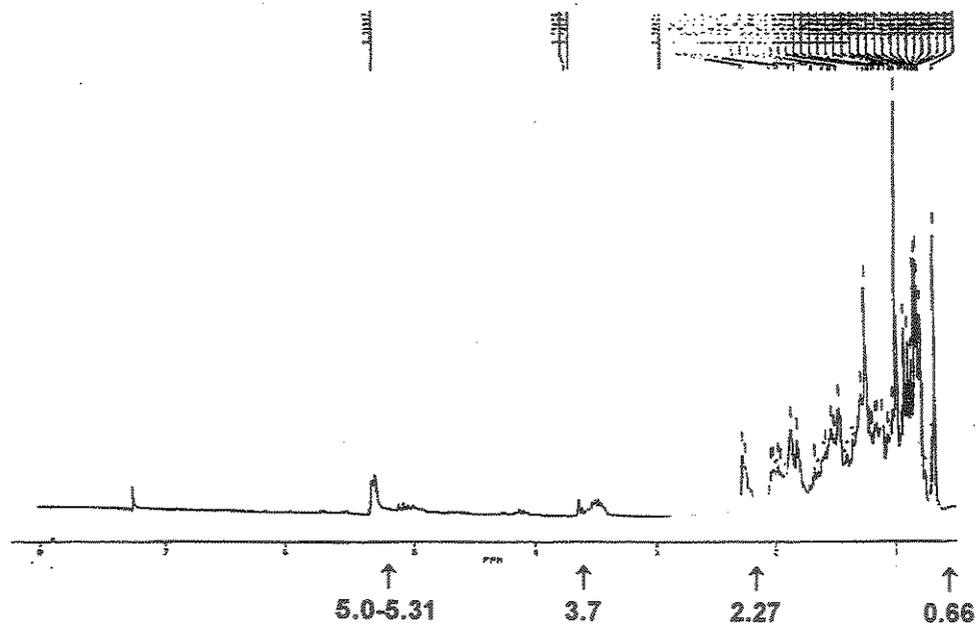


Figura 24: RMN<sup>1</sup>H da fração HEX 30/32 de *Quassia amara*

O espectro ES-MS registrado no modo positivo (figura 25), mostra um pico com  $m/z$  413, que pode ser referente ao íon  $[M-CH_3]^+$ ; a perda de uma metila a partir da molécula não protonada leva ao fragmento  $[M-CH_3]^+$  com  $m/z$  397. Esses conjuntos de sinais dos espectros mencionados acima são compatíveis tanto com o estigmasterol, quanto com a sitostenona, a qual já foi isolada de *Quassia amara* (Lavie & Kaye, 1963).



Figura 25: ES/MS da fração HEX 30/32 de *Quassia amara*

#### 4.9.2.3- Fração 44/54

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 26) mostra um sinal intenso em  $\delta$  1.18, característico de grupos  $\text{CH}_2$  de derivados de ácidos graxos, acompanhado por picos de menor intensidade entre  $\delta$  0.72 e  $\delta$  2.27. Sinais menos intensos na região de  $\delta$  3.5 – 4.2 são coerentes com o H-3 de triterpenos e esteróides, cuja posição 3 é hidroxilada. Os sinais em redor de  $\delta$  5.0 – 5.3 são referentes a H de ligações duplas, semelhantes aos discutidos anteriormente. Assim, é possível que essa fração seja composta por mistura de derivados de ácidos graxos e de terpenos / esteróides.

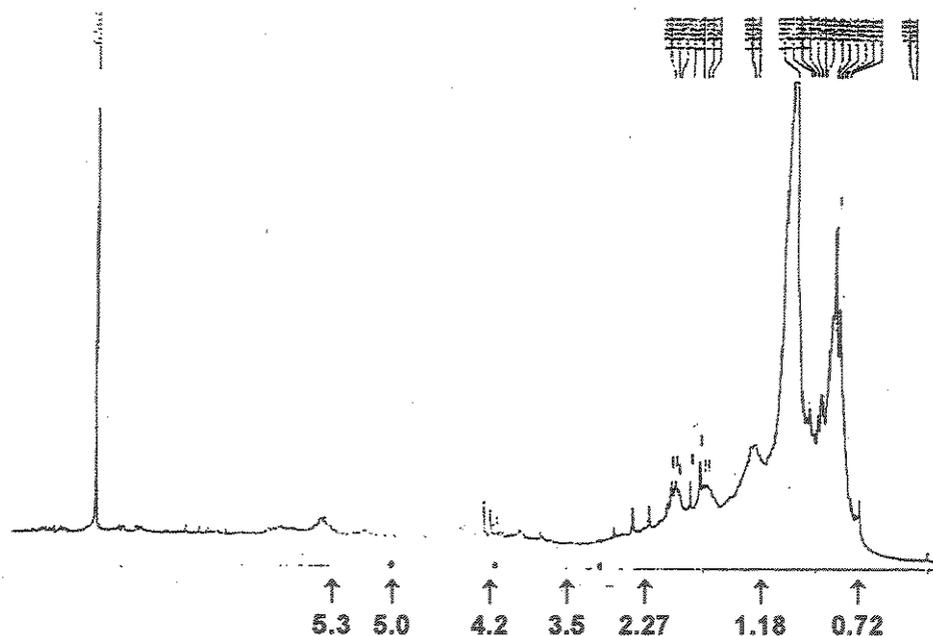


Figura 26: RMN<sup>1</sup>H da fração HEX 44/54 de Quassia amara

O espectro ES-MS no modo positivo (figura 27) também apresenta pico em  $m/z$  411, referente ao pico  $[M-H]^+$  de esteróide semelhante ao estigmasterol ou à sitostenona. Analogamente, o pico em  $m/z$  397 é referente à perda de uma das metilas, gerando o fragmento  $[M-CH_3]^+$ . O pico em  $m/z$  413 pode ser referente ao pico  $[M-H]^+$  de um esteróide semelhante ao sitosterol. Fragmentação do tipo retro-Diels-Alder e subsequente perda de uma metila do sitosterol levaria ao íon  $[M-C_7H_{12}O-CH_3]^+$  de  $m/z$  287.

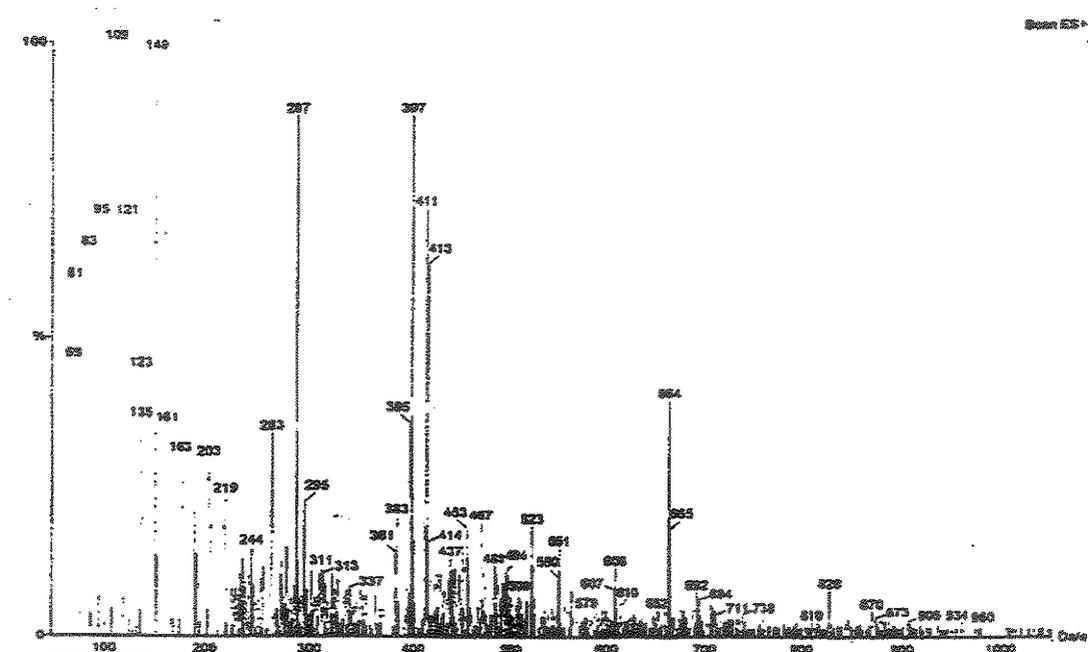


Figura 27: ES/MS da fração HEX 44/54 de *Quassia amara*

#### 4.9.2.4- Fração 56/57

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 28) mostra perfil semelhante a aqueles de derivados de ácidos graxos, ou seja, um sinal intenso em  $\delta$  1.23, sinais distribuídos entre  $\delta$  0.66 e  $\delta$  2.32 e um sinal aparentando um tripleto em  $\delta$  5.34. Não há vestígios de substâncias aromáticas. Pode-se perceber a presença de outras substâncias – provavelmente de natureza terpênica – ao longo de toda a região entre  $\delta$  0.66 e  $\delta$  5.5. Particularmente na região entre  $\delta$  0.66 e  $\delta$  1.09, há evidência de sinais referentes a metilas, cujas intensidades são coerentes com os do H-3 e H situados em ligações duplas, muito menos intensos.

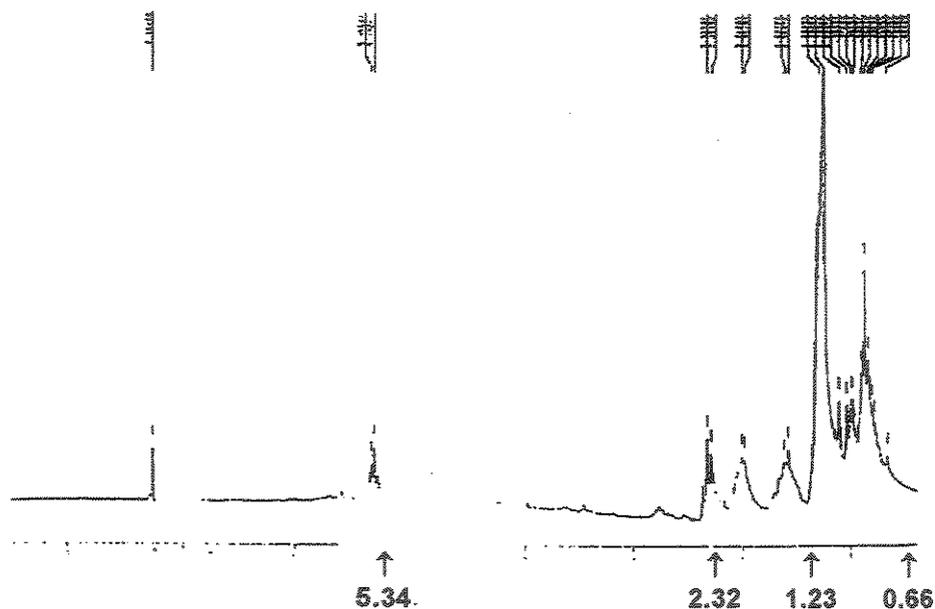


Figura 28: RMN<sup>1</sup>H da fração HEX 56/57 de *Quassia amara*

Os espectros Es-MS (figura 29) nos modos positivo e negativo sugerem um fragmento comum de  $m/z$  468: o espectro no modo positivo mostra  $[M+H]^+$  com  $m/z$  469; no espectro no modo negativo, esse pico tem  $m/z$  467. A perda de uma metila a partir da molécula não-protonada leva ao íon  $[M-CH_3]$  com  $m/z$  453, tanto no modo positivo, quanto no negativo. Esses resultados correlacionam-se com aqueles esperados para moléculas derivadas do acetato de  $\alpha$ -amirina, de  $\beta$ -amirina ou moléculas afins. Contudo, podem ser vistos fragmentos com  $m/z$  maiores do que 468 nos 2 espectros. Particularmente informativo é o espectro no modo negativo, que sugere a presença de outras hidroxilas ligadas ao núcleo fundamental, levando a perdas de moléculas de água; a perda de duas moléculas de água a partir do íon de  $m/z$  521 leva ao fragmento de  $m/z$  485, enquanto que a perda de uma terceira molécula de água leva ao íon de  $m/z$  467.

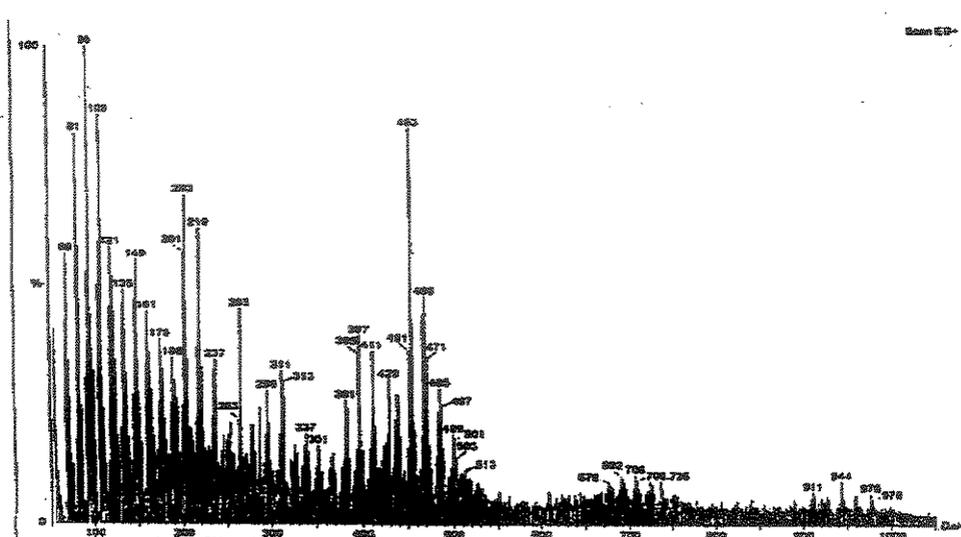


Figura 29: ES/MS da fração HEX 56/57 de *Quassia amara*

#### 4.10- Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato HEX de *Quassia amara*

O cromatograma extraído do íon de  $m/z$  391-389 foi feito com o intuito de se detectar a neoquassina (PM = 391), enquanto que o cromatograma extraído do íon de  $m/z$  389-391 objetiva detectar a quassina (PM = 389). Essas duas substâncias são encontradas em *Quassia amara* (Nestler *et al.*, 1980). Os cromatogramas mostram que ambas estão presentes em todos os extratos obtidos das cascas da planta. Os espectros da neoquassina e o da quassina estão apresentados na figura 30. Ao mesmo tempo, o cromatograma extraído do íon de  $m/z$  413, referente a esteróides do tipo estigmasterol, mostra um pico com tempo de retenção bastante semelhante àquele da quassina e neoquassina. Dessa forma, é possível que os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e mesmo os de ES-MS feitos com as frações estejam encobrindo a presença desses dois quassinóides.

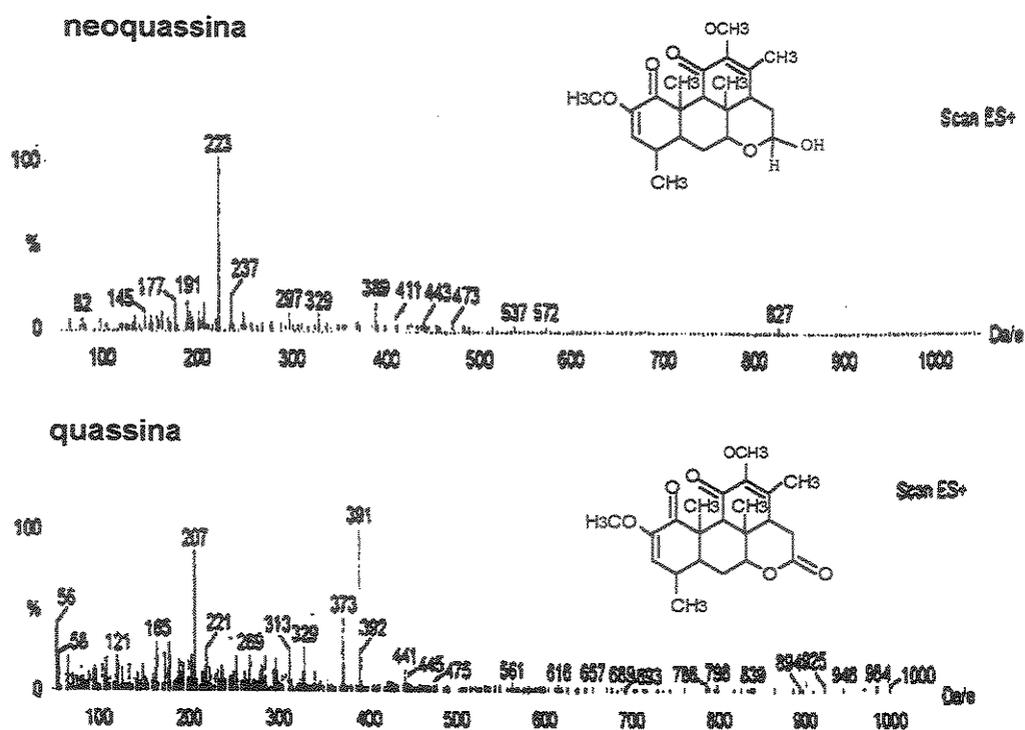


Figura 30: CLAE do extrato HEX de *Quassia amara*

---

*V-DISCUSSÃO*

---

## V- Discussão

As plantas tem sido tradicionalmente empregadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas. O mercado atual de fitofármacos é da ordem de US\$ 9 a 11 bilhões/ano, sendo que mais de 13.000 plantas são usadas como fármacos ou fonte de fármacos (Tyler, 1994). Além disso, algumas patologias como a dor e a úlcera gástrica, ainda não dispõem de tratamentos que conciliem eficácia farmacológica, baixo índice de efeitos colaterais e preços acessíveis à população.

É conhecido que drogas analgésicas e/ou antiinflamatórias descobertas até o momento, apesar de promoverem efeitos farmacológicos satisfatórios, apresentam uma série de efeitos indesejáveis. Com relação à úlcera gástrica, apesar da evolução na terapia clínica, ainda não foi descoberta uma droga capaz de erradicar completamente tal patologia. Além do mais, alguns tratamentos empregados, tais como aquele que utiliza inibidores da bomba protônica, apresentam um elevado custo, tornando-se praticamente impossível o acesso da população de menor renda a este tratamento.

Com base nestes fatos, este trabalho teve como objetivo avaliar a possível atividade analgésica e/ou antiinflamatória e antiulcerogênica de quatro extratos, de diferentes polaridades, obtidos a partir das cascas de *Quassia amara*, bem como procurar conhecer o(s) composto(s) químico(s) responsável(is) por estas atividades; isso forneceria subsídios para a geração de futuras drogas capazes de combater ou ao menos amenizar estes males. Além disso, foi também avaliada uma possível toxicidade dos extratos utilizados, uma vez que a população usa infusos e chás obtidos a partir das cascas da planta em estudo.

Nos experimentos de toxicidade aguda em camundongos, quando administrados os extratos de *Quassia amara* pela via oral na dose de 5 g/kg, não foi observada nenhum sinal de toxicidade dos animais utilizados. Além disso, nenhum dos extratos promoveu a morte dos animais após 14 dias de observação. Quando administrados pela via intraperitoneal na dose de 1 g/kg, O extrato HEX provocou a morte 50% dos animais durante o período de 14 dias. Neste grupo de tratamento, os animais apresentaram-se deprimidos, com dificuldade na coordenação motora, frequência respiratória alterada, diminuição dos reflexos auricular e corneal; além disso, alguns demonstraram-se cianóticos. Os animais que receberam os demais extratos, pela mesma via na dose de 1g/kg, não apresentaram nenhum sinal de toxicidade, bem como nenhuma morte foi evidenciada após os 14 dias de observação.

Os resultados da atividade analgésica dos extratos (EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX) das cascas do tronco de *Quassia amara* L., no teste de placa quente quando administrados pela via oral nas doses de 100 e 250 mg/Kg, não foram significativos. Isto também ocorreu quando estes extratos foram administrados a camundongos submetidos ao edema de pata por carragenina, visando avaliar uma possível atividade antiinflamatória dos extratos; ao contrário do esperado, todos os extratos neste modelo experimental produziram aumento do edema. Porém, quando os extratos foram administrados pela via intraperitoneal, no teste de placa quente, pode-se observar resultados significativos quando comparados ao grupo controle. Neste, dá-se destaque ao extrato HEX, que demonstrou atividade analgésica nas duas doses testadas (100 e 250 mg/kg), tendo sido o efeito dose-dependente. O extrato DCM apresentou atividade apenas na dose de 100 mg/Kg no 90° min de

observação. Os demais extratos não apresentaram atividade significativa em nenhuma das doses avaliadas.

A administração prévia do antagonista opióide naloxana no modelo de placa quente reverteu a atividade analgésica dos extratos DCM e HEX em todas as doses. Este resultado corrobora ainda mais a possibilidade de que o(s) componente(s) dos extratos promovam a atividade analgésica via sistema opióide ou opioidérgico.

Ajaiyeoba e colaboradores (1999), relata a utilização pela medicina tradicional Nigeriana, das cascas de *Quassia amara* para o tratamento de condições febris e, praticamente, não existem relatos sobre a validação deste uso. O mesmo ocorre com a população dos países da América Central (Ocampo Sanches, 1986). Além do mais, a planta está classificada como uma droga narcótica segundo a Food and Drug Administration (FDA) (Germonsén-Robineau, 1998).

As plantas da família das Simaroubáceas, na qual se enquadra a *Quassia amara* L., são fontes de numerosos compostos, dentre os quais incluem-se as substâncias amargas conhecidas como quassinóides (Murae *et al.*, 1979; Ohmoto *et al.*, 1989; Diakanamwa *et al.*, 1993; Grieco *et al.*, 1994), os alcalóides  $\beta$ -carbolínicos e indólicos, e os esteróides tais com o sitosterol e estigmasterol (Wagner & Nestler, 1979; Njar *et al.*, 1993; Ajaiyeoba & Okogun, 1994; Ouyang *et al.*, 1994).

Conforme demonstrado por análises fitoquímicas (CCD, ES-MS, RMN  $^1\text{H}$ ) os quatro extratos obtidos a partir das cascas de *Quassia amara* L. apresentam, em sua composição, várias substâncias orgânicas, principalmente alcalóides indólicos, triterpenos e esteróides.

Considerando-se que a morfina é um alcalóide de origem natural (Christrup, 1997), foi possível supor que os alcalóides indólicos citados

nos estudos fitoquímicos de *Quassia amara* L. poderiam estar promovendo atividade analgésica central, de maneira similar àquela apresentada pela morfina.

Os terpenos, conforme citado anteriormente, também foram encontrados nos extratos de *Quassia amara*. Dentre este grupo de substâncias estão os quassinóides. Duke (1992), relata a utilização deste grupo de substâncias para o tratamento do alcoolismo, pois os quassinóides demonstram propriedades farmacológicas semelhantes àsquelas do dissulfiram, droga amplamente empregada para esta finalidade. Uma das alterações bioquímicas proporcionadas por este medicamento é a redução dos níveis de substância P, um dos mediadores envolvidos na dor. Os quassinóides não seriam as principais substâncias envolvidas na redução do processo doloroso, porém os mesmos podem atuar sinergicamente aos alcalóides indólicos.

Os esteróides sitosterol, estigmasterol e campesterol também podem estar auxiliando na atividade anagésica evidenciada. Diversos trabalhos relatam a atividade analgésica demonstrada pelos fitoesteróides tais como  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol. Peres e colaboradores, 1998 relatam que o efeito analgésico de *C. urucurana* se deve a uma associação de vários fitoconstituintes, incluindo  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, ácido-aleurítico, catequina, galocatequina e glicosídeo do  $\beta$ -sitosterol. É importante ressaltar que nestes exemplos, os compostos isolados, apesar de se encontrarem em concentrações baixas, atuam sinergicamente, provalmente através do mesmo mecanismo de ação ou por mecanismos diferentes. Santos e colaboradores, 1995, demonstram que estes mesmos são capazes de induzir nocicepção significativa em camundongos submetidos a modelos

experimentais de analgesia. Levando-se em conta as altas concentrações destes esteróides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol) nos extratos de *Quassia amara*, principalmente no extrato HEX e frações obtidas a partir destes, e a atividade analgésica significativa principalmente com relação a este extrato, este grupo de substâncias deve estar auxiliando na atividade analgésica evidenciada.

Outro fator importante a ser lembrado é que a atividade analgésica tendeu a ser mais significativa nos extratos de menor polaridade (extrato DCM e, principalmente, HEX). A CCD dos extratos exibiu diferenças quanto à composição química de cada tipo de extrato, principalmente nos extratos DCM e HEX. É possível então supor que a(s) substância(s) ativa(s) possuam maior afinidade pelos solventes mais apolares.

Fato estranho foi a ausência de atividade biológica quando os extratos foram administrados por via oral em ambas as doses testadas, considerando-se que a medicina tradicional utiliza chás ou infusões por via oral. No entanto, os parâmetros farmacocinéticos tais como absorção e metabolismo dos agentes são diferentes em humanos e roedores (Alexandre-Moreira *et al.*, 1999). Além disso, na medicina tradicional os chás ou infusões da planta não são normalmente utilizados em dose única, mas ao contrário, os tratamentos às vezes levam semanas ou meses.

Um outro dado importante é que, após a administração oral, a morfina é absorvida quase que completamente no trato gastrointestinal; seu efeito, neste caso, é muito menor em relação à administração parenteral, devido ao metabolismo de primeira passagem no fígado que torna sua biodisponibilidade baixa e variável (entre 19 a 47%). Cerca de 90% da morfina administrada por via oral é convertida em metabólitos,

principalmente morfina 3 glicuronídeo (45-55%) e morfina 6 glucuronídeo (10-15%), sendo este último um metabólito ativo que possui afinidade com receptores  $\mu$  e aparece em concentrações elevadas no plasma (Christrup, 1997). Na administração crônica de morfina por via oral o metabólito morfina 6 glicuronídeo responde por um percentual significativo dos efeitos analgésicos da morfina; é provável que esse metabólito ativo ainda apresente alguma atividade analgésica (Reisine & Pasternak, 1996).

Todos estes fatores podem explicar a ausência da atividade analgésica dos extratos de *Quassia amara*; quando os mesmos foram administrados por via oral; do mesmo modo, explicaria ainda a atividade analgésica apresentada quando os mesmos foram administrados pela via intraperitoneal.

Muito provavelmente o(s) componente(s) químico(s) ativos não apresenta(m) uma absorção adequada. Pode-se sugerir também que o meio ácido estomacal degrade este(s) componente(s). Além disso, esta(s) substância(s) presente(s) nos extratos, após administração por via oral, pode(m) não produzir metabólitos ativos com capacidade de repetir ou acentuar a atividade analgésica dos compostos originais, como acontece com o metabólito da morfina, morfina-6-glicuronato.

Diversos são os modelos de experimentação animal utilizados para a avaliação de substâncias com potencial atividade antiulcerogênica. Muitos deles mimetizam as principais causas da patologia no homem.

As lesões gástricas induzidas por etanol devem-se à ação necrotizante direta sobre a mucosa gástrica; a presença de HCl acelera este processo (Mizui & Doteuchi, 1983; Sun *et al.*, 1991). O etanol promove ainda a liberação de radicais livres (Halliwell, 1991) e estimula a

formação de leucotrienos  $C_4$  ( $LTC_4$ ), um derivado do ácido aracdônico (Hua *et al.*, 1985). Todos estes fatores associados promovem uma redução no fluxo sanguíneo gástrico o qual contribui para o desenvolvimento de hemorragia e aspectos necróticos da injúria do tecido (Guth *et al.*, 1984).

No modelo de úlcera induzida pela administração de HCl-etanol, os extratos EtOH, DCM e HEX demonstraram inibição significativa do índice de lesões ulcerativas quando comparados em relação ao controle. Já o extrato EtOH 70% não apresentou efetividade no modelo experimental utilizado.

É conhecido que úlceras induzidas por etanol são inibidas principalmente por agentes que aumentam os fatores defensivos da mucosa, tal como as prostaglandinas (Robert *et al.*, 1979). O muco, presente na parede gástrica, também possui um papel importante na citoproteção gástrica contra o etanol. Dentre os componentes do muco estão as chamadas proteínas sulfidrílicas. Estudos recentes mostram que os compostos sulfidrílicos tem um importante papel na formação do muco gastrointestinal (Guardia *et al.*, 1994). Estas proteínas sulfidrílicas tem a capacidade de se ligar aos radicais livres presentes na mucosa gástrica evitando com isso a injúria do tecido. Sabe-se que a ingestão de etanol reduz os níveis de proteínas sulfidrílicas da mucosa gástrica (Szabo, 1981) induzindo a solubilização dos constituintes do muco no estômago e conseqüentemente tornando a mucosa mais susceptível aos agentes agressores. O etanol também diminui a diferença de potencial na transmucosa, aumentando o fluxo de  $Na^+$  e  $K^+$  para o interior do lúmen, a secreção de pepsina, a perda dos íons  $H^+$  e o conteúdo de histamina no lúmen (Guth *et al.*, 1984; Szabo, 1987).

Diversos estudos fitoquímicos relatam nos extratos de *Quassia amara*, a presença dos princípios amargos quassinóides que são sesquiterpenos sintetizados pelos membros da família Simaroubaceae (Robins *et al.*, 1984). Como relatado nos ensaios fitoquímicos, tal grupo de substâncias também encontra-se presente nos extratos utilizados no presente estudo. Vários compostos fazem parte do grupo dos quassinóides e dentre os de maior importância está a quassina. Lewis e Hanson (1991), relatam uma grande correlação entre o grupo dos terpenos e a atividade antiulcerogênica. Alguns autores também relatam que substâncias antioxidantes, tais como o alfa-tocoferol, podem reduzir a quantidade de radicais livres formados na mucosa gástrica e também estimular a síntese de prostaglandinas, reduzindo, com isso, as lesões gástricas induzidas pelos agentes agressivos (Lloris *et al.*, 1991).

A lista de atividades farmacológicas tais como antimalárica, antineoplásica, antiviral, amebicida, inseticida e também antioxidante, está associada aos princípios amargos quassinóides, presentes nos extratos de *Quassia amara* (Kitagawa *et al.*, 1994; Moretti *et al.*, 1994). Muito provavelmente tais quassinóides, presentes nos extratos de *Quassia amara*, estejam promovendo a atividade antioxidante mediante interação com os radicais livres formados na mucosa gástrica, reduzindo a degradação dos compostos sulfidrílicos, mantendo estável a estrutura do muco gástrico e, conseqüentemente, reduzindo a capacidade de agressão do agente lesivo (HCl-etanol) à mucosa gástrica. Além disso, tal grupo de substância pode também estar promovendo a síntese de PG's conforme relatado por Lloris e colaboradores, 1991.

As drogas antiinflamatórias não esteroidais (Dainés), tais como a indometacina e aspirina, tem como um dos principais efeitos colaterais a

indução da ulceração gástrica, através da inibição não seletiva da cicloxigenase com conseqüente inibição da síntese de prostaglandinas endógenas. A técnica de úlceras induzidas por Daines em camundongos envolve ainda a co-administração de betanecol, um agente parassimpatomimético, o qual é responsável por induzir um aumento na produção de ácido e pepsina e conseqüentemente promovendo um sinergismo da lesão gástrica induzida pela indometacina (Rainsford, 1978).

Quando avaliados os resultados obtidos no modelo de úlcera induzida por indometacina-betanecol, pode-se observar uma atividade significativa dos extratos DCM e HEX. Novamente, o extrato mais polar, EtOH 70%, não apresentou significância na inibição das lesões, ocorrendo o mesmo com o extrato EtOH.

Desde que antioxidantes, tal como o  $\alpha$ -tocoferol, promovem a síntese de PG's, os quassinóides que também apresentam atividade antioxidante, poderiam explicar a atividade protetora dos extratos de *Quassia amara* no modelo experimental utilizado.

Além do mais, a inibição de cicloxigenase pelas Daines, tal como indometacina, resulta na superprodução de leucotrienos e outros produtos da 5-lipoxigenase (Rainsford, 1987). A inibição da síntese de leucotrienos é acompanhada por uma diminuição nos danos à mucosa gástrica (Osada *et al.*, 1990). É possível que a inibição da 5-lipoxigenase e/ou antagonismo ao LTC<sub>4</sub> também estejam envolvidos na atividade antiulcerogênica exibida pelos extratos DCM e HEX de *Quassia amara* no modelo de úlceras induzidas por indometacina-betanecol.

Úlceras induzidas por estresse são provavelmente mediadas pela liberação de histamina com conseqüente aumento na secreção ácida

gástrica (Kitagawa *et al.*, 1979) e redução na produção de muco (Koo *et al.*, 1986). Distúrbios na microcirculação da mucosa e alterações levando à motilidade anormal (Guth, 1972) tem também sido considerados mecanismos patogênicos responsáveis para a formação das lesões gástricas induzidas por estresse. No entanto, o fator mais importante na gênese da úlcera por estresse é a atividade vagal que aumenta a secreção ácida-gástrica e é frequentemente denominado “fator agressivo” (Goa & Monk, 1987).

Na úlcera gástrica induzida por contenção e frio (estresse) os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX de *Quassia amara* apresentaram inibições de 71%, 80%, 60% e 83%, resultados estes superiores ao obtido para o controle positivo cimetidina (57,3%). Assim, uma atividade antissecreatória poderia estar envolvida com o mecanismo pelo qual as amostras inibiram o aparecimento de lesões induzidas pelo estresse. Muito provavelmente a(s) substância(s), talvez os quassinóides, demonstrem algum tipo de antagonismo aos receptores histaminérgicos e ou muscarínicos, promovendo com isso a redução da secreção ácida-gástrica e conseqüentemente do índice de lesões ulcerativas.

O modelo de ligadura do piloro promove alterações no perfil fisiológico da liberação de alguns mediadores da secreção gástrica como a acetilcolina, gastrina e pepsina, os quais, por sua vez, induzem a formação de lesões ulcerativas pelo estímulo da secreção do ácido clorídrico, que fica acumulado no lúmen do estômago (Shay *et al.*, 1945; Lewis & Hanson, 1991)

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos à ligadura do piloro tratados intraduodenalmente com os quatro extratos de *Quassia amara* (100 mg/kg) e com os controles

(veículo e cimetidina), EtOH, DCM e HEX, bem como o controle positivo, demonstraram redução significativa do volume da secreção ácida gástrica, aumento do pH e conseqüente redução da concentração de íons hidrogênio. O extrato de maior polaridade, EtOH 70%, não produziu nenhuma alteração significativa dos parâmetros bioquímicos avaliados em relação aos grupos controle.

A inibição da secreção ácida tem sido considerado como o mais importante fator para a cicatrização das úlceras gástricas. De acordo com observações prévias feitas por Okabe *et al.* (1977), os antagonistas de receptores histaminérgicos H<sub>2</sub> e muscarínicos M<sub>3</sub>, diminuem o volume gástrico e a acidez total no estômago. Efeitos semelhantes foram observados para os extratos EtOH, DCM e HEX.

Duke (1992), relata que a quassina, um dos princípios amargos de *Quassia amara*, tem sido empregada nos tratamentos de alcoolismo, com propriedades farmacológicas semelhantes ao dissulfiram. Este tem sido usado clinicamente no tratamento de recuperação de alcoólatras há pelo menos 50 anos exercendo efeito farmacológico pela inibição da aldeído desidrogenase (ALDH), uma enzima hepática envolvida no metabolismo funcional. McNichol e colaboradores (1995), relatam que há pelo menos 3 diferentes formas de ALDH também presentes no estômago de humanos. Evidências experimentais indicam que algumas drogas tal como a cimetidina, um antagonista de receptores histaminérgicos H<sub>2</sub>, geralmente inibem a atividade da ALDH gástrica *in vitro*. Considerando a relação farmacológica existente entre o dissulfiram e a cimetidina, e levando-se em conta que a quassina, um dos princípios amargos de *Quassia amara* atue farmacologicamente de maneira similar

ao dissulfiram, pode-se sugerir uma relação entre a quassina e o antagonista H<sub>2</sub> cimetidina.

Estes resultados, aliados a aqueles obtidos no modelo de contenção e frio (estresse) indicam uma possível participação dos extratos da planta em estudo antagonizando receptores histaminérgicos e/ou muscarínicos.

Aston e colaboradores (1991), relatam que em idade fértil, a prevalência de úlcera gástrica é maior em homens do que em mulheres; hormônios sexuais, tal como a testosterona, devem possuir importante papel na formação das lesões gástricas. Diversos experimentos relatam que a testosterona, quando administrada exógenamente, agrava a úlcera gastroduodenal induzida por administração de cisteamina; estes dados demonstram que o referido hormônio exerce um papel modulatório no prejuízo causado à mucosa gastroduodenal e confirmam os dados epidemiológicos de maior incidência da patologia em indivíduos do sexo masculino (Aston *et al.*, 1991).

Estudos recentes revelam que a elevação dos níveis de progesterona endógena e a administração de progesterona exógena, aumentam a camada de muco no estômago e no duodeno, protegendo-as da ulceração induzida pela cisteamina (Montoneri & Drago, 1997).

Adeniyi (1991) também observou que em ratos orquidectemizados e, portanto, com a síntese de testosterona inibida, há uma redução da secreção ácida gástrica em relação aos ratos com função testicular intacta. Uma vez que o aumento da secreção ácida-gástrica é um fator importante no desenvolvimento da úlcera gástrica (Szabo *et al.*, 1976; Bernardini *et al.*, 1989), sua redução em animais orquidectemizados explicaria a proteção gastroduodenal na úlcera induzida por cisteamina.

Além disso, já existem relatos, de que a testosterona exógena tem a capacidade de aumentar o número de receptores à vasopressina endógena, um agressor importante da mucosa gastrointestinal (Lászlo *et al.*, 1994, 1997), enquanto que a orquidectomia reduz estes receptores, bem como os níveis de vasopressina no plasma (Pávo *et al.*, 1995).

Raji & Bolarinwa (1997), após isolarem quassina a partir das cascas de *Quassia amara*, relataram sua capacidade de causar infertilidade em ratos, em virtude da acentuada redução dos níveis de testosterona no plasma dos animais tratados. Este é, portanto, um forte indício da participação dos quassinóides, em particular a quassina, na atividade antiulcerogênica, promovendo o aumento da camada de muco gástrico, bem como promovendo o fluxo sanguíneo local, fornecendo oxigênio e nutrientes às células da mucosa gástrica. Sabe-se, que a redução no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica é um dos fatores da patogênese da úlcera gástrica (Bernardini *et al.*, 1989).

Visando avaliar se os efeitos antiulcerogênicos exibidos pelos extratos de *Quassia amara* eram dose-dependentes, foi realizado novamente a indução de úlcera gástrica pela administração de HCl-etanol utilizando os extratos EtOH 70%, EtOH, DCM e HEX pela mesma via de todos os experimentos ulcerogênicos, nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg. Observou-se que, mais uma vez, o extrato EtOH 70% não demonstrou atividade significativa na inibição das lesões ulcerogênicas; apesar disso, uma redução no ILU à medida em que se aumenta a dose administrada, torna-se evidente. O extrato de menor polaridade (HEX) demonstra redução estatisticamente significativa no ILU de maneira dose-dependente. Já os extratos de polaridade intermediária (EtOH e

DCM), apesar da atividade sobre o ILU ser estatisticamente significativa, não existe dose-dependência nesta atividade.

Conforme relatado em cada um dos modelos experimentais, a atividade antiulcerogênica dos extratos de *Quassia amara* ocorre, tanto devido aos mecanismos de citoproteção, bem como devido à atividade antissecretória. A(s) substância(s) responsável(is) por estas atividades parecem ser melhor extraídas nos solventes de maior (EtOH 70%) e de menor polaridade (HEX), em virtude justamente de suas repostas serem dose-dependentes. Solventes de polaridade intermediária devem arrastar outros compostos que “atrapalham” (antagonizam) a atividade farmacológica antiulcerogênica nos extratos de *Quassia amara*. Isso, em associação à questão da dose utilizada, provavelmente explica a efetividade do chá utilizado pela população. As doses dos extratos utilizadas nos procedimentos experimentais (25, 50, 75 e 100 mg/Kg) também são elementos altamente satisfatórios, uma vez que as mesmas encontram-se entre as doses de medicamentos atualmente mais prescritos para o tratamento da úlcera gástrica (lansoprazol 30 mg/kg e cimetidina 100 mg/kg).

Contudo, o(s) princípio(s) responsável(is) pelas atividades analgésica e antiulcerogênica não são os mesmos. Ao que tudo indica, os alcalóides presentes nos extratos são os componentes majoritários envolvidos na redução do processo doloroso, tendo ainda um possível sinergismo com outros componentes tais como quassinóides e esteróides. Já em relação à atividade antiulcerogênica, os resultados demonstram inibição do ILU envolvendo provavelmente os dois mecanismos básicos: citoproteção e inibição da secreção ácida-gástrica.

Conforme foi demonstrado nas análises fitoquímicas, a variedade de compostos químicos presentes nestes extratos certamente justificam, tanto as atividades farmacológicas detectadas, quanto aquelas referidas popularmente, mas que não foram ainda investigadas.

---

## VI- CONCLUSÕES

---

## VI- Conclusões

Os experimentos realizados confirmaram as indicações populares de atividades analgésica e antiulcerogênica das cascas de *Quassia amara*. A avaliação da toxicidade aguda demonstra a ausência de efeitos tóxicos dos quatro extratos utilizados quando administrados oralmente em uma dose única de 5 g/kg. No entanto, o extrato apolar HEX, quando administrado por via intraperitoneal na dose de 1 g/kg, apresenta diversos efeitos tóxicos, bem como produz morte de 50% dos animais utilizados.

A atividade analgésica exibida principalmente pelo extrato HEX deve estar relacionada ao sistema opióide ou opioidérgico, uma vez que tais efeitos são revertidos pela administração prévia do antagonista opióide naloxana. Além disso, o fato de que estes resultados só são observados quando o extrato HEX é administrado por via intraperitoneal, fornece mais as evidências de uma atividade farmacológica do(s) componente(s) de modo similar à morfina.

A atividade antiulcerogênica também foi confirmada e os extratos exibem ambas propriedades: citoprotetora e inibidora da secreção ácida-gástrica. A grande quantidade de compostos presentes nos extratos de *Quassia amara* provavelmente explica os dois tipos existentes de mecanismos de defesa da mucosa gástrica.

Finalmente, os ensaios fitoquímicos confirmam a presença das substâncias, isoladas anteriormente, nos extratos de diferentes polaridade obtidos a partir das cascas de *Quassia amara*, destacando-se alcalóides indólicos, esteróides e quassinóides; estes últimos, talvez os principais responsáveis pelas atividades farmacológicas evidenciadas.

---

## *VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

## VII- Referências Bibliográficas

- Adeniyi, K.O. (1991). Gastric acid secretion and parietal cell mass: Effect of sex hormones. *Gastroenterol.*, 101: 66-69.
- Ajaiyeoba, E.O.; Okogun, J.I. (1994). Synthesis of Crenatine, a  $\beta$  carbonile alkaloid isolated from *Quassia undulata*. *Nigerian J. Nat. Sci.*, 7: 15-18.
- Ajaiyeoba, E.O.; Abalogu, U.I.; Krebs, H.C.; Oduola, A.M.J. (1999). In vivo antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 67: 321-325.
- Alexandre-Moreira, M.S.; Piuvezam, M.R.; Araújo, C.C.; Thomas, G. (1999). Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L.. *J. Ethnopharmacol.*, 67: 171-177.
- Alper, J. (1993). Ulcers as an infectious disease. *Science*, 260 (9): 159-160.
- Aston, N.O.; Kalaichadran, S.; Carr, J.V. (1991). Duodenal ulcer hemorrhage in the puerperium. *Can. J. Surg.*, 34: 482-483.
- Baldi, F.; Ferrarini, F.; Cassan, M. (1983). Effect of pirenzepine on colonic motility in man. *Curr. Ther. Res.*, 33: 802-806.
- Barbetti, P.; Grandolini, G.; Fardella, G.; Chiappini, I. (1987). Indole Alkaloids from *Quassia amara*. *Planta Medica*, 53(3): 289-290.
- Barbetti, P.; Grandolini, G.; Fardella, G.; Chiappini, I.; Mastalia A. (1990). New canthin-6-one alkaloids from *Quassia amara*. *Phytochem.*, 26(11): 216-217.

- Barbetti, P.; Grandolini, G.; Fardella, G.; Chappini, I. (1993). Quassinoids from *Quassia amara*. *Phytochem.*, 32(4): 1007-1013.
- Barrowman, J.A.; Pfeiffer, C.J. (1982). Carbenoxolone: a critical analysis of its clinical value in peptic ulcer. In: *Drugs and Peptic Ulcer*, Vol 1. Ed. By C.J. Pfeiffer. CRC Press, Boca Raton, pp. 123-132.
- Bernardini, M.C.; Blandizzi, C.; Morini, G.; Chiavarini, M.; Impicciatore, M.; Del Tacca, M. (1989). Pirenzepine prevents cysteamine-induced formation of gastroduodenal ulcers and reduction of mesenteric circulation. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 302: 242-254.
- Berne, R.M.; Levy, M.N. (1991). Sistema Gastrointestinal. In: *Princípios de Fisiologia*. Ed. Guanabara Koogan, R.J.p. 308-360.
- Black, J.W.; Duncan, W.A.M.; Durant, C.J.; Ganelli, C.R.; Parsons, E.M. (1972). Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. *Nature*, 236: 385-390.
- Brogden, R.N.; Carmine, A.A.; Heel, R.C. (1982). Domperidone: a review of its pharmacological activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the symptomatic treatment of chronic dyspepsia and as an antiemetic. *Drugs*, 24: 36-40.
- Brunton, L.L. (1996). Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamento de úlceras pépticas. In: Goodman & Gilman's *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9<sup>a</sup> ed.; Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. and Gilman, A.G. eds. McGraw Hill. p.663-674.
- Cáceres, A. (1996). Plantas de uso medicinal en Guatemala. 1<sup>a</sup> ed., Ed. Universitaria. Universidade de San Carlos de Guatemala, pp. 145-147.

- Campbell, J.N.; Raja, S.N.; Cohen, R.H.; Manning, D.C.; Khan, A.A.; Meyer, R.A. (1989). Peripheral neural mechanisms of nociception. In: *Textbook of Pain* (Eds. P.D. Wall & R. Melzack), Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 22-45.
- Casinovi, C.; Ceccherelli, P.; Grandolini, G. (1966). 18-hydroxyquassine, a new amaroid from *Quassia amara*. *Ann. Ist. Super Sanita*, 2: 414.
- Caspary, W.F. (1982). Measurement of intragastric potential difference. In: *Antiacids in the eighties*. Ed. By F. Halter, Urban and Schwarzenberg, Munich, p. 64-69.
- Christrup, L.L. (1997). Morphine metabolites. *Acta anaesthesiol. Scan.*, 41: 116-122.
- Clark, E. (1937). Quassin. I. The preparation and purification of quassin and neoquassin, with information concerning their molecular formula. *J. Amer. Chem. Soc.*, 59: 927.
- Clark, E. (1942). Quassin. IV. A minor constituent of Jamaica quassia wood. *J. Amer. Chem. Soc.*, 64: 2883.
- Curtis, G. H.; Macnaughton, W. K; Gall, D. G.; Wallace, J.L. (1995) Intraluminal pH modulates gastrics prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73: 130-134.
- Di Stasi, L.C. (1996). *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência*. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP. 230 p.
- Dias, B.F.S.(1996). A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas: André Tosello, 10 p.

- Dickenson, A.H. (1991). Mechanisms of the analgesic actions opiates and opioids. *Br. Med. Bull.*, 47 (3): 690-702.
- Diakanamwa, C.; Diallo, R.; Vanhaeleen-Fastre, R.; Vanhaeleen, M.; Ottinger, R. (1993). 14-Hydroxy chapparinone, a new quassinoid from *Hannoa chlorantha*. *J. Nat. Prod.*, 56: 1817-1820.
- Dockray, G.J.; Varro, A.; Dimaline, R. (1996). Gastric endocrine cells: gene expression, processing and targeting of active products. *Physiol. Reviews*, 76 (3): 767-798.
- Duax, W.L.; Griffin, J.F.; Weeks, C.M.; Wawrzak, Z. (1988). The mechanism of action of steroids antagonists: insights from crystallographic studies. *J. Steroid Biochem.*, 31: 481-492.
- Duke, J., 1992. Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants. Boca Raton, Florida: CRS Press, 654 p..
- Eberhart, C.E.; Dubois, R.N. (1995). Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterol.*, 109: 285-301.
- Eddy, N.B.; Leimback, D. (1953). Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 107: 385-393.
- Elisabetsky, E. (1999). Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.O.M.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed.UFRGS, cap 6, p. 87-99.
- Foster, R.W.; Ramage, A.G. (1981). The action of some chemical irritants on somatosensory receptors of the cat. *Neuropharmacol.*, 20: 191-198.

- Garcia, E.S.; Silva, A.C.P.; Gilbert, B.; Corrêa, C.B.V.; Cavalheiro, M.V.S.; Santos, R.R.; Tomasini, T. *Fitoterápicos. Campinas: André Tosello*, (1996), cap. 1, p. 11-24.
- Germonsén-Robineau, L. (1998). Investigación científica y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. *Farmacopea Caribeña*. Ed. Enda-Caribe, Tramil-9, p. 1-9.
- Goa, K.L.; Monk, J.P.(1987). Enprostil: a preliminary review of its pharmacodynamics and pharmacokinetics properties and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. *Drugs*, 3: 539-559.
- Grandolini, G.; Casinovi, C.; Barbetti, P.; Fardella, G. (1987). A new neoquassin derivative from *Quassia amara*. *Phytochem.*, 26(11): 3085-3087.
- Grieco, P.A.; Moher, E.D.; Seya, M.; Huffman, J.C.; Grieco, H.J. (1994). A quassinoid (Peninsularinone) and a steroid from *Castela peninsularis*. *Phytochem.*, 37 (5): 1451-1454.
- Guardia T.; Guzman, J.A.; Pestchanker, M.J.; Gueerreiro, E.; Giordano, O.S. (1994). Mucus synthesis and sulfhydryl groups in cytoprotection mediated by dehydroleucodine, a sesquiterpene lactona. *J. Nat. Prod.*, 57: 507-509.
- Guth, P.H., (1972). Gastric blood flow in restrain stress. *Dig. Dis.*, 17: 807-813.
- Guth P.H.; Paulsen G.; Nagata H. (1984). Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. *Gastroenterol.*, 87: 1083-1090.
- Guyton, A.C. (1993). Regulação da Função Gastrointestinal, da Ingestão de Alimentos, da Micção e da Temperatura Corporal. In:

*Neurociência Básica. Anatomia e Fisiologia.* 2ª ed. Ed. Guanabara Koogan, R.J. p. 310-324.

Halliwell, B. (1991). Introduction to free radicals in human disease. *Saudi Med. J.* 12: 13-19.

Henriques, M.G.M.O.; Silva, P.M.R.; Martins, M.A.; Flores, C.A.; Cunha, F.Q.; Assreyu-Filho, J.; Cordeiro, R.S.B. (1987). PAF-induced oedema in mice. *Braz. J. of Med. Biol. Res.*, 20: 243-249.

Hirschowitz, B.I.; Keeling, D.; Lewin, M.; Okabe, S.; Parsons, M.; Sewing, K.; Wallmark, B.; Sachs, E. (1995). Pharmacological aspects of acid secretion. *Dig. Dis. Sci.*, 40: 2 (Suppl): 3S-23S.

Hua, X.Y.; Dahlen, S.E.; Lundberg, J.M.; Hammerstrom, S.; Hedqvist, P. (1985). Leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>, cause widespread and extensive plasma extravasation in the guineapig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.*, 330: 136-142.

Jessel, T.M.; Kelly, D.D. (1991). Pain and Analgesia. In: *Principles of Neural Science* – 3<sup>rd</sup> ed., Kandell, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M.; eds, Elsevier, p. 385-399.

Johnson, R.L. (1997). *Gastrointestinal Physiology.* 5ª ed.. Ed. Mosby. St Louis, Missouri. 188 p..

Katsura, Y.; Nishino, S.; Takasugi, H. (1991). Studies on antiulcer drugs. Synthesis and antiulcer activities of imidazo [1,2-*alpyridinyl*-2-oxobenzoxazolidines-3-oxo-2H-1,4-benzoxazines] and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, 39 (11): 2937-2943.

Kitagawa, H.; Fujiwara M.; Osumi Y. (1979). Effect of water immersion stress on gastric secretion and mucosal blood flow in rats. *Gastroenterol.*, 77: 298-302.

- Kitagawa, I.; Mahmud, T.; Simanjuntak, P.; Hori, K. (1994). Indonesian Medicinal Plants VIII. Chemical structures of Triterpenoid, Bruceajavin A and Bruceacathinoside from the stem of *Brucea javanica* (Simaroubaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, 42: 1416-1421.
- Koo, M.W.; Ogle, C.W.; Cho, C.H. (1986). Effects of verapamil, carbenoxolone and N-acetylcysteine on gastric wall mucus and ulceration in stressed rats. *Pharmacol.*, 32: 326-334.
- Kutchai, H.C. (1996). Gastrointestinal Secretions. In: *Principles of Physiology*. Ed. By R.M. Berne and M.N. Levy, 2<sup>nd</sup> edition, Mosby-Year Book Inc., St Louis, Missouri, p. 516-589.
- László, F.; Karácsony, G.; Pávo, J.; Varga, Cs.; Rojik, I.; László, F.A. (1994). Aggressive role of vasopressin in development of different gastric lesions in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 258 (1-2): 15-22.
- László, F.; Szepes, Z.; Varga, Cs.; László, F.A. (1998). Deleterious actions of vasopressin in gastroduodenal ulceration: Clinical and experimental observations. *Scand. J. Gastroenterol.*, 33: 62-67, Suppl. 228.
- Lavie, D.; Kaye, I. (1963). Isolation of beta-sitostenone from *Quassia amara*. *J. Chem. Soc.*, 5001.
- Levine, R. J. (1971). A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: *Peptic Ulcer*. (C.J. Pfeiffer, ed.), pp. 92-97, Munksgarrd, Copenhagen.
- Levine, J.D.; Fields, H.L.; Basbaum, A.I. (1993). Feature article peptides and the primary afferent nociceptor. *J. of Neurosci.*, 13: 2273-2286.

- Lewis, J.; Mansour, A.; Khachaturian, H.; Watson, S.J.; Akil, H. (1987). Opioids and pain regulation. In: *Pain and Headache*, Vol. 9. Neurotransmitters and Pain Control. (Akil, H.; Lewis, J.W., eds) S. Karger, Basel, pp. 129-159.
- Lewis, D.A.; Hanson, P.J. (1991). Anti-ulcer drugs of plant origin. In: Ellis, G.P., West, G.B. (Eds), *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 28. Elsevier Science B.V., pp. 201-301.
- Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. (1949). A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments. *J. Pharm. Exper. Therap.*, 95: 99-113.
- Lloris, J.M.; Bolant, B.; Gimeno, L.; Cejalvo, D.; Gimeno, L.O.; Calvo, M.A.; Perkins, I. (1991). Gastric juice and analysis of basal and stimulated secretion following treatment with rice-bran oil. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 74:245-248.
- Majewska, M.D.; Harrison, N.L.; Schwartz, R.D.; Barker, J.L.; Paul, B.S. (1986). Steroid Hormone Metabolites Are Barbiturate-Like Modulators of the GABA Receptor. *Science*, 232: 1004-1007.
- McNichol, R.W.; Ewing, J.A.; Faiman, M.D. *Dissulfiram: A unique medical aid to sobriety: History, pharmacology, research, clinical use.* Springfield: Thomas, 1995.
- Markenson, J.A. (1996). Mechanisms of chronic pain. *The American J. Med.*, 101 (Suppl. 1A): 1A-7S.
- Mizui, T.; Doteuchi, M. (1983). Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. *Japan J. Pharmacol.*, 33: 939-945.
- Montoneri, C.; Drago, F. (1997). Effects of pregnancy on cysteamine-induced peptic ulcers: Role of progesterone. *Dig. Dis. Sci.*, in press.

- Moretti, C.; Daharo, C.; Sauvain, M.; Jardel, C. (1994). Antimalarial activity of Cendronin. *J. Ethnopharmacol.*, 43: 57-61.
- Morimoto, Y.; Oshima, S.; Hara, H.; Sukamoto, T. (1994). Effects on KB-5492, a new anti-ulcer agent, on ethanol and acidified aspirin-induced gastric mucosal damage in vivo and in vitro. *Jpn. J. Pharmacol.*, 64: 41-47.
- Murae, T.; Tsiyuki, K.; Ikeda, K.; Nishiyama, T. (1979). Bitter principles of *Picrasma ailanthoides*. Planchon. *Tetrahedron*, 27: 5147-5155.
- Nestler, T.; Tittel, G; Wagner, H. (1980). Quantitative estimation of bitter-quassinoides of *Quassia amara* and *Picrasma excelsa*. *Planta Medica*, 38:204-213.
- Njar, V.C.O.; Alao, T.O.; Okogun, J.I.; Holland, H.L. (1993). 2-Methoxy Cantin-6-one: A new alkaloid from the stem wood of *Quassia amara*. *Planta Medica*, 59: 259-261.
- Njar, V.C.O.; Alao, T.O.; Okogun, J.I.; Raji, Y.; Bolarinwa, A.F.; Nduka, E.U.(1995). Antifertility activity of *Quassia amara*: Quassin inhibits the steroidogenesis in rat leydig cells In Vitro. *Planta Medica*, 61: 180-182.
- Ocampo Sanches, R. (1986) "Comunicacion personal". *TRAMIL II*, Sto Domingo, Rep. Dominicana, UASD, enda-caribe.
- Ohmoto, T.; Koike, K.; Mitsunaga, K.; Fakuda, H.; Kagei, K. (1989). Studies in Indonesian *Picrasma javenica* III. Structures of new quassinoids, Javenicins A, C and D. *Chem. Pharm. Bull.*, 37: 2291-2294.

- Okabe, S.; Takeuchi, K.; Murata, T.; Takagi, K. (1977). Effects of cimetidine and atropine sulphate on gastric secretion and healing of gastric and duodenal ulcers in rats. *Gastroenterol.*, 88: 660-665.
- Osada, T.; Goto, H.; Tsukamoto, Y.; Nakazawa, S.; Sugiyama, S.; Ozawa, T. (1990). Role of leukotrienes in hydrochloric acid-induced gastric lesions in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 35: 186-192.
- Ouyang, Y.; Koike, K.; Ohmoto, T. (1994). Canthin-6-one alkaloids from *Brucea mollis* var. *tokinensis*. *Phytochemistry*, 36 (6): 1543-1546.
- Pávo, I.; Varga, Cs.; Szûcs, M.; László, F.; Szécsi, M.; Gardi, J.; László, F.A. (1995). Effects of testosterone on rat renal medullary vasopressin receptor concentration and the antidiuretic response. *Life Sci.*, 56: 1215-1222.
- Peres, M.T.L.P.; Delle Monache, F.; Pizollatti, M.G.; Santos, A.R.S.; Beirith, A.; Calixto, J.B.; Yunes, R.A. (1998). Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. *Phytot. Res.* 12(3): 209-211.
- Perl, E.R. (1976). Sensitization of nociceptors and its relation to sensation. In: *Advances in Pain Research and Therapy* (Eds J.J. Bonica & D. Albe-Fessard), Raven Press, New York, p. 17-28.
- Perng, C.L.; Kim, J.G.; El-Zimaity, H.M.T.; Osato, M.S.; Graham, D.Y. (1998). One-week triple therapy with lansoprazole, clarithromycin, and metronidazole to cure *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease in Korea. *Dig. Dis. Sci.*, 43: 3, p. 464-467.
- Pio Corrêa, M. (1984). Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, vol. V, *Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, pp. 556*

- Powell, J.R.; Donn, K.H. (1984). Histamine H<sub>2</sub>-antagonist drug interactions in perspective: mechanistic concepts and clinical implications. *Am. J. Med.*, 7 (5B): 57-84.
- Rainsford, K.D. (1978). Biochemical gastroprotection from acute ulceration induced by aspirin and related drugs. *Bioch. Pharmacol.*, 27: 1281-1289.
- Rainsford, K.D. (1987). The effect of 5-lipoxygenase inhibitors and the leukotriene antagonists on the development of gastric lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice. *Agents and Actions*, 21: 316-319.
- Raji, Y.; Bolarinwa, A.F. (1997). Antifertility activity of *Quassia amara* in male rats in vivo study. *Life Sci.*, 61(11): 1067-1074.
- Rang, H.P.; Dale, M.M (2001). Fármacos Ansiolíticos e Hipnóticos. In: Farmacologia 4<sup>a</sup> ed. Ed. Guanabara Koogan. R.J. Cap. 33.
- Reisine, T.; Pasternak, G. (1996). Analgésicos e antagonistas opióides. In: Goodman & Gilman' *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9<sup>a</sup> ed.; Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B; Ruddon, R.W.; Gilman, A.G. eds. McGraw Hill., p.379-404.
- Robert, A.; Nezamis, J.E.; Lancaster, C.; Hancher A .L. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterol.*, 77: 433-443.
- Robins, R.J.; Morgan, M.R.A.; Rhodes, M.J.C.; Furze, J.M. (1984). Determination of quassin in picogram quantities by na enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytochem.*, 23 (5): 1119-1123.

Sachs, G.; Prinz, C.; Loo, D.; Bamberg, K.; Besancon, M.; Shin, J.M. (1994). Gastric acid secretion: activation and inhibition. *Yale J. of Biol. Med.*, 67: 81-95.

Sachs, G.; Shin, J.M. (1995). The pharmacology of the gastric acid pump: the H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 35: 277-305.

Sandor, A.; Kidd, M.; Lawton, G.P.; Miu, K.; Tang, L.H.; Modlin, I.M. (1996). Neurohormonal modulation of rat enterochromaffin-like cell histamine secretion. *Gastroenterol.*, 110: 1084-1092.

Santos, A.R.S.; Niero, R.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A.; Pizzolatti, M.G.; Delle Monache, F.; Calixto, J.B. (1995c). Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Medica*, 61: 329-332.

Schwarz, S.; Pohl, P. (1994). Steroids and opioid receptors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*, 48 (4): 391-402.

Shay, H.; Komarov, S.A.; Fels, S.S.; Meranze, D.; Gruenstein, M.; Siplet, H. (1945). A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol.*, 5: 43-61.

Siddall, P.J.; Cousins, M.J. (1995). Pain mechanisms and management: an update. *Clin. and Exper. Pharmacol. and Physiol.*, 22:679-688.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosman, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. and Petrovick, P.R. (1999). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 1<sup>a</sup> ed. Ed. UFRGS, UFSC. Porto Alegre, Florianópolis. P. 177, 178.

Souza Brito, A.R.M. (1994) *Manual de Ensaio Toxicológicos In Vivo*. Ed. da UNICAMP, Campinas, 122 p.

- Souza-Brito, A.R.M. (1996). *Farmacologia da Plantas Mediciniais*. In: Di Stasi, L.C., (organizador). *Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora da Unesp, cap. 7, p. 87-107.
- Streelman, D.; Kupchan, S.; Carey, F. (1978). The chemistry of some potent antileukemic principles from plants. *Diss. Abstr. Int.*, B 39: 759A.
- Sun S.B.; Matsumoto T.; Yamada H. (1991). Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum folcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43: 699-704.
- Szabo, S.; Reynolds, E.S.; Lichtenberger, L.M.; Dzan, V.J. (1976). Pathogenesis of duodenal ulcer. Gastric hyperacidity caused by propionitrile and cysteamine in rats. *Res. Commum. Chem. Phatol. Pharmacol.*, 16: 311-322.
- Szabo, S. (1981). Sulphydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*, 214: 200-202.
- Szabo S. (1987). Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: Time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand. J. Gastroenterol.*, 22 (Suppl. 127): 21-28.
- Szelenyi, I.; Thiemer, K. (1978). Distention Ulcer as a Model for Testing of Drugs for Ulcerogenic Side-Effects. *Arch. Toxicol*, 41(1): 99-105.
- Tabata, M.; Tomomasa, T.; Itoh, K.; Morikawa, A. (1996). Effect of 10% ethanol and sofalcone on prostaglandin E<sub>2</sub> content, mucus gel thickness, and experimental ulcers in the stomach of developing rats. *Digestion*, 57: 47-53.

- Texter, E.C.; Reylly, P.A. (1982). The efficacy and selectivity of pirenzepine: review and commentary. *Scand. J. Gastroenterol.*, 17 (72): 237-246.
- Tyler, V.E. Herbs of Choice. New York: Haworth, (1994). In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed.UFRGS, 1999.
- Valenta, Z.; Papadopoulos, S.; Podesva, C. (1961). Quassin and neoquassin. *Tetrahedron*, 15: 100.
- Wagner, H.; Bladt, S.; Munzing-Vasitian, K. (1975). Thin-layer chromatography of bitter principle drugs. *Pharm-Ztg*, 120: 1262.
- Wagner, H.; Nestler, T. (1979). An alkaloid from the stem of *Picrasma ailanthoides* and *P. quasinoides*. *Planta Medica*, 36: 113-115.
- Wallace, J.L.; Granger, D.N. (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J.*, 10: 731-740.
- Wolfe, M.M.; Soll, A.H. (1988). The physiology of gastric acid secretion. *N. Engl. Of Med.*, 319 (26): 1707-1715