

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Leônia Maria Batista

Atividade Antiulcerogênica de Extratos e Frações obtidas dos escapos das espécies *Syngonanthus bisulcatus* Rul. e *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira em modelos animais

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Funcional e Molecular, na área de
Fisiologia

Orientadora Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas

2003

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

Data da Defesa_____/_____/_____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Prof. Dr. Wagner Vilegas

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

Prof. Dr. Edgard Ferro Collares

Prof. Dr. Jayme Antônio Aboin Sertié

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Que eu não perca...

*Que Deus não permita que eu perca o romantismo, mesmo eu sabendo que as rosas não falam.
Que eu não perca o otimismo, mesmo sabendo que o futuro que nos espera não é assim tão
alegre.*

*Que eu não perca a vontade de viver, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos,
dolorosa..*

*Que eu não perca a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são
incapazes de ver, reconhecer e retribuir esta ajuda.*

*Que eu não perca a vontade de amar, mesmo sabendo que a pessoa que eu mais amo, pode não
sentir o mesmo sentimento por mim...*

*Que eu não perca a luz e o brilho no olhar, mesmo sabendo que muitas coisas que verei no
mundo, escurecerão meus olhos...*

*Que eu não perca a garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são dois adversários
extremamente perigosos.*

Que eu não perca a razão, mesmo sabendo que as tentações da vida são inúmeras e deliciosas.

*Que eu não perca o meu forte abraço, mesmo sabendo que um dia meus braços estarão
fracos...*

*Que eu não perca a beleza e a alegria de ver, mesmo sabendo que muitas lágrimas brotarão
dos meus olhos e escorrerão por minha alma...*

*Que eu não perca o amor por minha família, mesmo sabendo que ela, muitas vezes, me exigiria
esforços incríveis para manter a sua harmonia.*

Que eu não perca a vontade de ser grande, mesmo sabendo que o mundo é pequeno...

*E, acima de tudo, que eu jamais me esqueça que um pequeno grão de alegria e esperança
dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...*

A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor!

Francisco Cândido Xavier

*A todas as formas de energia suprema que espiritualizam o meu ser,
Aos meus pais pelo carinho, apoio e sabedoria dos seus ensinamentos,
A Climério companheiro e amigo, pelo seu afeto e pela sua presença constante nessa
caminhada;
Aos meus queridos alunos, razão da busca de novos conhecimentos, estímulo para
superação dos meus limites;
Aos movimentos sociais de base, pelo despertar do meu desejo de fazer da minha formação
um instrumento de transformação social e de superação da dicotomia entre o saber
popular e saber científico.*

namastê

AGRADECIMENTOS

Acredito que um trabalho se torna grandioso em função do empenho, participação e compromisso de uma equipe multidisciplinar. Este estudo só se tornou possível pela colaboração de algumas pessoas e órgãos a quem gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

À Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito pela orientação, profissionalismo, ensinamentos e amizade;

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas pela sua colaboração imprescindível ao projeto, sua dedicação e amizade;

À Prof. Dra Clélia Akiko Hiruma Lima, pelo meu despertar para área de úlcera, pela amizade e profissionalismo;

À Profa. Dra. Marcela Haum, Dra. Patrícia Melo, Maristela e João B. F. Neto pela colaboração na realização dos ensaios in vitro de cultura de células e pela amizade;

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Bioquímica pelos ensinamentos e colaboração;

Aos proferossores, Francesco Langoni, Eneida de Paula e Giselle Zenker pela participação na banca de qualificação, auxílios e sugestões;

Ao Prof. Dr. Stephen pela colaboração nas correções dos artigos;

À equipe do Laboratório de Produtos Naturais (Ana Beatriz, Luciana Magri, Walber, Ana Cláudia, Maíra, Victor, Fernanda, Rangel, Priscila e Ânderson) pela colaboração nas atividades laboratoriais, mais também pelos inúmeros momentos compartilhados;

À equipe do Laboratório de Química Orgânica da UNESP de Araraquara (Roberta, Fabinho, Lourdes, Márcio, Marcelo e Luciano) e em especial a Tamara pelos ensinamentos, colaboração e por terem tornado a minha estada nesse laboratório muito mais calorosa;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia (Zefa, Lú, Alexandra, Ivo, Lécio, Chico, Helena, Sandra e Marcelo) e bioquímica (Marina e Andréia) pelo profissionalismo, pelo bom desempenho de suas atividades e pelos nossos momentos de descontração;

Aos amigos que fiz em Campinas que acompanharam de perto essa jornada e com quem compartilhei muitas alegrias (Fátima, André, Márcia, Fernanda, Cipriano, Linete, Helenice, Iara, Alexandre, Ísis, Marília e Elaine);

Ao grupo do Instituto Ysvara de Ioga pelos ensinamentos e momentos compartilhados;

À Ana Beatriz e Luciana Magri, minhas amigas e companheiras, pelos ensinamentos, pelo afeto, pelo aconchego familiar e por mais essa conquista que também tem muito de vocês;

Aos professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas em especial da Disciplina de Farmacotécnica (Bagnólia, Ladjane e Terezinha) pela colaboração com as minhas disciplinas, tornando viável a minha saída para capacitação;

Aos queridos amigos e professores do Núcleo de Estudos e Pesquisas Homeopáticas e Fitoterápicas e PET-Farmácia (Climério, Rinalda, Margareth, Socorro, Graça, Ivoneide, Nivaldo e Deca) pela amizade e colaboração;

Ao programa de Capacitação Docente da Universidade Federal da Paraíba pelo apoio, pela visão, e pela oportunidade de estar realizando essa formação;

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de Doutorado.

ÍNDICE

	RESUMO	xi
	ABSTRACT	xiii
I	INTRODUÇÃO	1
1.1	Considerações gerais	1
1.2	Substâncias potencialmente ativas que apresentam atividades antiulcerogênica	4
1.3	Flavonóides e sua atividade biológica	6
1.4	Espécies selecionadas	10
II	OBJETIVOS	13
III	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3	Preparação do material vegetal	15
3.1	Coleta, identificação e preparação dos extratos das espécies em estudo	15
3.2	Triagem fitoquímica dos extratos	16
3.3	Preparação das frações ricas (FRF) e deficientes (FDF) em flavonóides	17
3.4	Análise cromatográfica das frações e isolamentos dos constituintes ativos	18
3.5	Modelos animais utilizados nos ensaios biológicos	19
3.6	Modelos experimentais de indução de úlcera	20
3.6.1	HCl/Etanol em camundongos	21
3.6.2	Etanol em ratos	22
3.6.3	Estresse por imobilização e frio em camundongos	22
3.6.4	Antiinflamatório-não-esteroidal associado a um agente parassimpatomimético em camundongos	23
3.6.5	Determinação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro em camundongos	24
3.6.6	Ácido acético em ratos	24
3.6.7	Isquemia e reperfusão em ratos	26

3.7.	Determinação dos mecanismos de ação antiulcerogênica	27
3.7.1	Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica	27
3.7.2	Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica	27
3.7.3	Grupamentos sulfidrilas (SH) na citoproteção	28
3.7.4	Óxido nítrico na citoproteção	29
3.7.5	Níveis séricos de somatostatina e gastrina	29
A	Coleta de Sangue	29
B	Somatostatina	30
C	Gastrina	30
3.7.6	Peroxidação lipídica em homogenato de estômago	30
3.7.7	Grupamentos tióis em homogenato de estômago	31
3.8	Ensaio de citotoxicidade em células de mamíferos	32
3.8.1	Análise do conteúdo de ácido nucléico (NAC)	32
3.8.2	Ensaio de vermelho neutro (VN)	33
3.8.3	Ensaio com MTT	34
3.9	Análise estatística	34
IV	RESULTADOS	35
4.1	Análise fitoquímica de extratos etanólicos brutos obtidos de escapos da <i>Syngonanthus bisulcatus</i> e <i>Syngonathus arthrotrichus</i>	35
4.2	Análise cromatográfica das frações e isolamento dos constituintes	36
4.3	Atividade antiulcerogênica de extratos e frações da <i>S. bisulcatus</i> e <i>S. arthrotrichus</i>	37
4.3.1	HCl/Etanol em camundongos	37
4.3.2	Etanol em ratos	38
4.3.3	Estresse por imobilização e frio em camundongos	39
4.3.4	Antiinflamatório-não-esteroidal associado a um agente parassimpatomimético em camundongos	41
4.3.5	Determinação dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal c	

	camundongos submetidos à ligadura do piloro	43
4.3.6	Ácido acético em ratos	45
4.3.7	Isquemia e reperfusão em ratos	46
4.4	Determinação dos mecanismos de ação antiulcerogênica	46
4.4.1	Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos	46
4.4.2	Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica de ratos	48
4.4.3	Grupamentos sulfidrila (SH) não protéicos na citoproteção	50
4.4.4	Óxido nítrico na citoproteção	52
4.4.5	Níveis séricos de somatostatina e gastrina	53
4.4.6	Peroxidação lipídica em homogenato de estômago	54
4.4.7	Grupamentos tióis em homogenato de estômago	55
4.5	Ensaio de citotoxicidade em células de mamíferos	56
V	DISCUSSÃO	59
VI	CONCLUSÃO	81
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

RESUMO

Syngonanthus bisulcatus e *Syngonanthus arthrotrichus*, espécies pertencentes à família Eriocaulaceae, são encontradas em regiões tropicais na América do Sul e no Brasil, principalmente nos estados da Bahia e Minas Gerais. Este gênero é conhecido popularmente como “sempre vivas”. *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus* foram investigadas porque os dados quimiotaxonômicos e filogenéticos da família apontavam a presença de flavonóides, que possuem atividades biológicas relevantes. Os extratos etanólicos dessas espécies, nas doses de 50, 100 e 250 mg/kg, e as frações ricas (FRF) e deficientes (FDF) em flavonóides, na dose de 100 mg/kg via oral, foram estudadas em modelos de úlceras induzidas agudamente (HCl/etanol, etanol, estresse, indometacina/betanecol e isquemia e reperfusão) e subcronicamente (ácido acético 30%), em camundongos e ratos. A via intraduodenal foi empregada somente para frações no modelo de ligadura do piloro. Tanto extratos, quanto frações, inibiram significativamente as lesões ulcerativas induzidas pelos diferentes agentes. Também foram observadas alterações significantes nos parâmetros bioquímicos da secreção ácida gástrica com redução na concentração total de H^+ no suco gástrico com conseqüente elevação do pH. Estes resultados sugeriram atividades anti-secretória e citoprotetora para extratos e frações. O pré-tratamento com as frações FRF de ambas as espécies produziu, no modelo de úlcera por ácido acético, redução na área da lesão por estimulação do processo de cicatrização. Adicionalmente, verificou-se que a atividade antiulcerogênica das frações não está relacionada ao aumento da PGE_2 ; porém, o muco aderido, provavelmente estimulado pelo óxido nítrico, bem como os grupos sulfidrilas protéicos parecem estar envolvidos com a atividade citoprotetora de FRF, de FDF ou de ambas, dependendo do mecanismo de ação investigado. Animais tratados com as FRF das espécies em estudo e submetidos à indução de úlcera por etanol tiveram

aumento significativo dos níveis séricos do hormônio somatostatina e redução no de gastrina. As FRF, estudadas em ratos submetidos à isquemia e reperfusão, produziram diminuição do número de lesões, indicando atividade antioxidante verificada através da redução da peroxidação lipídica e aumento dos níveis de grupamentos tióis totais. Por último, experimentos de citotoxicidade demonstraram que as frações da *S. bisulcatus* foram mais citotóxicas do que as frações da *S. arthrotrichus* em cultura de células V79. Análises cromatográficas e RMN demonstraram que as FRF contém luteolina e luteolina glicosilada para ambas as espécies, além de luteonarina (5,3',4'-triidroxi-6-C,7-O-di-B-D-glucopiranosilflavona) e 6-hidroxi-7-O-B-D-glucopiranosilluteolina (5,6,3',4'-tetrahidroxi-7-O-B-D-glucopiranosil) para *S. bisulcatus*. Para a *S. arthrotrichus*, foram isoladas ainda apigenina e luteolina-6-C- β -D-glucopiranosideo. O conjunto de dados permite concluir que a atividade antiulcerogênica dos extratos e frações da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus* está relacionada à atividade anti-secretória, citoprotetora e antioxidante dos flavonóides existentes nessas espécies.

ABSTRACT

The genus *Syngonanthus* (family Eriocaulaceae) is found in tropical regions of South America. In Brazil, the species *Syngonanthus bisulcatus* and *Syngonanthus arthrotrichus*, popularly known as “sempre vivas”, occur mainly in the states of Bahia and Minas Gerais. Chemiotaxonomic and phylogenetic data have indicated the presence of flavonoids in both of these species. In this work, we investigated the effects of ethanolic extracts (50, 100 and 250 mg/kg, orally) and of flavonoid-rich (FRF) and -deficient (FDF) fractions (100 mg/kg, orally) of these species in models of acute (HCl/ethanol, ethanol, stress, indomethacin/bethanecol) and subchronic (30% acid acetic) ulcers in mice and rats, as well as in a model of pylorus ligation in which the fractions were administered intraduodenally. The extract and fractions significantly prevented ulceration caused by various agents, and also significantly reduced the total H^+ concentration in gastric juice, which led to a rise in pH. These results indicated that the extract and fractions had antisecretory and cytoprotective actions. In acetic acid-induced ulcers, treatment with the fractions (FRF) from both species reduced the area of damage by enhancing the healing process. The antiulcerogenic activity of the fractions was not associated with an increase in PGE_2 formation. In contrast, the amount of adhered mucus (probably stimulated by nitric oxide), together with the sulphhydryl groups of proteins, appeared to be involved in the cytoprotection by FRF and FDF, depending on the mechanism of action. In animals pre-treated with the FRF of either species and then subjected to ulcer induction with ethanol, there was a significant increase in the serum levels of somatostatin and a reduction in those of gastrin. In rats with ischemia and reperfusion, FRF of both species increased the extent of injury, thus indicating an antioxidant activity that was reflected in a reduction in lipid peroxidation and an increase in the levels of total thiols. In cultured Chinese hamster V79

fibroblasts, the fractions of *S. bisulcatus* were more cytotoxic than those of *S. arthrotrichus*. Chromatographic analysis and NMR of the fractions of both species showed that the FRF contained luteolin and glycosylated luteolin, as well as previously detected flavonoids such as luteonarin (5,3',4'-trihydroxy-6-C,7-O-di-B-D-glucopyranosylflavone) and 6-hydroxy-7-O-B-D-glucopyranosylluteolin (5,6,3',4'-tetrahydroxy-7-O-B-D-glucopyranosyl), in the case of *S. bisulcatus*. In addition to luteolin, apigenin and luteolin-6-C- -D-glucopyranoside were also detected in *S. arthrotrichus*. These results indicated that the antiulcerogenic activity of extracts and fractions of *S. bisulcatus* and *S. arthrotrichus* was related to the antisecretory, cytoprotective and antioxidant actions of flavonoids present in these plants.

1.1- Considerações Gerais

As doenças ulcerativas do trato gastrointestinal são um exemplo clássico de agravo à saúde. Sabe-se que as lesões ulcerativas encontram-se associadas à presença excessiva de ácido na mucosa e a fatores predisponentes relacionados à redução das defesas naturais desta mucosa (HIRSCHOWITZ et al., 1995).

A associação das diversas secreções parietais (ácido clorídrico e fator intrínseco) e não parietais (muco, bicarbonato, Na^+ , K^+ e pepsinogênio) constituem o suco gástrico. Distúrbios envolvendo as funções secretoras podem estar relacionados à patogênese da úlcera péptica (JOHNSON e JOHNSON 1997; RANG et al., 1999).

O envolvimento de hormônios gastrointestinais no processo secretório gástrico e, conseqüentemente, na fisiopatologia da úlcera péptica, tem sido relatado destacando-se o papel da gastrina e da somatostatina, como auxiliares na modulação dessa função secretória no trato gastrointestinal (DOCKROY, 1999).

A gastrina é um hormônio produzido pelas células G da mucosa do antro gástrico e do intestino delgado. A presença de proteínas em uma refeição, a distensão da região do antro, o aumento do pH gástrico e os reflexos mediados pelo vago são os principais estímulos que promovem a secreção desse hormônio pelas células G. Uma vez liberada no duodeno, a gastrina alcança as células parietais pela corrente sanguínea atuando de forma indireta através das células ECL ou de forma direta sobre os receptores específicos para gastrina existentes nas células parietais, estimulando a liberação do Ca^{++} intracelular e, conseqüentemente, a secreção ácida (KUTCHAI, 1996; DOCKROY, 1999; SANDVIK et

al., 2001). Mesmo considerando que as células parietais possuem receptores para gastrina/CCK_B, sua resposta é potencializada quando os receptores H₂ são concomitantemente ativados (CALAM e BARON, 2001).

A somatostatina é um hormônio polipeptídico secretado pelas células D existentes na região do antro e do fundo do estômago e também no pâncreas. Age na proteção da mucosa gástrica através da inibição da secreção ácida (estimulada pelas células G e ECL) e pepsina no estômago (ZAKI et al., 2002).

Úlcera péptica é um termo convenientemente utilizado para se referir na maioria das vezes às úlceras gástrica e duodenal. Esse tipo de lesão leva à necrose que acomete toda a superfície da mucosa gástrica e também a camada muscular (HALTER et al., 1995). As úlceras gástrica e duodenal são patologias caracterizadas por lesões ulcerosas agudas ou crônicas que, na maioria das vezes, aparecem em qualquer porção do trato gastrointestinal exposta à ação agressiva do suco ácido-péptico (CALAM e BARON, 2001).

Inicialmente, acreditava-se que as úlceras do trato gastrointestinal resultavam da ação do ácido clorídrico e da pepsina naturalmente presentes no estômago (WALLACE, 2001). Com a evolução dos estudos foi observado que, além dos fatores agressores endógenos (ácido, pepsina, e bile), essa patologia estava associada a outros fatores exógenos predisponentes relacionados a condições de vida tais como: estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas antiinflamatórias-não-esteroidais (60 % do número de casos), ingestão de determinados alimentos, presença do agente infeccioso *Helicobacter pylori* e predisposição genética, os quais atuavam conjuntamente reduzindo a defesa da mucosa gástrica (BRUNTON, 1996; JOHNSON e JOHNSON, 1997; WOLFE e SANCHE, 2000; WALLACE, 2001).

A úlcera péptica atualmente é definida como um desequilíbrio entre a ação produzida pelos agentes agressores e a capacidade da mucosa gastrointestinal em resistir à agressão através dos elementos defensivos existentes, como síntese de prostaglandinas citoprotetoras, muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo e motilidade gástrica (KONTUREK et al., 1998; SZABO et al., 1995; PESKAR e MARICIC, 1998; WOLFE e SANCHE, 2000; CALAM e BARON, 2001).

A exacerbação da secreção ácida no estômago é nociva à mucosa gástrica (WOLFE e SANCHE, 2000); entretanto, sua regulação não deve ser considerada como a principal responsável pela úlcera péptica e como alvo central da pesquisa farmacológica, já que inúmeros pacientes com úlceras produzem quantidades de suco gástrico semelhante a indivíduos normais (BRUNTON, 1996). Esse fato levou ao estudo e descoberta da bactéria *Helicobacter pylori*, um bacilo gram negativo que possui a capacidade de colonizar o muco produzido pela mucosa gástrica sendo considerado uma das causas de úlcera péptica, linfoma gástrico e adenocarcinomas. Entretanto, já foi demonstrado também que esta bactéria pode estar presente na mucosa de indivíduos sadios que podem ou não desenvolver lesões ulcerativas (SUERBAUM e MICHETTI, 2002).

Desse modo, vários mecanismos estão implicados na patogênese das lesões gástricas, agindo sinergicamente ou não na produção das lesões. Assim, o aumento da secreção ácida gástrica, pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão de PG endógena, inibição do crescimento e proliferação celular da mucosa, alteração da motilidade gástrica, presença de agentes infecciosos e presença de radicais livres são alguns dos mecanismos envolvidos na ulcerogênese (WOLFE e SOLL, 1988; LEWIS e HANSON, 1991; HIRSCHOWITZ et al., 1995; WOLFE e SANCHE, 2000; ANDREOLI, 2000) e se constituem alvo de ação terapêutica.

1.2- Substâncias potencialmente ativas que apresentam atividade antiulcerogênica

Muitas plantas medicinais têm sido evidenciadas como úteis no tratamento de distúrbios gástricos. Como exemplo clássico temos as inflorescências do *Humulus lupulus*, que atua assemelhando-se ao bicarbonato de sódio na diminuição da acidez. Já as raízes e rizomas da *Glycyrrhiza glabra* e inflorescências da *Chamomilla recutita* são usadas nas inflamações estomacais como fortalecedoras da barreira da mucosa gástrica (LEWIS e HANSON, 1991; BRUNTON, 1996; BROWN e DATNER, 1998).

Contudo, existe na flora mundial um grande número de espécies usadas na medicina popular, a exemplo da *Momordica charantia* (GURBUZ et al., 2000), *Angelica archangelica*, *Carum carvi*, *Chelidonium majus*, *Iberis amara*, *Matricaria recutita*, *Melissa officinalis*, *Mentha piperita*, *Silybum marianum* (KHAYYAL et al., 2001), *Anthemis nobilis*, *Brassica oleracea*, *Maytenus aquifolium*, *Symphitum officinalis*, *Sorocea blompandii*, *Zolernia ilicifolia* (ALONSO, 1998) que são utilizadas no tratamento da úlcera gástrica por produzirem atividade antiulcerogênica dose-dependente associada a uma redução ácida e aumento da secreção de mucina, além de produzirem aumento na liberação de PGE₂ e diminuição de leucotrienos (REPETTO e LLESUY, 2002).

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

Substâncias com atividade antiulcerogênica, obtidas a partir de plantas, exercem seus efeitos estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, aumentando a síntese de prostaglandina e/ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato, ou ainda inibindo a secreção ácida (LEWIS e SHAW, 2001; BORRELL e IZZO, 2000; BEIL et al., 1995).

De acordo com Sheldon et al. (1997) a Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que 80% dos países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais, as quais encontram-se incorporadas a um sistema de medicina tradicional. Assim, as plantas são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que podem ser utilizadas não apenas como modelo para a síntese e obtenção de novos fármacos, mas também como uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (SCHENKEL et al., 1999; MCCHESENEY, 1996). Aproximadamente 25% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados são provenientes, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001).

Na pesquisa, envolvendo plantas com atividade antiulcerogênica, deve-se considerar como relevantes os seguintes dados:

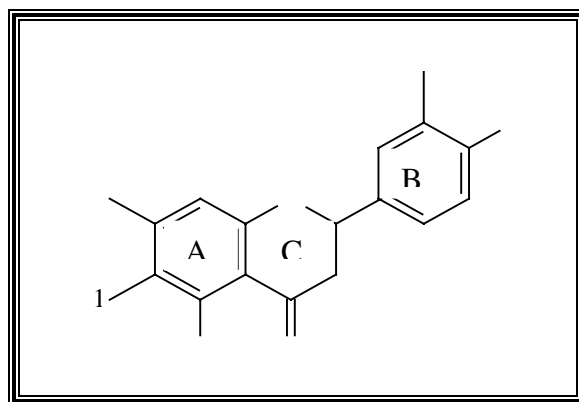
- 1- A úlcera péptica é uma patologia que apresenta uma elevada incidência em nosso país;
- 2- É uma doença crônica que requer, portanto, uma intervenção endoscópica-terapêutica, quase sempre recorrente, e que necessita em muitos casos de processo cirúrgico, acarretando transtornos financeiros para o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

É nesse contexto que devem ser discutidos os produtos já referidos pela terapêutica e os que posteriormente possam vir a ser usados para o tratamento e cura da úlcera péptica (LEWIS e HANSON, 1991).

1.3- Flavonóides e sua atividade biológica

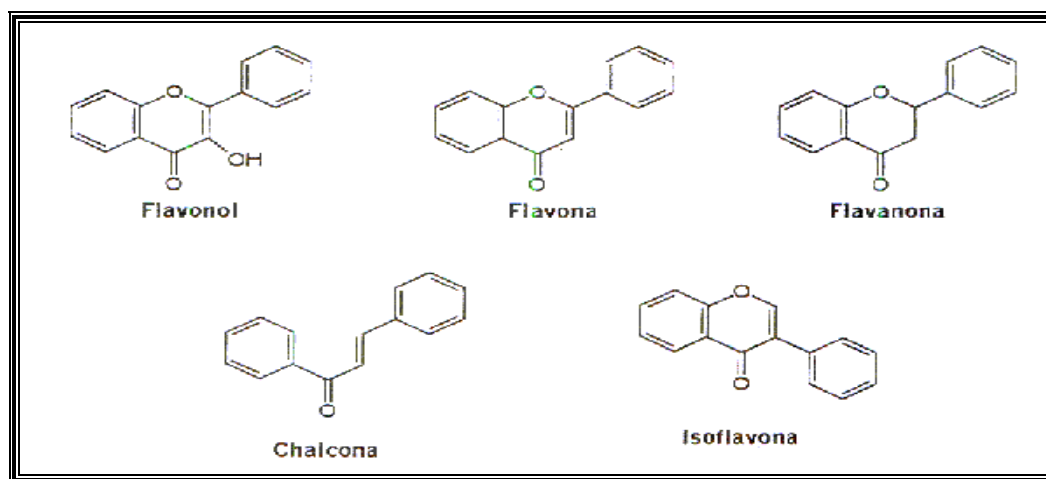
Os flavonóides (ou bioflavonóides) são substâncias polifenólicas amplamente encontradas na natureza, em frutas, folhas, flores, raízes, madeiras, cascas, pólen, néctar, sementes e grãos. Os flavonóides são produtos naturais cuja estrutura química, de baixo peso molecular, é constituída de um esqueleto básico de quinze átomos de carbono (Figura 1), distribuídos em três anéis fenólicos referidos como anéis A, C e B ou anéis de pirano (MILLER, 1996; HARBONE, 1996; DI CARLO et al., 1999).

Figura 1: Estrutura básica dos flavonóides



Os flavonóides (Figura 2) são classificados de acordo com sua estrutura química em flavonols (quercetina, kaempferol, miricetina), flavonas (apigenina, luteolina), flavona glicosilada (baicaleína), flavanonas (naringenina), flavonol glicosilados (rutina), catequinas, flavanóis (taxifolina), antocianidinas, isoflavonas (genistina), diidroflavonois e as chalconas (DI CARLO, 1999; MILLER, 1996).

Figura 2: Classe dos Flavonóides



Fonte: HARBONE, 1996

As estruturas químicas dos flavonóides podem variar de acordo com o processo de substituição dos grupos funcionais existentes nos anéis, os quais incluem a hidrogenação, hidroxilação, metilação, sulfatação e glicosilação (COOK e SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; ZUANAZZI, 1999; HARBONE e WILLIANM, 2000). Muitos flavonóides são encontrados na natureza na forma glicosilada (agenina ou glicona) e na forma de aglicona (sem associação a um açúcar). Quando se apresentam na forma glicosilada, esses açúcares podem ser D-glucose, L-raminose, arabinose, glucoramnose, galactose, entre outros. Estudos demonstraram que, independente de estarem vinculados ou não a açúcares, os flavonóides têm se mostrado ativos em diversos processos patológicos como referido para rutina e quercetina (COOK e SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999). O tipo de atividade farmacológica apresentada pelos flavonóides vai ser definido por sua estrutura química e pelos grupos funcionais ligados à sua estrutura principal.

Os flavonóides são responsáveis por funções biológicas que garantem o equilíbrio ecológico, como proteção contra a radiação ultravioleta, regulação do crescimento e

desenvolvimento normal das plantas, defesa contra fungos, bactérias e vírus, além de serem responsáveis pela coloração das pétalas das flores, quelarem metais tóxicos e reduzirem os agentes oxidativos lesivos à própria planta. Estão ainda envolvidos no processo de transferência de energia, morfogênese, determinação do sexo das plantas, respiração e fotossíntese da maioria das plantas (ZUANAZZI, 1999; COOK e SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; HARBONE e WILLIAM, 2000).

Nos últimos anos, os flavonóides tem tido um crescente interesse por parte da indústria química, farmacêutica e alimentícia. São capazes de modular a atividade das enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo que esses compostos possuem atividades hepatoprotetora, antialérgica, antiinflamatória, antiosteoporótica, antitumoral, analgésica, antianginosa, antiaterogênica, antidiabética, antidiarréica e protetora vascular. Uma vez absorvidos, influencia muitas funções biológicas incluindo síntese de proteínas, proliferação, diferenciação celular e angiogênese, trazendo benefícios em muitas patologias (DI CARLO, 1999; HALLIWELL et al., 1995; MILLER, 1996).

Na área alimentícia, os flavonóides estão relacionados ao sabor que proporcionam aos alimentos, à sua capacidade de conservação prevenindo sua rancificação (COOK e SAMMAN, 1996; HALLIWELL et al., 1995).

Alguns estudos mostram que os flavonóides são absorvidos pelo trato gastrointestinal após administração oral. No entanto, existem relatos que afirmam que estes compostos são pouco absorvidos, podendo alcançar ou não, em pequenas concentrações, a circulação sistêmica (COOK e SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; HARBONE e WILLIAM, 2000).

Acredita-se que os efeitos benéficos dos flavonóides estejam, em parte, associados à sua atividade antioxidante. O processo antioxidante inclui: seqüestro de radicais livres para prevenir a sua propagação, hidrólise enzimática da ligação éster para remover ácidos graxos peroxidados de lipídeos, seqüestro de íons metálicos de transição e redução de enzimas catalisadoras de peróxidos (ANDREOLI, 2000). Os antioxidantes inibem a peroxidação lipídica e outros processos mediados por radicais livres e, dessa forma, protegem o organismo de doenças atribuídas à formação destes radicais. Várias substâncias têm sido sugeridas como antioxidantes a exemplo dos flavonóides (catequina e rutina), taninos, cumarinas, xantinas e, mais recentemente, procianidina por apresentarem propriedade seqüestradora de radicais livres de uma maneira dose-dependente, tornando-se viáveis como agentes terapêuticos promissores nas patologias envolvidas com os radicais livres (CZINNER et al., 2001) como asma, câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, diabetes, doenças inflamatórias gastrointestinais e doenças no fígado (MILLER, 1996).

Certos flavonóides ou compostos com propriedades semelhantes a flavonóides têm apresentado atividade antiulcerogênica e previnem lesões da mucosa gástrica produzidas por vários métodos de indução de úlcera. Entre os inúmeros flavonóides já estudados, alguns são descritos como capazes de exercer atividade antiulcerogênica; entre eles destacam-se a rutina, narigina, quercetina, kaempferol, sofaradina e luteolina (LEWIS, 1992; DI CARLO et al., 1999; HARBONE e WILLIAM, 2000; BORRELLI e IZZO, 2000).

A ação gastroprotetora dos flavonóides naturais, de forma geral, pode ser mediada através da estimulação da secreção de muco e bicarbonato (CRISTONI et al., 1989; GRACIOSO et al., 2002) ou por um efeito inibitório direto na bomba de prótons das células parietais (BEIL et al., 1995).

1.4- Espécies selecionadas

A seleção das espécies em estudo foi baseada em dados quimiotaxonômicos, ou seja, baseou-se em numa classe de compostos químicos encontrada na família Eriocaulaceae (RICCI et al., 1996). As Eriocauláceas são constituídas por vários gêneros; são grupos naturais de rosetas herbáceas monocotiledôneas, caracterizadas por pequenas flores arrançadas em capítulos. Elas ocorrem predominantemente em regiões tropicais, na América do Sul. No Brasil, elas são encontradas nas regiões de cadeias montanhosas no estado da Bahia e Minas Gerais em áreas de campos rupestres, um ecossistema altitudinal com solo rochoso ou arenoso.

Algumas espécies de Eriocauláceas são economicamente importantes para a população de campos rupestres, tipo de formação que ocorre no topo de regiões montanhosas, especialmente nos estados de Minas Gerais (MG), Bahia (BA) e Goiás (GO), onde crescem as espécies de maior valor agregado. Tais plantas podem ser caracterizadas pela presença de folhas em rosetas basal; do centro, partem um ou mais escapos; portanto, as inflorescências são geralmente densas e envolvidas por brácteas bem desenvolvidas e vistosas. Essas plantas apresentam inflorescências que são secas e exportadas para muitos países por serem plantas ornamentais (TEIXEIRA, 1987). Muitas dessas espécies estão incluídas no gênero *Syngonanthus*.

A coleta, para fins de comercialização das sempre-vivas, é inteiramente baseada em extrativismo a partir das populações naturais e feita por pessoas da própria região, como meio de subsistência. O período principal de coleta concentra-se no primeiro semestre, quando ocorre floração da maioria das espécies de interesse econômico (GIULIETTI et al., 1996).

Estudos fitoquímicos das Eriocauláceas apontam a presença de quercetagetina e patuletina em extratos de capítulos em espécies dos gêneros *Euricalon*, (BATE-SMITH e HARBONE, 1969). Em *Leiothrix* foram observadas algumas flavonas (DOKKEDDAL e SALATINO, 1992); em *Paepalanthus*, o maior gênero dessa família, foram encontrados naftopironas e seus glicosídeos (VILEGAS et al., 1990; 1998; ANDRADE et al., 1996) e em *Syngonanthus* foi relatada a presença de 22 flavonóides (RICCI et al., 1996). Nas espécies selecionadas para esse estudo, *Syngonanthus bisulcatus* (Figura 3) e *Syngonanthus arthrotrichus* (Figura 4), foram identificados isovitexina, lutoonarina, 5,6,3',4'-tetrahidroxi-7-O- β -D-glucopiranosil flavona e luteolina (HARBONE, 1996; AGRAWAL, 1989) na primeira espécie e luteolina, apigenina e luteolina-6-C- β -D-glucopiranosideo na segunda espécie (AGRAWAL, 1989).



Syngonanthus bisulcatus Rul.
Figura 3

Syngonanthus arthrotrichus Silveira
Figura 4

Nos estudos etnofarmacológicos consultados não foram encontrados usos medicinais para essas espécies pela população. Entretanto, de acordo com estudos farmacológicos já desenvolvidos, Varanda e Vilegas (1994) relatam atividade mutagênica e citotóxica atribuída à paepalantina, uma naftopirona majoritária da *P. bromelioides* (VILEGAS et al., 1990; 1998; COELHO, 2000) e atividade imunoestimulante da *Syngonanthus bisulcatus* (COELHO, 2000).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal contribuir com o entendimento da fisiopatologia da úlcera gástrica através de estudos farmacológico e fitoquímico dos extratos e frações obtidos dos escapos das espécies *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*.

Estudar caminhos viáveis de obtenção de moléculas potencialmente ativas que, posteriormente, possam tornar-se um produto farmacêutico no mercado nacional em função de sua eficácia, tem sido a razão do trabalho de nosso laboratório. Para tanto nos propusemos a:

- Identificar, através de estudos fitoquímicos, o perfil dos extratos obtidos de escapos das espécies *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*;
- Determinar, através de triagem farmacológica, a dose que produz melhor efeito farmacológico de ambas as espécies em modelos de indução de úlcera para os extratos etanólicos e, posteriormente, em frações;
- Avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato etanólico e frações ricas e deficientes em flavonóides obtidas dos escapos das espécies *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus* em modelos clássicos de indução aguda de úlcera gástrica (HCl/Etanol, etanol, estresse, indometacina/betanecol, isquemia e reperfusão);
- Determinar o efeito das frações ricas e deficientes em flavonóides das espécies selecionadas sobre:
 - a) Os parâmetros bioquímicos da secreção gástrica;

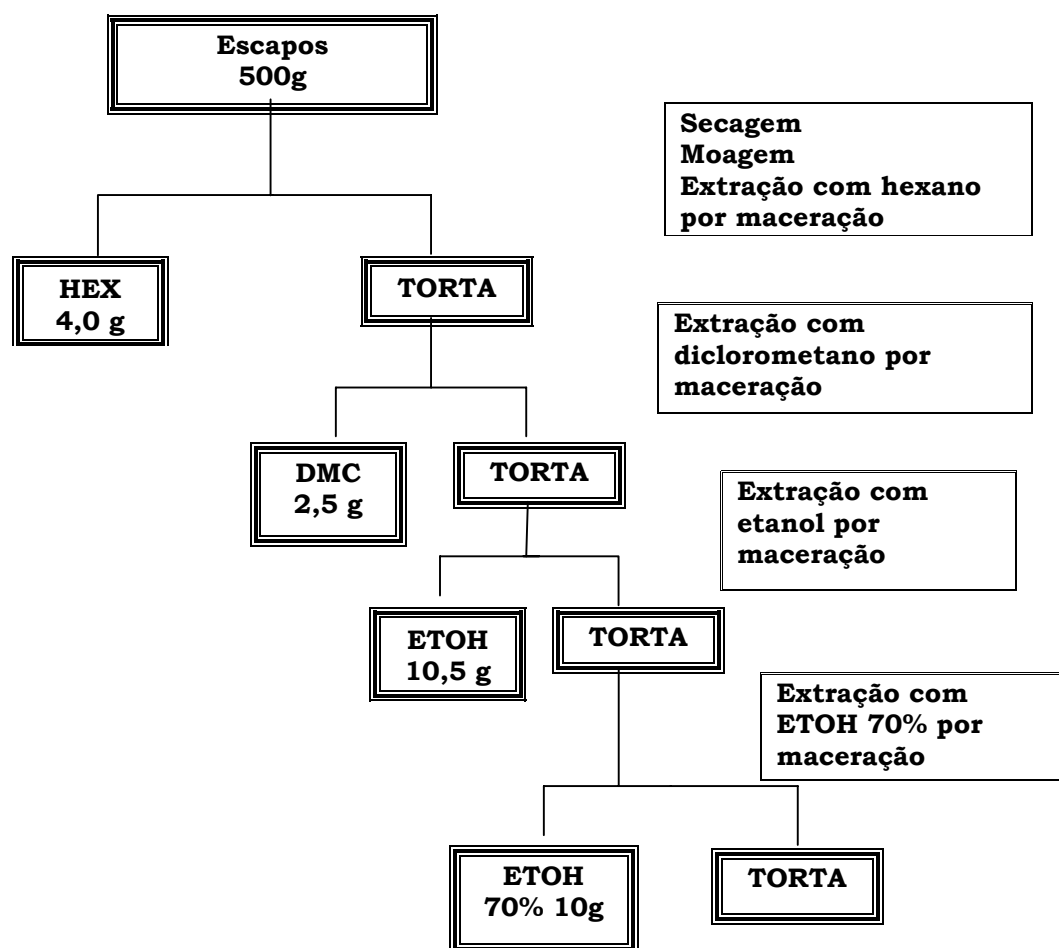
- b) O modelo subcrônico de indução de úlcera por ácido acético;
- c) Os mecanismos de ação envolvidos com a atividade antiulcerogênica como prostaglandina, muco, grupamentos sulfidrilas, óxido nítrico, substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), grupos tióis, somatostatina e gastrina;
 - Identificar quais são os constituintes existentes nos extratos e frações aos quais pode-se atribuir a atividade farmacológica;
 - Avaliar a citotoxicidade das frações ricas e deficientes em flavonóides em modelos de células V79.

3- Preparação do Material Vegetal

3.1- Coleta, identificação e preparação dos extratos das espécies em estudo

Syngonanthus bisulcatus Ruhland e *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira são conhecidas popularmente como sempre-vivas-chapadeira e sempre-vivas-mini-saia. A espécie *S. bisulcatus* foi coletada na Serra do Cipó e identificada por P. T. Sano; já a espécie *S. arthrotrichus* foi coletada na Diamantina e identificada por A. M. Giulietti. Um exemplar de cada espécie foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo com o Voucher n° SPF 77735 e CFCR 4285, respectivamente.

Após as espécies terem sido coletadas e secas a uma temperatura de 60° C, por 4 dias, foram separados os escapos dos capítulos e, em seguida, pulverizados. Partindo-se de 500 g de escapos pulverizados passou-se à preparação do extrato, inicialmente, através da maceração, deixando o pó dos escapos em contato por sete dias com cada solvente, em ordem crescente de polaridade; a princípio, a maceração foi feita com hexano e, na sequência, com diclorometano, etanol e etanol 70%. Ao final da extração os extratos foram filtrados em papel de filtro e evaporados à pressão reduzida em rotaevaporador conforme Fluxograma 1.



Fluxograma 1: Obtenção dos extratos polares a partir de escapos da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*.

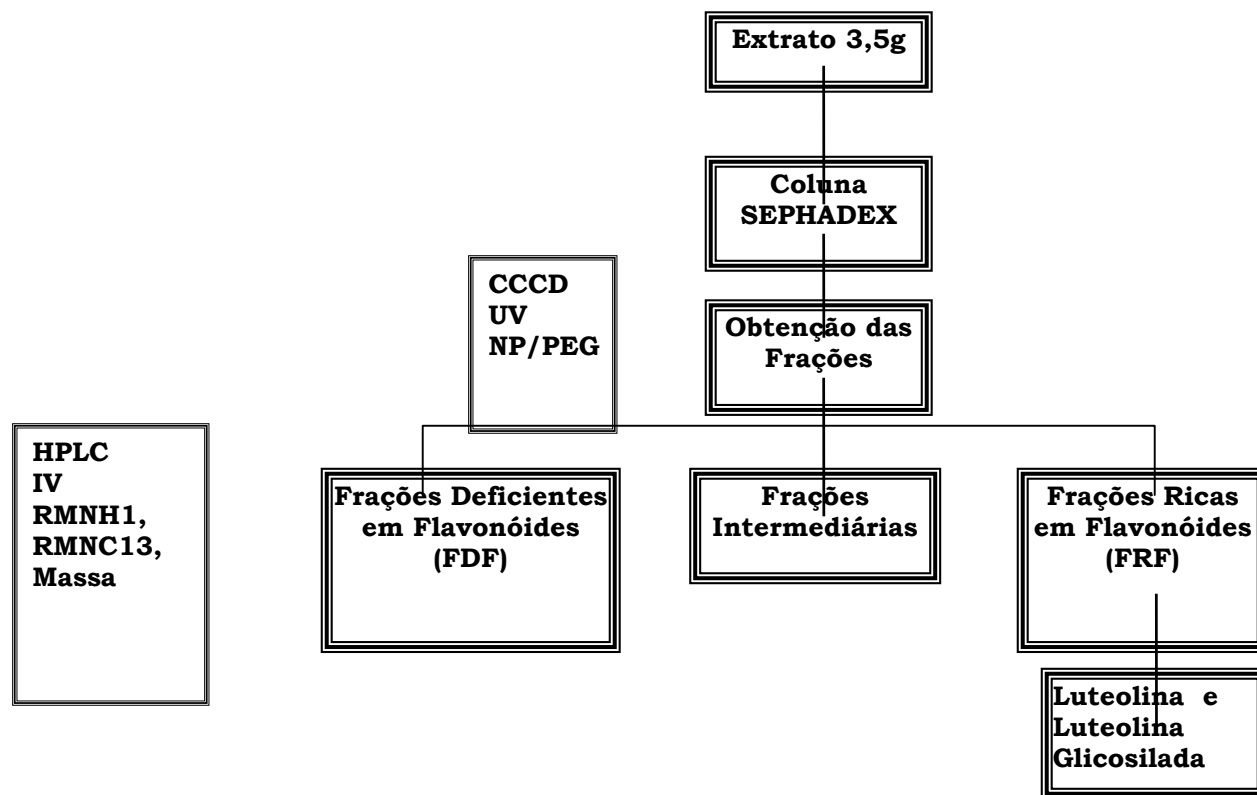
3.2- Triagem fitoquímica dos extratos

Após a obtenção dos extratos etanólico e etanólico 70%, passou-se à realização de uma triagem fitoquímica de acordo com a metodologia descrita por Wagner et al. (1984). Foi verificada a presença (+) ou ausência (-) de: alcalóides (através do reagente de Dragendorff ou iodoplatinato); antraquinonas (solução de hidróxido de potássio 10% em metanol); flavonóides (pela sua intensa cor fluorescente no visível ou luz ultravioleta

quando revelado com o reagente produto natural/polietilenoglicol (NP/PEG); compostos fenólicos (após exposição da placa cromatográfica a vapores de amônia e imediatamente observados na luz ultravioleta); saponinas, triterpenos e esteróides (através do reagente ácido sulfúrico-anisaldeído ou solução ácido sulfúrico-sulfato sérico, produzindo uma mistura de cores após aquecimento por 5 minutos a 100°C) e taninos (solução de cloreto férrico 5% em metanol com solução de gelatina a 1%). Foram utilizados, como solução padrão, a rutina, isoquercetina, ácido clorogênico e catequinas, luteolina e apigenina todas preparadas em metanol.

3.3- Preparação das frações ricas (FRF) e deficientes (FDF) em flavonóides

Inicialmente foi feita uma análise por cromatografia de camada delgada (CCCD) dos extratos etanólicos (EEOH) e etanólico 70% (EEOH 70%) dos escapos da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*. A eluição da placa cromatográfica foi feita com mistura de CHCl₃/MeOH/H₂O 43:37:20, fase inferior. A placa foi revelada sob luz UV e em seguida, com vapores de iodo; após eliminação do iodo, a mesma foi revelada com o NP/PEG. Através desse reagente foi possível observar a presença de manchas amarelas ou alaranjadas quando observadas sob luz ultravioleta indicando a presença de flavonóides. Os extratos etanólico e etanol 70%, por apresentarem o mesmo perfil fitoquímico, foram adicionados para a obtenção de maior quantidade de massa de acordo com o Fluxograma 2.



Fluxograma 2: Obtenção das frações ricas (FRF) e deficientes (FDF) em flavonóides a partir dos extratos de escapos da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*.

3.4- Análise cromatográfica das frações e isolamentos dos constituintes ativos

Para o fracionamento do extrato etanólico, utilizou-se uma coluna de Sephadex LH-20 como fase estacionária. Partiu-se de 3,5 g do extrato bruto, dissolvido em 10 ml de Metanol (MeOH) e, em seguida, centrifugou-se a mistura. Aproximadamente cerca de 3,0 g da amostra foram aplicadas na coluna, eluídas com metanol puro, em fluxo de 0,5 ml/min obtendo-se, ao final do processo, 126 frações de 4 ml cada para *Syngonanthus bisulcatus* e 92 frações para *Syngonanthus arthrotrichus*. As frações foram analisadas por CCCD e o sistema de solvente utilizado foi $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ 43:37:20 e butanol/ácido acético/ H_2O 60:15:25 (BAW), fase inferior e os reveladores foram luz ultravioleta e iodo.

As frações foram agrupadas, de acordo com o perfil fitoquímico, de 1 a 50 em frações deficientes em flavonóides (FDF), 51 a 70 em frações intermediárias e 71 a 126 em frações ricas em flavonóides (FRF) para *Syngonanthus bisulcatus*. Para a *Syngonanthus arthrotrichus* as frações foram agrupadas de 1 a 22 como FDF, 23 a 48 em frações intermediárias e 49 a 92 em FRF. As frações ricas e deficientes em flavonóides foram agrupadas em pools para obtenção de maior quantidade de massa necessária aos estudos biológicos. Em estudos anteriores desenvolvidos por Coelho (2000) e Rinaldi (2000) foi realizado processo de purificação das frações seguido de espectros de luz ultravioleta (254 e 365 nm), infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H), carbono 13 (RMN¹³C) usando um espectrofotômetro de Brucker AC-200, operando a 200 MHz para ¹H e 500 MHz for ¹³C, além de espectro de massa obtido com aparelho VGPLAPSORM SISIONS, modelo SPLITTER VACCO 9:1. Com isso foi possível chegar à elucidação da estrutura do composto majoritário obtido das frações e extratos dos escapos da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*.

3.5 - Modelos animais utilizados nos ensaios biológicos

Para a avaliação da atividade antiulcerogênica das amostras obtidas das espécies *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus* e uma posterior elucidação dos mecanismos de ação envolvidos, foram utilizados camundongos Swiss albinos machos, pesando entre 25-35 g, e ratos Wistar machos, com peso entre 180-250 g, todos provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de sete dias, antes dos ensaios experimentais, sob temperatura (23 ± 2° C) e ciclos claro-escuro controlado de 12 h. Os animais foram alimentados com ração Nuvital (Nuvilab) água à vontade e distribuídos, ao acaso, nos

diferentes grupos experimentais. Os períodos de jejum a que foram submetidos os animais estão de acordo com o preconizado para cada uma das metodologias empregadas. Os protocolos experimentais dos testes utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp. Todos os experimentos foram iniciados no período da manhã.

3.6- Modelos experimentais de indução de úlcera

Os modelos experimentais adotados neste trabalho foram selecionados de acordo com a literatura para garantir reprodutibilidade; esses modelos são também aqueles que mimetizam as principais causas de úlcera gástrica no homem. Dentre eles, encontram-se modelos que investigam a atividade antiulcerogênica e os que visam elucidar os prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica.

Na avaliação da atividade antiulcerogênica de cada uma das espécies foram realizados experimentos de indução aguda de úlcera gástrica por HCl/etanol, estresse por contenção e frio, indometacina/betanecol em camundongos e por etanol e isquemia-reperfusão em ratos. Adicionalmente, investigou-se os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (pH, volume e concentração ácida total) através do experimento de ligadura de piloro. No sentido de investigar o modo pelo qual a mucosa gástrica se protege dos diversos agentes lesivos utilizados, ou seja, quais os mecanismos envolvidos com a atividade antiulcerogênica observada, foram realizados experimentos de prostaglandina, muco, compostos sulfidrilas, óxido nítrico, gastrina, somatostatina, peroxidação lipídica e tióis totais. Na tentativa de entender como se portam as amostras vegetais frente a uma indução de lesão ulcerativa que envolve um tratamento subcrônico foi realizado o experimento de ácido acético em rato.

Os extratos e frações das espécies estudadas foram sempre administrados em diferentes doses, por via oral, exceção feita ao modelo de ligadura do piloro, onde se utilizou a via intraduodenal para a administração das amostras e substâncias controles.

As amostras vegetais foram utilizadas nos modelos específicos em doses previamente padronizadas com seus respectivos controles positivo (cimetidina ou lansoprazol) e negativo (NaCl 0,9 %) na dose volume de 10 ml/Kg. A salina foi empregada como veículo para dissolução das diferentes amostras vegetais utilizadas nesse estudo.

Em todos os experimentos de indução de úlcera gástrica as lesões ulcerativas foram quantificadas e classificadas de acordo com a sua severidade (SZELENYI e THIEMER, 1978) em lesões nível 1 (pontos hemorrágicos < 1 mm), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas > 3 mm de extensão), com pequenas modificações. Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice ulcerativo (IU) obtido através da equação:

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

3.6.1- HCl/Etanol em camundongos

Este método foi realizado conforme descrito por Mizui e Doteuchi (1981). Após 24h de jejum, os camundongos foram tratados com lansoprazol na dose de 30 mg/kg (controle positivo), salina 0,9% (controle negativo) e com extrato etanólico nas doses de 50, 100 e 250 mg/kg. Após 50 minutos foram induzidas as lesão gástricas através da administração, também oral, de 0,2 ml de uma solução 0,3M HCl/etanol 60 %. Uma hora após a administração do agente lesivo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical; em seguida, os estômagos foram retirados e inflados com 2,0 ml de solução de NaCl 0,9% e abertos ao longo da grande curvatura. Após este procedimento, os estômagos permaneceram em

formalina 5% durante um período adicional de 30 minutos para fixação das lesões ulcerativas e posterior determinação do índice ulcerativo (IU).

3.6.2- Etanol em ratos

Este método foi descrito por Morimoto et al. (1991). Os ratos foram submetidos inicialmente a um jejum de 24 horas e, após esse período, pré-tratados com lansoprazol na dose de 30 mg/kg (controle positivo), salina 0,9% (controle negativo) e com as frações FRF e FDF (100 mg/kg) obtidas das espécies em estudo. Após 1 hora foi administrado a esses animais 1 ml de etanol absoluto (agente lesivo) por via oral e uma 1 h após o etanol, os mesmos foram submetidos ao sacrifício por deslocamento cervical; em seguida, os estômagos foram retirados e inflados com 2,0 ml de solução de NaCl 0,9% e abertos ao longo da grande curvatura. Após este procedimento, os estômagos permaneceram em formalina 5% como descrito anteriormente.

3.6.3- Estresse por imobilização e frio em camundongos

A metodologia utilizada foi descrita por Levine (1971), seguida de algumas modificações. Após 36 h de jejum, os camundongos foram tratados com extrato etanólico, obtido dos escapos da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*, nas doses de 50, 100 e 250 mg/kg, com cimetidina na dose de 100 mg/kg (controle positivo) e salina 0,9% (controle negativo), todos administrados v.o. (10 ml/kg). Trinta minutos após a administração dos diferentes tratamentos, as patas dianteiras e traseiras dos animais foram imobilizadas para que eles fossem então colocados no interior de contêntores de PVC (9 cm de comprimento x 3,5 cm de diâmetro) a 4° C, por um período de 4 h. Ao final deste período, os animais foram sacrificados por

deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura para quantificação e classificação das lesões gástricas e determinação do IU. Em, outro momento, este mesmo experimento foi realizado, utilizando-se porém, em vez dos extratos, as frações ricas (FRF) e deficientes (FDF) em flavonóides na dose de 100 mg/kg, além dos grupos anteriormente citados.

3.6.4- Antiinflamatório-não-esteroidal associado a agente parassimpatomimético

O experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Rainsford (1987), em camundongos Swiss machos, colocados em jejum por um período de 36h e distribuídos aleatoriamente nos grupos tratados. Os tratamentos foram feitos por via oral com extrato etanólico nas doses de 50, 100 e 250 mg/kg, cimetidina (100mg/kg) ou salina 0,9%. Trinta minutos mais tarde, os animais receberam, por via subcutânea, indometacina (20 mg/kg) preparada em solução estéril de 5% de NaHCO_3 e, concomitantemente, por via intra peritoneal, betanecol (agente parassimpatomimético) preparado em solução 0,15M de NaCl estéril, na dose de 5 mg/kg. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 3 h após a administração do agente lesivo. Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da maior curvatura como descrito anteriormente. Este mesmo experimento foi realizado com as frações ricas e deficientes em flavonóides, na dose de 100 mg/kg, além dos controles já referidos.

3.6.5- Determinação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro

Esse experimento foi realizado de acordo com o método de ligadura de piloro descrito por Shay et al. (1945), com algumas modificações. Os camundongos foram colocados em jejum de 24h com livre acesso a água, e divididos aleatoriamente nos diferentes grupos de tratamento. Em seguida foram anestesiados e submetidos a uma incisão longitudinal, logo abaixo da apófise xifóide, para amarração do piloro e a administração das amostras FRF e FDF (100 mg/kg), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) ou NaCl 0,9 % (controle negativo), todos em dose-volume final de 10 ml/kg, por via intraduodenal. Logo após os tratamentos as incisões dos camundongos foram suturadas. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados, as incisões reabertas e, após o pinçamento da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico), o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida, foram determinados volume, pH e concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica. Para tanto, ao conteúdo estomacal água destilada foi adicionada até completar o volume de 10 ml; esta solução foi centrifugada por 10 min, a 3000 rpm; o sobrenadante foi titulado com NaOH 0,01 N em bureta digital modelo EM, marca Hirschmam Laborgerate, utilizando fenoftaleína como indicador. A concentração total de ácido foi expressa em mEq/ml/4h. O pH foi determinado em pHmêtro modelo Q 400 A, marca Quimis.

3.6.6- Ácido acético em ratos

Esse ensaio foi realizado conforme a técnica descrita por Takagi et al. (1969) somente com as frações FRF e FDF (100 mg/Kg) em ratos. Os animais foram anestesiados, para exposição do estômago, através de uma incisão de aproximadamente dois cm realizada

abaixo da apófise xifóide. Ao estômago exposto foram injetados 0,05 ml com o auxílio de uma microseringa, de uma solução de ácido acético a 30 %, na camada subserosa na junção do corpo com o antro do estômago. Dois dias após a administração do ácido, foram iniciados os tratamentos, por via oral, com salina 0,9%, cimetidina (100 mg/Kg) ou frações FRF e FDF na dose de 100 mg/kg durante, 14 dias consecutivos. Ao final do tratamento, os animais foram deixados em jejum de 12 horas, sacrificados e seus estômagos removidos, abertos no sentido da maior curvatura e em seguida foram feitas as determinações das áreas de lesões. As úlceras foram determinadas através da medida do comprimento e da largura das lesões (conforme diagrama 1), observando-se os dois maiores eixos em ângulo de 90°, com auxílio de um paquímetro digital Digimatic (Mitutoyo Corporation da Caliper-Japão) sendo seu produto expresso em mm² e denominado área de lesão ulcerativa (ALU).

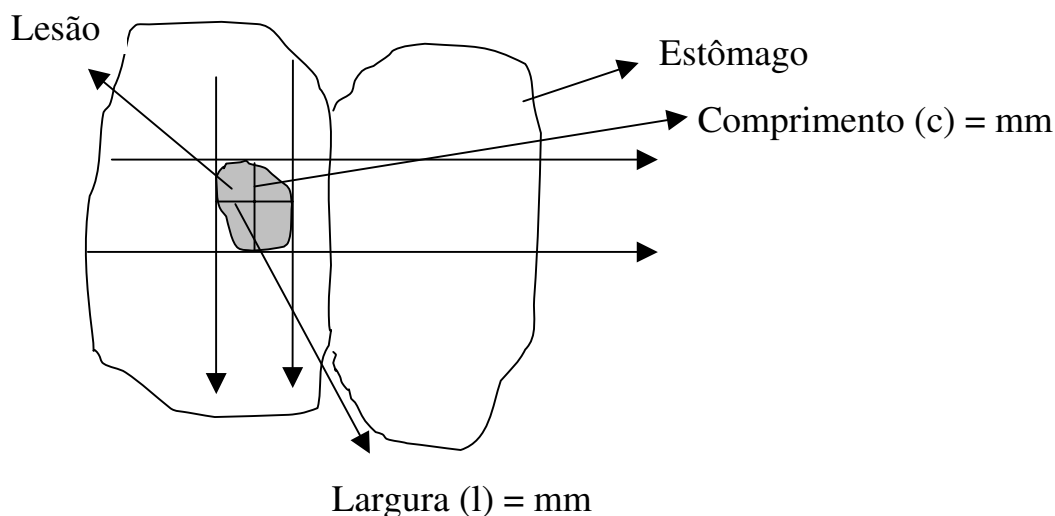


Diagrama 1: Representação dos locais onde ocorrem as determinações de largura e comprimento das lesões induzidas por ácido acético.

As fórmulas utilizadas para obtenção da ALU e % da taxa de cura estão descritas a seguir:

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

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

Onde: C = ALU dos animais do grupo controle e;

T = ALU dos animais dos grupos tratados com as frações ou cimetidina

3.6.7- Isquemia e reperfusão

Esse modelo foi realizado de acordo com o método descrito por Ueda et al. (1989). Ratos foram pré-tratados com FRF de ambas espécies na dose de 100 mg/Kg, 15 min após, anestesiados por via intraperitoneal, com cloridrato de quetamina (0,1ml/Kg) e xilazina (0,2 ml/Kg), e submetidos à tricotomia. Em seguida foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm do lado esquerdo do abdomen. A artéria aorta foi localizada e, posteriormente, a artéria celíaca a qual foi submetida a um processo de limpeza e eliminação de aderências; e essa artéria foi pinçada por 30 minutos aproximadamente, usando um “clamp” microvascular. Transcorridos 30 min da isquemia, o “clamp” foi retirado para permitir a reperfusão da mucosa gástrica por 60 min. Ao final desse período, os animais foram sacrificados, por ensanguinação via aorta abdominal. Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura e lavados com 4 ml de solução salina. As lesões foram examinadas macroscopicamente e a magnitude dos danos foi avaliada em escala como descrito por Alarcón de la Lastra et al. (1993); os resultados foram expressos em área mm^2 . As ulcerações foram calculadas para cada animal e expressas como índice ulcerativo.

3.7- Determinação dos mecanismos de ação antiulcerogênica

3.7.1- Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica

Esse experimento foi descrito por Curtis et al. (1995). Ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente nos grupos sham, salina, salina + indometacina, FRF, FRF + Indometacina, FDF e FDF + Indometacina. Os animais receberam, por via oral, salina 0,9%, cimetidina (100 mg/Kg) ou frações FRF e FDF (100 mg/Kg), respectivamente. Após 30 min, a indometacina na dose de 20 mg/kg via s.c. foi administrada aos grupos tratados com as amostras descritas. Uma hora após o tratamento inicial os ratos foram sacrificados, os estômagos retirados e abertos, a mucosa raspada até sua total remoção. O conteúdo foi pesado, picotado e logo suspenso em uma solução de 1 ml de tampão sódio fosfato (10 mM, pH 7,4); a solução assim obtida foi incubada a 37°C, por um período de 20 minutos. A prostaglandina presente no tampão foi determinada por “kit” imunoenzimático (RPN 222 – Amersham), em espectrofotômetro a 450 nm.

3.7.2- Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica

Esse método foi descrito inicialmente por Raffatullah et al. (1990) e foi realizado com algumas modificações. Os ratos foram colocados em jejum por 24 horas. Após jejum, os animais foram anestesiados, o abdômen incisado e o piloro ligado. Os grupos foram tratados com salina 0,9% (controle negativo), carbenoxolona 200 mg/Kg (controle positivo), FRF e FDF na dose de 100 mg/kg, por via intraduodenal, após a ligação do piloro. Após 4 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. A porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa, por 2 horas, em 10 ml de solução de alcian blue. O excesso de alcian blue foi removido lavando-se o estômago, por duas vezes sucessivas, com

7 ml de solução de sacarose 0,25 mol/l; a primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos. O corante, complexado ao muco aderido à parede gástrica, foi extraído com 10 ml de cloreto de magnésio 0,5 mol/l, agitando-se intermitentemente por um minuto, a cada 30 minutos, durante 2 horas. A 4 ml da mistura foram adicionados 4 ml de éter etílico e então procedeu-se agitação por 2 minutos. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 3600 rpm e o sobrenadante foi descartado. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (modelo Multiscan, marca Labsystems) a 598 nm. A determinação da concentração de alcian blue foi feita por intercalação em uma curva padrão com várias concentrações de Alcian Blue. Os resultados foram expressos em mg de alcian blue/g de tecido.

3.7.3- Grupamentos sulfidrilas (SH) na citoproteção

Esse modelo experimental foi realizado de acordo com Matsuda et al. (1999). As lesões da mucosa gástrica foram induzidas, medidas e expressas como índice ulcerativo (UI) como referido anteriormente. Para investigar o envolvimento dos grupos sulfidrilas endógenos no efeito protetor induzido por frações ricas (FRF) e deficientes em flavonóides (FDF), camundongos receberam previamente N-etilmaleimida (10 mg/kg) por via subcutânea. Após trinta minutos, esses animais foram tratados, por via oral, com salina, FRF e FDF (100 mg/kg). Decorrido o tempo de uma hora, os camundongos receberam 0,2 ml de HCl/etanol, via oral. Decorridos mais 60 min, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos para determinação do IU conforme referido anteriormente.

3.7.4- Óxido nítrico na citoproteção

Esse método foi descrito por Sikiric et al. (1997). Camundongos machos foram colocados em jejum por 24 h, com livre acesso a água; os animais foram divididos aleatoriamente, em grupos, os quais receberam por via intravenosa, injeção de solução salina (controle) e os demais grupos, injeção de N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), um inibidor da NO-sintase. Decorridos 30 min dos tratamentos endovenosos, todos os animais receberam, oralmente, salina, FRF ou FDF, na dose de 100 mg/Kg. Após 1 h foram administrados 0,2 ml de HCl/etanol a todos os grupos. Esses animais foram sacrificados 1h após a administração do agente indutor, para determinação do IU, conforme já descrito.

3.7.5- Níveis séricos de Somatostatina e Gastrina

a) Coleta de sangue

Lesões gástricas foram induzidas através da administração, por via oral, de 1 ml de etanol absoluto em ratos conforme descrito anteriormente. Os animais foram tratados com solução salina 0,9% (10 ml/Kg), lansoprazol (30 mg/Kg) e frações ricas em flavonóides obtidas das espécies *Syngonanthus bisulcatus* e *S. arthrotrichus* 30 minutos antes de receberem o agente ulcerativo. Uma hora após o etanol ter sido administrado, o sangue foi coletado pela aorta abdominal e colocado em tubos contendo EDTA. O sangue coletado foi centrifugado a 3000 x G por 15 minutos e o plasma obtido de cada amostra foi armazenado em freezer a -20° C até a realização dos ensaios para determinação dos níveis séricos de gastrina e somatostatina.

b) Somatostatina

A dosagem da somatostatina no plasma dos animais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Arimura et al. (1978), usando um “kit” de radioimunoensaio Eurisa Somatostatin (RB-306, Eurodiagnóstica). A radioatividade residual foi determinada em contador de cintilação gama (Beckman, modelo G5500), no tempo de 2-4 minutos.

c) Gastrina

A dosagem da gastrina no plasma dos animais foi realizada de acordo com o método descrito por Slingerland et al. (1984), usando um “kit” de radioimunoensaio (CIS bio International – GASK-PR). A radioatividade residual foi determinada em contador de cintilação gama (Beckman, modelo G5500) por 1 minuto.

3.7.6- Peroxidação lipídica em homogenato de estômago

Essa técnica foi descrita por Ohkawa et al. (1979). Baseia-se na medida dos níveis de malonildialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando o complexo colorido (cromóforo) que pode ser quantificado em espectrofotômetro a 532 nm. O complexo formado por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente usado como biomarcadores de peroxidação lipídica em sistemas biológicos. Inicialmente, os ratos foram submetidos à pré-tratamento com as FRF das espécies em estudo ou veículo e, em seguida, tiveram lesões gástricas induzidas pelo método de isquemia e reperfusão já descrito anteriormente. Esses animais foram sacrificados, a mucosa gástrica foi raspada, pesada e homogeneizada com KCl 0,15 M (relação 1:10). A 0,5 ml desse homogenato foram adicionados 0,2 ml do sódio duodecil sulfato (8,1%) e 1,5 ml de ácido acético (20%); o pH da solução foi ajustado, com NaOH,

para 3,5. Foram adicionados ainda 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) e quantidade de água destilada suficiente para completar volume final de 4 ml. Todas as amostras foram colocadas em banho-maria, a 95° C, em tubos de ensaio durante uma hora. Após resfriamento da amostra, foram adicionados 1 ml de água destilada e 5 ml de n-butanol. Posteriormente, os tubos de ensaio foram fechados, agitados durante um minuto e, em seguida, os mesmos foram centrifugados a 1400 G durante 10 minutos. A absorbância da capa orgânica foi medida a 532 nm em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1310, Lambda 3. A determinação das proteínas foi realizada segundo o método proposto por Gornall et al., 1949. Os resultados foram expressos como nanomoles de TBARS por mg de proteínas (nmol TBARS/mg proteínas).

3.7.7- Grupamentos tióis totais em homogenato de estômago

Esse método foi descrito por Faure e Lafond (1995), com algumas modificações. O material utilizado nesse experimento foi adquirido a partir de tratamentos realizados durante o desenvolvimento do experimento de isquemia e reperfusão (UEDA et al., 1989) descrito anteriormente. A 500 µl de meio constituído de Tris 0,25 mM e EDTA 20 mM, pH 8,2, foi adicionada uma alíquota (100 µl) do homogenato obtido a partir da raspagem do estômago de animal submetido ao processo de isquemia e reperfusão, em KCl 0,15M e tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,8. A absorbância da solução final foi determinada em espectrofotômetro a 412 nm (A1), modelo DU 640, marca Beckman. Foram adicionados à mistura, 10 µl de ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) 10 mM (diluído em metanol). Após 15 min, fez-se a segunda leitura (A2). Para zerar o aparelho,

usou-se o meio de reação (Tris-EDTA) e como branco, o DTNB diluído no mesmo tampão (B). Para calcular a concentração de grupamentos sulfidrilas utilizou-se a seguinte equação:

$(A2 - A1-B) \times 1,57 \text{ mM}$

Os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg proteínas $\times 10^{-3}$

3.8- Ensaios de citotoxicidade em células de mamíferos

Fibroblastos V79, clone M-8, oriundos de pulmão de hamster chinês, foram mantidos em cultura contínua, através de repiques periódicos quando atingiam a densidade de confluência (RODRIGUEZ e HAUN, 1999). O cultivo foi realizado em meio DMEM, contendo 100 U/ml de penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A incubação foi feita em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO_2 . Nos três diferentes ensaios de citotoxicidade redução de 3-(4,5-dimetiltiazole-2,5-bifenil tetrazolium bromide (MTT), incorporação do hidrocloreto de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (vermelho neutro - VN) e conteúdo de ácidos nucleicos (CAN), o plaqueamento foi realizado inoculando-se 3×10^4 células/ml em cada cavidade da placa (96 cavidades) e incubando a 37°C por 48 h. Posteriormente, as células foram expostas durante 24 h a diferentes concentrações das frações FRF (0 a 0,5 mg/ml) e FDF (0 a 1,0 mg/ml) de ambas as espécies.

3.8.1- Análise do conteúdo de ácido nucléico (CAN)

Esse método foi descrito por Cingi et al. (1991). Após a incubação e remoção do meio contendo as amostras vegetais, as células foram lavadas com tampão salina fosfato cálcio (PBS - Ca^{2+}), fixados com ácido tricloroacético a 5% e lavadas por duas vezes com

etanol (todas as soluções geladas), secas ao ar e lisadas com NaOH 0,5M (0,1 ml/cavidade, 1 hora a 37°C). Controles, contendo somente o meio de cultura, foram utilizados para expressar a porcentagem de morte celular, relativa aos efeitos das frações, determinada pela absorvância a 260 nm (Abs260) em espectro Beckman, modelo DU 70. O CAN é um método usual para quantificação do número de células; então, os níveis de DNA podem ser medidos por sua absorvância em 260 nm, com 50 µg DNA/ml dando uma absorvância de 1,0 a 260 nm.

3.8.2- Ensaio com Vermelho Neutro

Esse método foi descrito por Riddell et al., 1986. O meio foi removido e trocado por outro contendo 50 µg/ml do corante hidrocloreto de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (vermelho neutro), pré-incubado durante 12 h a 37°C e filtrado, em membrana Millipore (0,22 µM), antes do uso. Após 3 horas de incubação as células foram lavadas com tampão salino fosfato - cálcio (PBS-Ca²⁺ 1mM, pH 7,4), a 37°C, para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomas. A cada cavidade foi adicionado 0,1 ml da solução aquosa contendo ácido acético glacial (1%) e etanol (50 %) para fixar as células e extrair o vermelho neutro incorporado aos lisossomas. As placas foram agitadas, por 20 min em agitador de placas e as absorvâncias das soluções lidas a 540 nm (RIDDELL et al., 1986).

3.8.3- Ensaio com MTT

Este método foi padronizado por Denizot e Lang (1986). O meio foi removido e trocado por outro sem soro contendo o corante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-bifenil tetrazolium bromide (0,5 mg/ml), e as células foram incubadas durante 4 h, tempo necessário para que a redução ocorra. O meio foi retirado cuidadosamente, a ele foi adicionado 0,1 ml de etanol para solubilização do produto da redução do MTT (formazan). As placas foram agitadas por 10 min e a absorbância correspondente a cada cavidade foi lida em leitor de placas do tipo ELISA, a 570 nm.

3.9- Análise Estatística

Os resultados farmacológicos obtidos em ensaios de indução aguda e subcrônica de úlcera gástrica, determinação dos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica e aqueles que voltados para elucidação do mecanismo de ação, foram sempre expressos como média $\pm$ desvio padrão (dp) da média. Esses dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido por teste a posteriori de Dunnet. O nível de significância mínimo permitido foi de $p < 0,05$ em todas as análises. O programa utilizado na análise estatística foi o Systat 5.03 (Systat, inc).

Nos testes de citotoxicidade os valores de IC_{50} foram obtidos matematicamente da curva concentração-resposta do CAN, VN e MTT, sendo expressos também como média $\pm$ desvio padrão.

RESULTADOS

4.1- Análise fitoquímica de extratos etanólicos brutos obtidos de escapos da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*

A triagem fitoquímica dos extratos da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus* revelou que os principais compostos presentes nos extratos das espécies estudadas foram flavonóides e compostos fenólicos, conforme pode ser visto na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1- Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos de escapos da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*

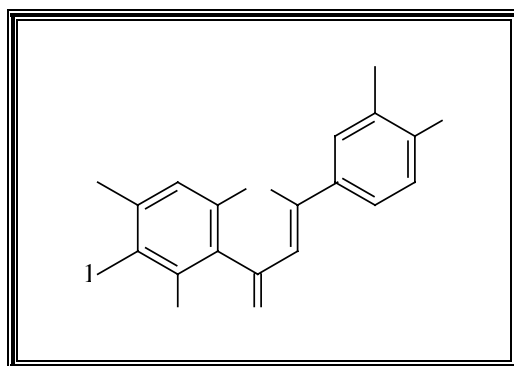
Extrato Etanólico da <i>Syngonanthus bisulcatus</i>							
Alcalóides	Antraquinonas	Flavonóides	Saponinas, sesquiterpenos, esteróides	Taninos	Compostos fenólicos	Catequinas, Rutina, Isoquercetina	Ácido clorogênico
-	-	+	-	-	+	-	-
Extrato Etanólico da <i>Syngonanthus arthrotrichus</i>							
Alcalóides	Antraquinonas	Flavonóides	Saponinas, sesquiterpenos, esteróides	Taninos	Compostos fenólicos	Catequinas Rutina Isoquercetina	Ácido clorogênico
-	-	+	-	-	+	-	-

Os sinais (+) ou (-) indicam, respectivamente, presença ou ausência das substâncias químicas indicadas.

4.2-Análise cromatográfica das frações e isolamento dos constituintes

De acordo com Coelho 2000 que desenvolveu estudos com os escapos da espécie *S. bisulcatus* obedecendo a este mesmo protocolo, nas frações ricas em flavonóides (FRF) também foi possível encontrar isovitexina, lutanarina, 5,6,3',4'-tetrahidroxi-7-O- β -D-glucopiranosilflavona e luteolina.

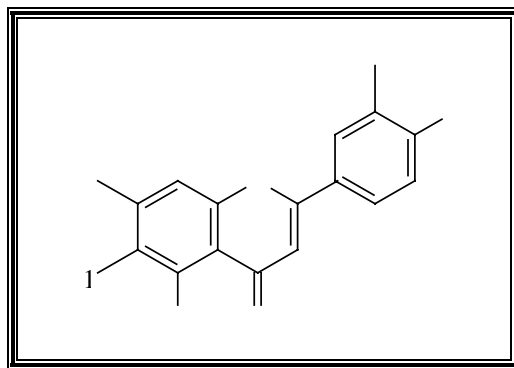
A análise cromatográfica desenvolvida nesse estudo permitiu a elucidação da estrutura do composto majoritário obtido a partir do fracionamento dos escapos da *Syngonanthus bisulcatus*. A luteolina e os derivados glicosilados da luteolina foram anteriormente descritos por Agrawal (1989); Harbone (1996).



Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	Nome	Referências
1	Gli	OH	H	Isovitexina	HARBORNE (1996), AGRAWAL (1989), HARBORNE (1996), AGRAWAL (1989) HARBORNE (1996), AGRAWAL (1989) HARBORNE (1996), AGRAWAL (1989).
2	Gli	O-Gli	OH	Lutanarina	
3	OH	O-Gli	OH	5,6,3',4'-tetra-hidroxi-7-O- β -D-glicopiranosilflavona	
4	H	OH	OH	Luteolina	

Flavonas da *Syngonanthus bisulcatus* Rul.

Para a espécie *Syngonanthus arthrotrichus* foi possível isolar, a partir do pool das frações ricas em flavonóides, a flavona luteolina anteriormente descrita por Agrawal (1989), informação essa que veio corroborar com estudos desenvolvidos por Rinaldi (2000), que além da luteolina, identificou também outros flavonóides como apigenina e luteolina-6-C- β -D-glucopiranoside descritas também por Agrawal (1989).



Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	Nome	Referências
1	H	H	OH	Luteolina	AGRAWAL, 1989
2	H	H		Apigenina	AGRAWAL, 1989
3	Glu	H	H	luteolin-6-C- β -D-glucopyranoside	AGRAWAL, 1989

Flavonas da *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira

4.3- Atividade antiulcerogênica de extratos e frações da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*

A seguir são apresentados os resultados obtidos com extratos e frações de ambas as espécies estudadas em todos os modelos experimentais de lesões gástricas.

4.3.1- HCl/etanol em camundongos

Os resultados obtidos para a espécie *Syngonanthus bisulcatus* no modelo de HCl/etanol demonstraram que lansoprazol (30 mg/kg) e o EEOH nas doses de 50, 100 e

250 mg/Kg, inibiram significativamente o aparecimento das lesões em 68, 50, 52 e 48%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Os resultados obtidos nesse mesmo modelo para *Syngonanthus arthrotrichus*, demonstraram que o lansoprazol e o EEOH, nas mesmas doses, também inibiram significativamente o índice ulcerativo em 80, 78, 73 e 64%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Estes dados estão resumidos na tabela 2 (a e b).

Tabela 2- Efeitos da administração oral do lansoprazol e do extrato etanólico (EEOH) obtidos de escapos da *Syngonanthus bisulcatus* (a) e *Syngonanthus arthrotrichus* (b) em úlceras gástricas induzidas por HCl/etanol em camundongos.

Espécies	Tratamento	Dose (mg/kg v.o.)	IU	Inibição (%)
<i>S. bisulcatus</i> (a)	Salina	-	56 ± 7,4	-
	Lansoprazol	30	18 ± 5,8*	68
	EEOH	50	28 ± 2,7*	50
		100	27 ± 3,0*	52
		250	29 ± 6,4*	48
<i>S. arthrotrichus</i> (b)	Salina	-	17 ± 8,3	-
	Lansoprazol	30	3,4 ± 1,0*	80
	EEOH	50	3,7 ± 1,2*	78
		100	4,5 ± 2,3*	73
		250	6,0 ± 2,6*	64

ANOVA $F_{(4,25)} = 43$ para (a) e $F_{(4,27)} = 12$ para (b) ($p < 0,05$), seguido do teste a posteriori de Dunnett * $p < 0,05$.

4.3.2- Etanol em ratos

Os resultados obtidos para a espécie *Syngonanthus bisulcatus*, no modelo de indução de úlcera por etanol, demonstraram que o lansoprazol (30 mg/Kg) e as FRF ou FDF (100 mg/Kg), inibiram significativamente o aparecimento das lesões em 67, 42 e 41%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Os resultados obtidos nesse mesmo modelo

para *Syngonanthus arthrotrichus*, demonstraram que o lansoprazol e as frações, nas mesmas doses, também inibiram significativamente as lesões ulcerativas em 65, 38 e 25%, respectivamente, nas mesmas condições. Esses resultados encontram-se resumidos na tabela 3 (a e b).

Tabela 3- Efeitos da administração oral do lansoprazol e frações ricas (FRF) ou deficientes (FDF) em flavonóides obtidos da *Syngonanthus bisulcatus* (a) e *Syngonanthus arthrotrichus* (b) em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos.

Espécies	Tratamento	Dose (mg/kg v.o.)	IU	Inibição (%)
<i>S. bisulcatus</i> (a)	Salina	-	81 ± 14	-
	Lansoprazol	30	27 ± 6,8*	67
	FRF	100	47 ± 9,5*	42
	FDF	100	48 ± 13*	41
<i>S. arthrotrichus</i> (b)	Salina	-	77 ± 13	-
	Lansoprazol	30	27 ± 6,8**	65
	FRF	100	48 ± 13,2**	38
	FDF	100	58 ± 7,4*	25

ANOVA : F_(3,25) = 30 para (a) e F_(3,24) = 31 para (b), (p<0,05), seguido do teste a posteriori de Dunnett *p<0,05 e **p<0,01.

4.3.3- Estresse por imobilização e frio em camundongos

No modelo de úlcera gástrica induzida por estresse (imobilização e frio) os resultados demonstraram que a cimetidina (100 mg/Kg) e o EEOH (100 e 250 mg/kg) obtido da *S. bisulcatus*, protegeram significativamente a mucosa gástrica com 86, 73 e 65% de inibição do IU. Em outro experimento, a cimetidina e frações FRF ou FDF (100 mg/Kg) obtidos da mesma espécie, também causaram proteção significativa com 69, 63 e 59% de inibição do IU, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Esses resultados estão resumidos na tabela 4A.

Tabela 4A- Efeitos da administração oral da cimetidina, extrato etanólico e das frações ricas (FRF) ou deficientes (FDF) em flavonóides obtidos da *Syngonanthus bisulcatus* em úlceras induzidas por estresse em camundongos.

Tratamento	Dose (mg/kg v.o.)	IU	Inibição %
Salina	-	27 ± 5,4	-
Cimetidina	100	3,8 ± 1,7 *	86
EEOH	50	31 ± 18	-
	100	7,3 ± 2,3 *	73
	250	9,5 ± 6,3*	65
Salina	-	27 ± 6,6	-
Cimetidina	100	8,4 ± 3,0**	69
FRF	100	10 ± 3,4**	63
FDF	100	11 ± 4,8**	59

ANOVA: $F_{(4,25)} = 12$ para EEOH e $F_{(3,28)} = 26$ para FRF e FDF ($p < 0,05$); seguido de teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

Ao avaliar a espécie *S. arthrotrichus* foi observado que a cimetidina (100 mg/kg) e o EEOH (50, 100 e 250 mg/Kg) inibiram significativamente os danos lesivos em 73, 62, 68 e 68%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Em outro experimento em que foram avaliados os efeitos das frações, foi constatado que a cimetidina e as frações FRF ou FDF (100 mg/Kg) também inibiram significativamente os danos lesivos em 60, 51 e 47%, respectivamente. Os dois grupos de resultados foram sumarizados na tabela 4B.

Tabela 4B- Efeitos da administração oral da cimetidina, extrato etanólico e das frações ricas (FRF) ou deficientes (FDF) em flavonóides obtidos da *Syngonanthus arthrotrichus* em úlceras induzidas por estresse em camundongos.

Tratamento	Dose (mg/kg v.o.)	IU	Inibição (%)
Salina	-	24 ± 5,9	-
Cimetidina	100	6,5 ± 2,1**	73
EEOH	50	9,1 ± 1,8**	62
	100	7,7 ± 2,7**	68
	250	7,6 ± 2,9**	68
Salina	-	25 ± 9,0	-
Cimetidina	100	10 ± 3,3**	60
FRF	100	12 ± 3,6**	51
FDF	100	13 ± 5,3*	47

ANOVA: $F_{(4,28)} = 31$ para EEOH e $F_{(3,28)} = 10,4$ para FRF e FDF ($p < 0,05$); seguido do teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.3.4- Antiinflamatório não-esteroidal associado a um parassimpatomimético (indometacina/betanecol)

Nos resultados obtidos no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina e betanecol foi demonstrado que a cimetidina e o EEOH (50, 100 e 250 mg/Kg) obtido da *S. bisulcatus* protegeram significativamente a mucosa gástrica com inibições de 63, 51, 52 e 49%, respectivamente. No experimento em que se avaliou as frações, foi observado que a cimetidina e frações FRF ou FDF (100 mg/Kg) obtidos da mesma espécie também causaram proteção significativa com 55, 46 e 31%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle, conforme resultados demonstrados na tabela 5A.

Tabela 5A- Efeitos da cimetidina, extratos etanólicos e frações ricas (FRF) ou deficientes (FDF) em flavonóides obtidos da *Syngonanthus bisulcatus* em modelo de úlcera induzida por indometacina e betanecol em camundongos

Tratamento	Dose (mg/kg v.o.)	IU	% Inibição
Salina	-	13,7 ± 3,0	-
Cimetidina	100	5,0 ± 3,0**	63
EEOH	50	6,7 ± 2,3**	51
	100	6,7 ± 1,6**	52
	250	7,0 ± 2,1**	49
Salina	-	17 ± 6,0	-
Cimetidina	100	7,8 ± 4,8**	55
FRF	100	9,3 ± 1,9*	46
FDF	100	12 ± 2,6*	31

ANOVA $F_{(4,25)} = 11$ para EEOH $F_{(3,30)} = 8.1$ para FRF e FDF ($p < 0,05$) seguido de teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

Em relação a espécie *S. arthrotrichus* foi observado que a cimetidina e o EEOH (100 e 250 mg/Kg) inibiram significativamente os danos lesivos com 74, 55 e 29%, respectivamente, em relação ao grupo controle. No ensaio em que se avaliou o efeito das frações foi observado que a cimetidina e frações FRF ou FDF (100 mg/Kg) também inibiram significativamente os danos lesivos com 54, 36 e 45%, respectivamente, também em relação ao controle negativo. Todos esses dados encontram-se resumidos na tabela 5B.

Tabela 5B- Efeitos da cimetidina, extratos etanólicos e frações ricas (FRF) ou deficientes (FDF) em flavonóides obtidos da *Syngonanthus arthrotrichus* em modelo de úlcera induzida por indometacina e betanecol em camundongos

Tratamento	Dose (mg/kg v.o.)	IU	Inibição (%)
Salina	-	17 ± 3,3	-
Cimetidina	100	4,5 ± 1,4**	74
EEOH	50	16 ± 3,3	6
	100	7,6 ± 3,4**	55
	250	12 ± 2,4*	29
Salina	-	17 ± 6,0	-
Cimetidina	100	7,8 ± 4,8**	54
FRF	100	11 ± 3,0*	36
FDF	100	9,4 ± 3,2*	45

ANOVA F_(4,27) = 28 para EEOH; F_(3,27) = 3,8 para FRF e FDF (p<0,05) seguido do teste de Dunnet *p<0,05 e **p<0,01.

4.3.5- Determinação dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de animais submetidos à ligadura do piloro

No modelo de ligadura do piloro foram avaliados os parâmetros bioquímicos do suco gástrico de camundongos, pH, volume da secreção gástrica e concentração de ácido total após a administração intraduodenal de cimetidina (100 mg/Kg) e frações FRF ou FDF (100 mg/Kg) obtidas da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*.

Com base nos resultados foi possível observar que nos ensaios envolvendo a *S. bisulcatus*, ocorreu uma redução na produção de ácidos pela mucosa para a cimetidina e FRF; isso pode ser observado através do aumento do pH e diminuição da acidez total. No entanto, o volume gástrico foi alterado apenas para a cimetidina. FDF não apresentou nenhuma modificação nos parâmetros avaliados de acordo com os dados mostrados na tabela 6A.

Tabela 6A- Efeitos da administração intraduodenal da cimetidina, frações ricas (FRF) ou deficientes em flavonóides (FDF) obtidas da *S. bisulcatus* nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica de camundongos submetidos à ligadura do piloro.

Tratamento	Dose (mg/kg)	pH (unidades)	Volume Gástrico (mg)	Ácido Total (mEq/ml/4h)
Salina	-	2,3 ± 0,48	284 ± 50	12 ± 4,9
Cimetidina	100	4 ± 0,81**	198 ± 58*	6,6 ± 1,3*
FRF	100	3,7 ± 0,83**	239 ± 86	7,8 ± 2,1*
FDF	100	2,3 ± 0,5	255 ± 99	13 ± 2,6

ANOVA: $F_{(3,33)} = 17,3$ para pH, $F_{(3,33)} = 2,25$ para volume gástrico e $F_{(3,33)} = 10$ para ácido total ($p < 0,05$), seguido de teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Nos ensaios para *S. arthrotrichus* observou-se uma redução da acidez constatada através de um aumento significativo do pH para a cimetidina e FRF, além de diminuição da acidez total e do volume gástrico para a cimetidina e FRF. No entanto, FDF mais uma vez deixou inalterados os parâmetros analisados. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 6B.

Tabela 6B- Efeitos da administração intraduodenal da cimetidina, frações ricas (FRF) ou deficientes em flavonóides (FDF) obtidas da *S. arthrotrichus* nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica de camundongos submetidos a ligadura do piloro

Tratamento	Dose (mg/kg)	pH (unidades)	Volume Gástrico (mg)	Ácido Total (mEq/ml/4h)
Salina	-	2,3 ± 0,48	284 ± 50	11,7 ± 4,4
Cimetidina	100	4 ± 0,82**	179 ± 49**	6,3 ± 1,34**
FRF	100	3,5 ± 0,53**	184 ± 32*	6,5 ± 1,95**
FDF	100	2,14 ± 0,38	249 ± 77	10,7 ± 3,5

ANOVA: $F_{(3,31)} = 21$ para pH, $F_{(3,31)} = 7,58$ para volume gástrico e $F_{(3,31)} = 8,89$ para ácido total ($p < 0,05$) seguido de teste a posteriori de Dunnet com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.3.6- Ácido acético em ratos

A atividade curativa das frações FRF e FDF obtidas de escapos da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*, na dose de 100 mg/Kg administradas via oral durante 14 dias consecutivos, foi avaliada em lesões induzidas por ácido acético 30%, na mucosa gástrica de ratos. Os dados (Tabela 7a) demonstraram que a área média de lesão gástrica nos estômagos dos animais controles, 14 dias após a indução da úlcera pelo ácido acético foi de 75 mm². Nos estômagos dos animais tratados com cimetidina, FRF e FDF da *S. bisulcatus* (a) a área média de lesão foi de 22, 49 e 67 mm² (71, 35 e 11% respectivamente, de taxa de cura da lesão gástrica).

Quando analisamos os dados (Tabela 7b) referentes aos estômagos dos animais tratados com FRF e FDF da *S. arthrotrichus* (b) tendo como parâmetro os mesmos grupos controles observa-se que a área média da lesão é de 42 e 65 mm² ou o equivalente a 44 e 13%, respectivamente, de redução da lesão gástrica.

Tabela 7- Área da lesão ulcerativa induzida pela administração de ácido acético 30% na mucosa gástrica de ratos após o tratamento com FRF ou FDF obtidas da *S. bisulcatus* (a) e *S. arthrotrichus* (b), por via oral, durante 14 dias.

Espécie	Tratamento	Dose (mg/kg)	ALU (mm ²)	Taxa de Cura (%)
<i>S. bisulcatus</i> (a)	Salina	-	75 ± 8,6	-
	Cimetidina	100	22 ± 2,5**	71
	FRF	100	49 ± 4,3*	35
	FDF	100	67 ± 25	11
<i>S. arthrotrichus</i> (b)	Salina	-	75 ± 8,6	-
	Cimetidina	100	22 ± 2,5**	71
	FRF	100	42 ± 1,6*	44
	FDF	100	65 ± 7,0	13

ANOVA F_(3,20) = 19 para (a) e F_(3,20) = 103 para (b), (p<0,05); seguido de teste a posteriori de Dunnett *p< 0,05 e **p<0,01.

4.3.7- Isquemia e reperfusão em ratos

A isquemia ocasionada a diferentes grupos de animais por oclusão da artéria celiaca durante 30 minutos, seguida de 60 minutos de reperfusão, produziu lesões ulcerativas na mucosa gástrica de ratos. De acordo com os dados apresentados na tabela 8 após o pré-tratamento dos animais com FRF de *S. bisulcatus* (a) e *S. arthrotrichus* (b) ocorreu uma redução significativa do índice ulcerativo quando comparado ao grupo controle, com 76 e 72% de inibição, respectivamente.

Tabela 8- Efeitos da administração oral das FRF (100 mg/kg), obtidas da *S. bisulcatus* (a) e *S. arthrotrichus* (b), em modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão em ratos.

Espécies	Tratamento	Área (mm ²)	inibição %
<i>S. bisulcatus</i> (a)	Normal	-	-
	Salina	181 ± 26	0
	Sham	156 ± 29	14
	FRF	41 ± 25*	76
<i>S. arthrotrichus</i> (b)	Normal	-	-
	Salina	181 ± 26	0
	Sham	156 ± 29	14
	FRF	52 ± 15*	72

ANOVA: $F_{(2,21)} = 80$ para IU para (a) e $F_{(2,21)} = 65$ para (b), ($p < 0,05$); com teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$.

4.4- Determinação do Mecanismo de Ação

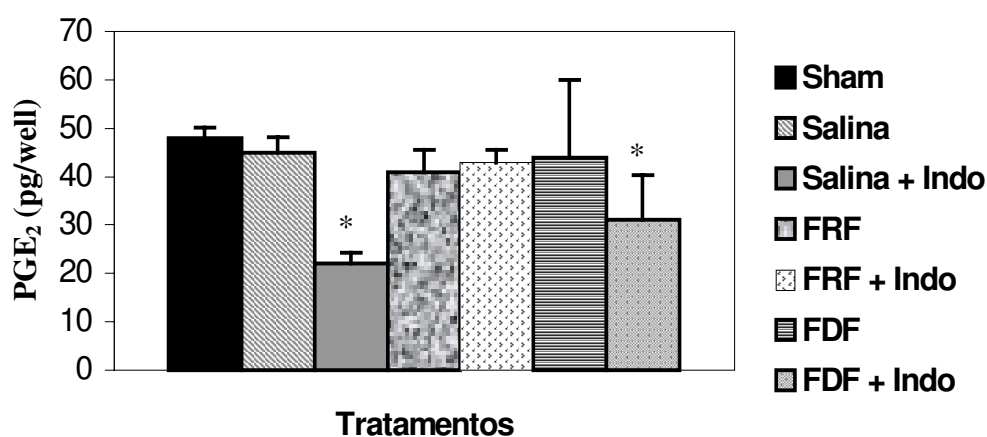
4.4.1- Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos

O comportamento das frações ricas e deficientes em flavonóides frente à síntese de prostaglandina, na presença ou ausência de antiinflamatórios não-esteroidais, foi avaliada para *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*.

Com base nos dados, resumidos na figura 5A, foi observado que para *S. bisulcatus* FRF, FRF + Indometacina e FDF não interferiram nos níveis de PGE_2 quando estes foram

comparados ao grupo controle. Contudo, a associação de FDF + Indometacina reduziu significativamente os níveis de PGE₂ em relação aos grupos sham ou salina. A indometacina, como esperado, reduziu em cerca de 50% a produção de PGE₂ nesse modelo.

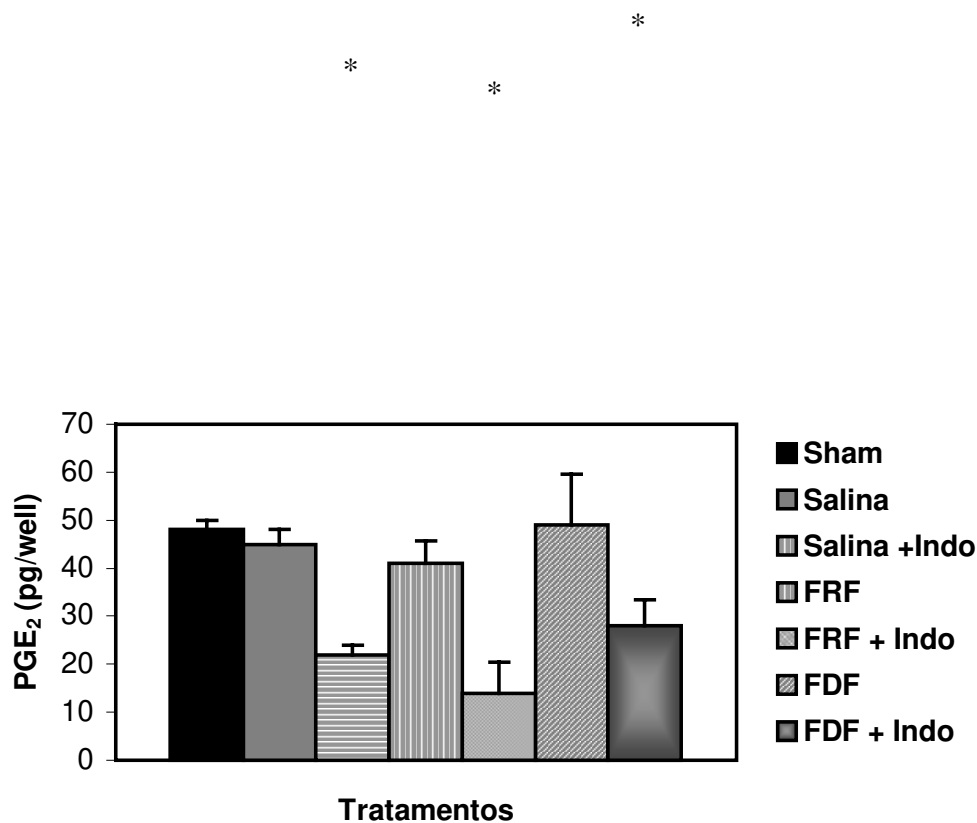
Figura 5A- Efeitos da administração oral de frações ricas (FRF) ou deficientes em flavonóides (FDF) da *Syngonanthus bisulcatus* e da injeção subcutânea da indometacina (Indo) na síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) em ratos.



ANOVA: $F_{(6,42)} = 10,5$ para FRF e FDF ($p < 0,05$) seguido de teste a posteriori de Dunnet
 * $p < 0,05$

Nos dados da *S. arthrotrichus*, resumidos na figura 5B, FRF + Indometacina e FDF + Indometacina reduziram a síntese de PGE₂, comparados aos controles sham e salina. Nenhum dos tratamentos realizados com as frações obtidas de ambas as espécies foram eficazes em elevar de forma significativa os níveis de PGE₂ da mucosa gástrica.

Figura 5B – Efeitos da administração oral de frações ricas (FRF) ou deficientes em flavonóides (FDF) da *Syngonanthus arthrotrichus* e da injeção subcutânea da indometacina (Indo) na síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2) em ratos.



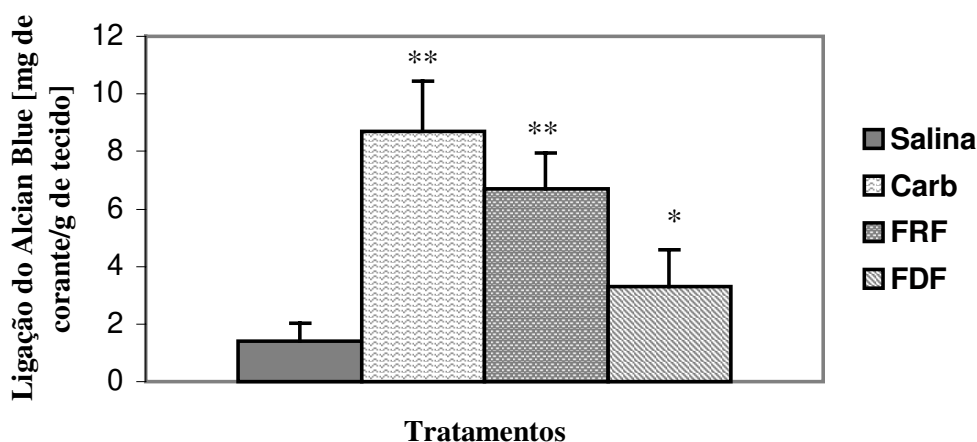
ANOVA: $F_{(6,42)} = 41$ para FRF e FDF $p < 0,05$ seguido de teste a posteriori de Dunnet
 * $p < 0,05$

4.4.2- Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica de ratos

Neste experimento foi avaliada a capacidade das FRF e FDF, obtidas das espécies em estudo, em aumentar o muco aderido a mucosa gástrica de ratos submetidos à ligadura do piloro, quando comparado ao grupo controle.

De acordo com dados obtidos nos experimentos da *S. bisulcatus* (Figura 6A), todos os tratamentos realizados, por via oral carbenoxolona (200 mg/Kg), FRF e FDF (100 mg/Kg), aumentaram significativamente o muco aderido à mucosa gástrica quando comparados ao grupo controle.

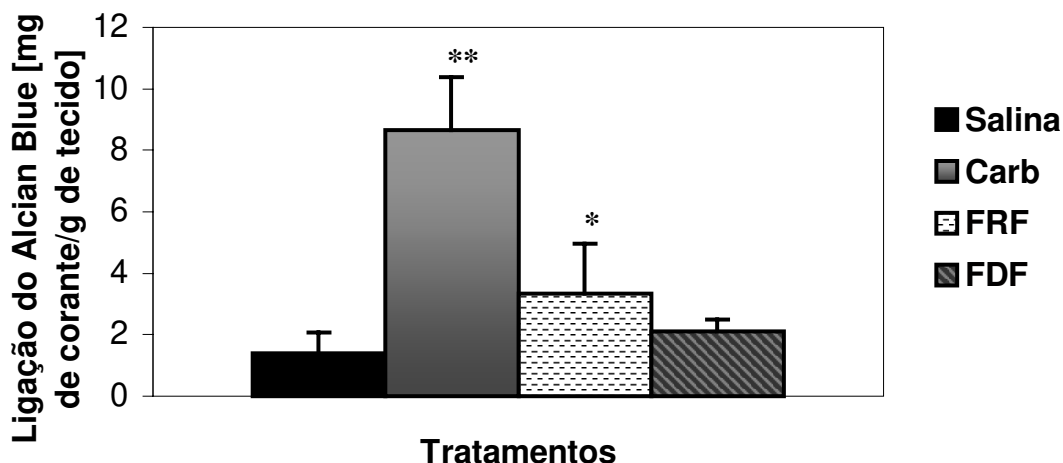
Figure 6A- Efeitos da administração oral da carbenoxolona (Carb) e de frações ricas (FRF) ou deficientes em flavonóides (FDF) da *Syngonanthus bisulcatus* em animais submetidos à ligadura do piloro.



ANOVA: $F_{(3,24)} = 45$ para FRF e FDF ($p < 0,05$) seguido de teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

No experimento da *S. arthrotrichus*, cujos resultados estão resumidos na figura 6B, carbenoxolona e FRF aumentaram significativamente a quantidade de muco aderido; entretanto, o aumento induzido por FDF não se mostrou significativo quando comparado ao controle negativo.

Figura 6B- Efeitos da administração oral da carbenoxolona (Carb) e de frações ricas (FRF) ou deficientes em flavonóides (FDF) da *S. arthrotrichus* em animais submetidos à ligadura do piloro



ANOVA: $F_{(3,21)} = 45$ para FRF e FDF ($p < 0,05$) seguido de teste a posteriori de Dunnett * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.4.3- Grupamentos sulfidrilas não proteicos (SH) na citoproteção.

De acordo com os resultados apresentados para os experimentos realizados com a *S. bisulcatus* (tabela 9A), foi observado que ocorreu aumento significativo no índice ulcerativo para N-etilmaleimida (10 mg/kg) um bloqueador dos grupamentos sulfidrilas quando comparado ao grupo controle. Na figura 9A, a N-etilmaleimida agrava as lesões em relação ao controle (83 ± 14 , 27 ± 8 respectivamente), ou seja, ocorre uma redução dos níveis de SH. FRF e FDF, embora ainda permitam o agravamento das lesões pela N-etilmaleimida, oferecem uma certa proteção (56 ± 11 , 69 ± 17 , 83 ± 14) quando comparado ao grupo controle.

Tabela 9A- Efeitos da administração oral de frações ricas (FRF) e deficientes em flavonóides (FDF) da *S. bisulcatus*, em modelo de úlcera induzido por HCl/etanol em camundongos pré-tratados com N-etilmaleimida.

Tratamento	Dose (mg/kg)	IU	Aumento da lesão (%)
Salina (s.c) + Salina (v.o.)	-	27 ± 8	0
N-etilmaleimida (s.c) + Salina (v.o.)	10	83 ± 14*	207
N-etilmaleimida (s.c) + FRF (v.o.)	100	56 ± 11*	107
N-etilmaleimida (s.c) + FDF (v.o.)	100	69 ± 17*	155

ANOVA $F_{(3,30)} = 31$ para FRF e FDF ($p < 0,05$) seguido de teste a posteriori de Dunnet com $*p < 0,01$

Do mesmo modo, para a *S. arthrotrichus* (tabela 9B) também ocorreu redução dos níveis de SH com aumento significativo do índice ulcerativo em relação ao grupo controle (76 ± 21 , 27 ± 8), respectivamente. FRF e FDF ofereceram uma certa proteção contra os efeitos do bloqueador de grupamentos sulfidrilas (53 ± 11 , 56 ± 13 respectivamente).

Tabela 9B: Efeitos da administração oral de frações ricas (FRF) e deficientes em flavonóides (FDF) da *S. arthrotrichus* em modelo de úlcera induzido por HCl/etanol em camundongos pré-tratados com N-etilmaleimida.

Tratamento	Dose (mg/kg)	IU	Aumento de lesão (%)
Salina (s.c) + Salina (v.o.)	-	27 ± 8	-
N-etilmaleimida (s.c) + Salina (v.o.)	10	76 ± 21*	181
N-etilmaleimida (s.c) + FRF (v.o.)	100	53 ± 11*	96
N-etilmaleimida (s.c) + FDF (v.o.)	100	56 ± 13*	107

ANOVA valor de F : $F_{(3,30)} = 18$ ($p < 0,05$) seguido do teste a posteriori de Dunnet $*p < 0,01$.

4.4.4-Óxido nítrico na citoproteção

Os resultados apresentados na tabela 10A, referentes a *S. bisulcatus*, mostraram que ocorreu aumento significativo do índice ulcerativo nos tratamentos com L-NAME (bloqueador da NO-sintase) FRF (60 ± 14 ; $32 \pm 6,3$ respectivamente) com consequente redução da proteção da mucosa. A FRF apresentou um agravamento menor quando comparado ao controle positivo o que representa proteção por parte dessa fração. FDF, no entanto, impediu o agravamento das lesões produzidas pelo L-NAME quando comparado ao controle ($20 \pm 3,5$; $16 \pm 5,7$).

Table 10A: Efeitos da administração oral das FRF e FDF da *S. bisulcatus* no modelo de úlcera induzida por etanol/HCl com administração prévia de N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME).

Tratamento	Dose (mg/Kg)	IU	Aumento da lesão %
Salina (i.v) + Salina (v.o.)	0	$16 \pm 5,7$	-
L-NAME (i.v.)+ Salina (v.o.)	10	$60 \pm 14^{**}$	275
L-NAME (i.v.)+ FRF (v.o.)	100	$32 \pm 6,3^*$	100
L-NAME (i.v.)+ FDF (v.o.)	100	$20 \pm 3,5$	25

ANOVA com valor de $F_{(3,24)} = 31$ ($p < 0,05$) seguido de teste a posteriori de Dunnet com

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

Na análise da tabela 10B, referente a *S. arthrotrichus*, também foi observado aumento significativo do índice ulcerativo de L-NAME em relação ao grupo controle (59 ± 15 , $17 \pm 5,5$ respectivamente) o que também representa agravamento das lesões induzidas pelo HCl/etanol ou redução da proteção da mucosa gástrica. Foi possível observar, entretanto, que o aumento do IU na presença de FRF foi quase duas vezes menor que aquele obtido na ausência dessa fração, o que representa proteção da mucosa gástrica ($39 \pm$

5,4, 59 ± 15 , respectivamente). Por outro lado, a FDF impediu completamente o agravamento das lesões induzidas pelo L-NAME ($22 \pm 1,9$, 59 ± 15 , respectivamente), quando comparados ao grupo controle ($17 \pm 5,5$).

Table 10B: Efeitos da administração oral das FRF ou FDF da *S. arthrotrichus* em modelo de úlcera induzida por HCl/etanol com administração prévia de N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME).

Tratamento	Dose (mg/Kg)	IU	Aumento (%)
Salina (i.v) + Salina (v.o.)	-	$17 \pm 5,5$	-
L-NAME (i.v.)+ Salina (v.o.)	10	$59 \pm 15^*$	247
L-NAME (i.v.)+ FRF (v.o.)	100	$39 \pm 5,4^*$	129
L-NAME (i.v.)+ FDF (v.o.)	100	$22 \pm 1,9$	29

ANOVA com valor de $F_{(3,24)} = 37$ ($p < 0,05$) seguido de teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$

4.4.5- Níveis séricos de somatostatina e gastrina

Conforme resultados apresentados na Tabela 11 ocorreu aumento significativo nos níveis séricos de somatostatina em animais pré-tratados com FRF da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*, quando os mesmos foram comparados ao grupo controle. Em contrapartida, foi possível observar que ocorreu processo inverso em relação à gastrina, ou seja, os animais pré-tratados com essas mesmas frações apresentaram redução significativa nos níveis séricos de gastrina, para as frações das duas espécies.

Tabela 11- Efeitos da administração oral de FRF da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus* nos níveis séricos de somatostatina e gastrina da mucosa gástrica, após indução de úlcera por etanol.

Grupos	Somatostatina (pmol/L)	Gastrina (μU/mL)
Sham	21 ± 1,5	334 ± 15
Salina	20 ± 7,5	349 ± 22
Lansoprazol	88 ± 22*	47 ± 7,1*
FRF <i>S. bisulcatus</i>	82 ± 8,2*	76 ± 9,3*
FRF <i>S. arthrotrichus</i>	77 ± 17*	59 ± 20*

Anova $F_{(4,16)} = 22$ para somatostatina e $F_{(4,16)} = 317$ para gastrina, seguido de teste a posteriori de Dunnet * $p < 0,01$

4.4.6- Peroxidação lipídica em homogenato de estômago

Neste experimento foram avaliadas a capacidade antioxidante das frações ricas em flavonóides obtidas de escapos da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*. Os resultados obtidos nos ensaios de peroxidação lipídica, em animais pré-tratados com FRF de *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*, encontram-se expressos na Tabela 12. Verificou-se uma redução significativa da peroxidação lipídica com 59 e 56% de inibição, respectivamente, para ambas as espécies quando esses valores foram comparados aos do grupo controle. Essa redução de peroxidação caracteriza uma inibição da ação ulcerativa dos agentes causadores da peroxidação lipídica na mucosa gástrica.

Tabela 12- Efeitos das frações ricas em flavonóides da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus* sobre os níveis de lipoperóxido (nmol TBARS/mg proteína x 10⁻³) na mucosa gástrica de animais submetidos à isquemia e reperfusão.

Tratamento	Peroxidação Lipídica (TBARS/mg proteínas x 10 ⁻³)	Inibição (%)
Salina	115 ± 8,9	-
Sham	98 ± 6,7*	15
Normal	49 ± 8,3**	57
FRF- <i>S. bisulcatus</i>	47 ± 8,1**	59
FRF- <i>S. arthrotrichus</i>	51 ± 6,6**	56

ANOVA F_(4,35)= 136 (p<0,05), seguido de teste a posteriori de Dunnett *p<0,05 e **p<0,01.

4.4.5- Grupamentos tióis em homogenato de estômago de rato

Neste experimento foi avaliada a capacidade de proteção da mucosa gástrica induzida pela concentração total de tióis em animais pré-tratados com frações ricas em flavonóides (FRF 100 mg/kg) obtidas de escapos da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*. Os resultados estão expressos na tabela 13 e mostram aumentos significativos de 61 e 84%, respectivamente, para FRF de *S. bisulcatus* e de *S. arthrotrichus*, na concentração total de tióis quando comparados aos valores do grupo controle. O aumento na concentração total de tióis caracteriza aumento da atividade protetora da mucosa.

Tabela 13: Efeitos das frações ricas em flavonóides (FRF) obtidas de escapos da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus* sobre a concentração total de tióis na mucosa gástrica de ratos submetidos à isquemia e reperfusão.

Tratamentos	Tióis Totais ($\mu\text{mol/mg}$ proteínas)	Aumento (%)
Salina	$13 \pm 2,7$	-
Sham	$15 \pm 5,9$	15
Normal	$31 \pm 7,2^{**}$	138
FRF- <i>S. bisulcatus</i>	$21 \pm 6,7^*$	61
FRF- <i>S. arthrotrichus</i>	$24 \pm 4,2^{**}$	84

ANOVA $F_{(4,45)} = 16$ $p < 0,05$, seguido de teste a posteriori de Dunnett $^*p < 0,05$ e $^{**}p < 0,01$.

4.5- Ensaios citotóxicos em células de mamíferos

a) Cultura de fibroblastos V79

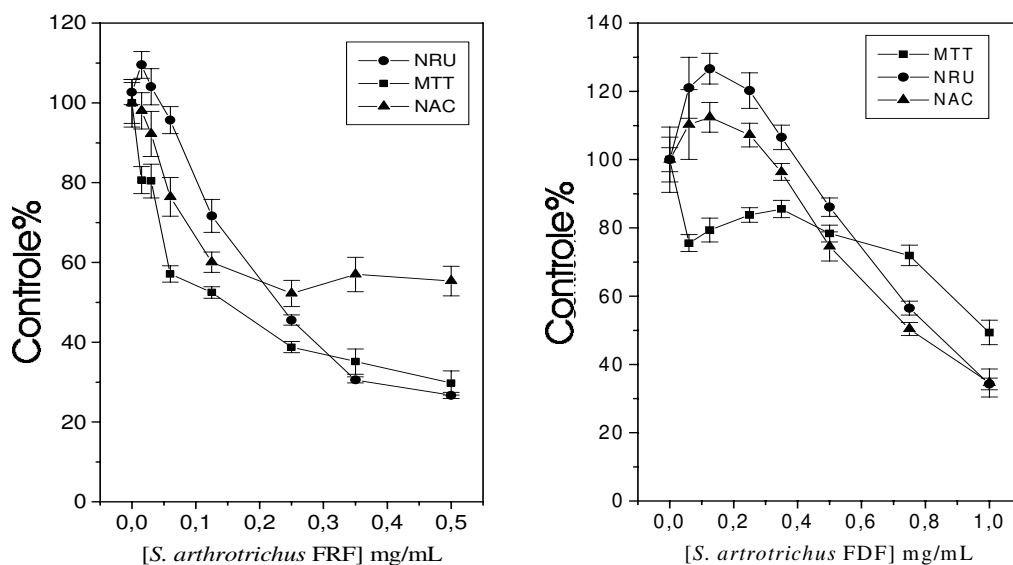
Os efeitos citotóxicos das FRF e FDF obtidas dos escapos da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus* foram medidos por ensaios de conteúdo de ácido nucleico (CAN), redução enzimática do sal brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e incorporação do corante hidrocloreto de 3-amino-7-dimetilamino-2metilfenazida - vermelho neutro (VN) em células V79. Esses testes avaliam diferentes funções ou organelas celulares. O MTT assegura o correto funcionamento mitocondrial através da atividade redutora de dehidrogenases; o VN avalia a função lisossomal e o CAN avalia, indiretamente, o número de células viáveis.

Os resultados indicam que o tempo de exposição (24 h) foi suficiente para produzir o efeito dose-dependente expresso nas Figuras 7A e 7B referentes as FRF e FDF da *Syngonathus arthrotrichus* e 8A e 8B referentes a FRF e FDF da *Syngonathus bisulcatus*, causando perda de adesão celular, com consequente morte celular das células V79.

A figura 7A mostra que FRF apresentou para o CAN uma $IC_{50} = 0,50$ mg/ml. Essa fração, quando testada no método de vermelho neutro (VN) apresentou uma diminuição da

viabilidade celular ($IC_{50}= 0,22$ mg/ml) e uma maior citotoxicidade avaliada no ensaio para MTT ($IC_{50}= 0,15$ mg/ml). Entretanto, a figura 7B mostra que a FDF apresentou um efeito citotóxico similar determinado pelo CAN e VN com $IC_{50}= 0,8$ mg/ml, ao passo que no teste de redução do MTT apresentou um efeito citotóxico menor com $IC_{50}=0,98$ mg/ml. Com isso, foi possível observar que a FDF da *S. arthrotrichus* afetou a redução do MTT em uma IC_{50} para FRF de 0,98 e 0,15 mg/ml, respectivamente, ou seja, uma concentração seis vezes menor.

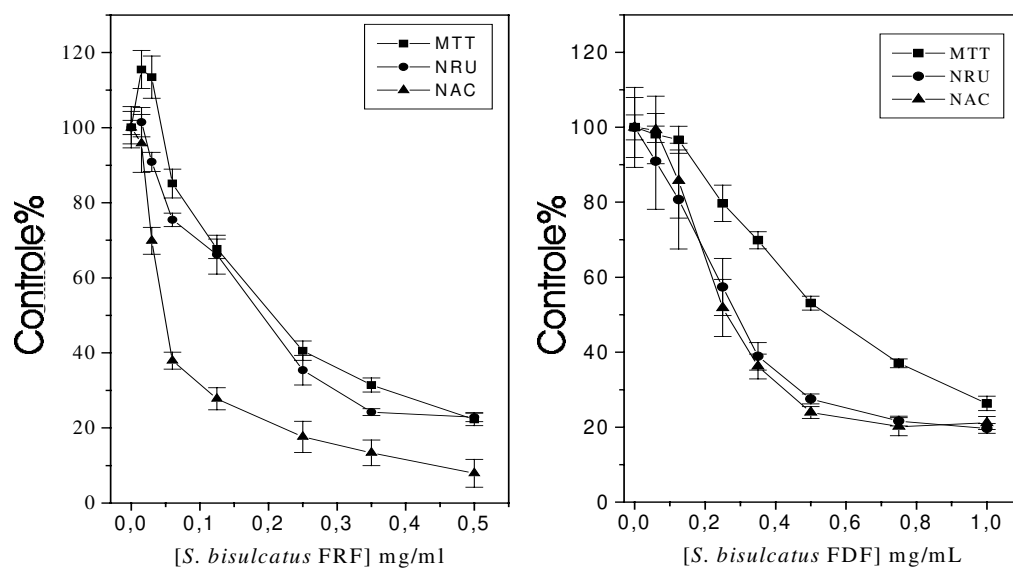
Figura 7A e 7B



As Figuras 8A e 8B mostram o efeito tóxico da FRF e FDF obtidas da *S. bisulcatus* nas células V79. A FRF induziu um efeito citotóxico similar nas células avaliadas nos ensaios de MTT e VN ($IC_{50}= 0,2$ mg/ml). Contudo, FRF mostrou um elevado efeito citotóxico avaliado para CAN ($IC_{50} = 0,05$ mg/ml) quando comparado a outros ensaios de viabilidade celular. As FDF mostraram a mesma toxicidade avaliada pelo VN e CAN (IC_{50}

= 0,28 mg/ml) e menor citotoxicidade determinada pelos testes de MTT (IC_{50} = 0,52 mg/ml).

Figura 8A e 8B



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

O ensaio fitoquímico, realizado nos extratos obtidos a partir dos escapos da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*, revelou a presença de substâncias flavonoídicas e compostos fenólicos. A análise cromatográfica dos mesmos possibilitou a elucidação da estrutura do composto majoritário luteolina e de seus derivados glicosilados. Estudos anteriores mostram que da espécie *S. bisulcatus* foram isoladas a isovitexina, lutionarina, 5,6,3',4'-tetrahidroxi-7-O- β -D-glucopiranosilflavona e luteolina (COELHO, 2000). Da *S. arthrotrichus* foram isoladas além da luteolina, apigenina e luteolina-6- β -D-glicopiranosideo (RINALDI, 2000).

O desenvolvimento das úlceras gastroduodenais é influenciado por vários agentes agressores e defensores da mucosa gástrica, como secreção ácida-péptica, barreira formada pela secreção de muco e prostaglandinas, fluxo sanguíneo, regeneração celular que ocorre graças, principalmente, ao fator de crescimento epidermal (REPPETTO e LLESUY, 2002).

Estudos com plantas com finalidade terapêutica têm sido desenvolvidos em todo o mundo. A seleção destes vegetais, muitas vezes, é feita a partir do conhecimento tradicional com a perspectiva de descobrir uma molécula ativa capaz de prevenir ou tratar diferentes

tipos de patologias, como as doenças ulcerativas do trato gastrointestinal (GURBUZ et al., 2000; RATES, 2001).

No mercado nacional existem diversos produtos farmacêuticos utilizados no tratamento das doenças ulcerativas; entretanto, não há nenhum fármaco que apresente 100% de eficácia e que garanta a inexistência de efeitos adversos e impeça a recidiva das lesões.

Nesta pesquisa avaliamos o efeito farmacológico dos extratos etanólicos (EEOH) e das frações ricas (FRF) e deficientes (FDF) em flavonóides, obtidos de escapos das espécies *Syngonathus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*. Um dos objetivos gerais foi avaliar as espécies citadas quanto à atividade antiulcerogênica em diferentes modelos de indução de úlcera aguda e subcrônica, em camundongos e ratos; os modelos selecionados foram aqueles que mimetizam a úlcera gástrica em seres humanos, as quais instalam-se na mucosa através de diferentes mecanismos.

Em geral, um extrato bruto vegetal é testado na dose de 1000 mg/Kg, em triagens farmacológicas, como preconizado por Souza Brito (1994). Entretanto, após análise prévia com diferentes doses dos EEOH das duas espécies em estudo, foi estabelecido que as doses de 50, 100 e 250 mg/kg seriam utilizadas como padrão para o estudo dose-efeito por terem apresentado resultados significativos. A utilização de doses maiores não aumentava proporcionalmente os efeitos obtidos. Após ensaios realizados com as frações ricas (FRF) e deficientes (FDF) em flavonóides em diferentes doses, foi definida a dose de 100 mg/kg como a melhor dose para a realização dos experimentos de indução de úlcera e, conseqüentemente, para a elucidação dos prováveis mecanismos de ação.

Mizui e Doutechi (1981), relatam que a administração de uma solução de HCl/etanol, em camundongos, produz lesões necrotizantes na mucosa gástrica,

principalmente devido à debilidade da camada protetora de muco e à exacerbação da secreção ácida-péptica. Esses danos podem ser devidos à ação direta desse agente lesivo sobre o epitélio gástrico causando estresse oxidativo, o que leva a peroxidação lipídica e fragmentação do DNA; conseqüentemente surgem lesões ulcerativas, na mucosa (BAGCHI et al., 1999; GONÇALES et al., 2001).

De acordo com os resultados obtidos nesse modelo experimental foi possível observar que os EEOH obtidos das espécies em estudo, nas doses de 50, 100 e 250 mg/kg, protegeram significativamente a mucosa gástrica contra a ação lesiva dos agentes irritantes (solução HCl 0,3M/etanol 60%) em camundongos, quando os dados foram comparados a aqueles do grupo controle negativo. No entanto, os efeitos dos EEOH não se mostraram dose-dependentes.

Por outro lado, a ingesta acentuada de etanol resulta em danos gástricos caracterizados por edema, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias. O etanol também solubiliza os constituintes do muco no estômago, aumenta a liberação de pepsina, desestabiliza mastócitos, induzindo a liberação de histamina, que reduz o fluxo sangüíneo dos tecidos injuriados e diminui o mecanismo de defesa gástrico (LAINE e WEINSTEIN, 1988; GUSLANDI, 1987; SZABO, 1987; KINOSHITA et al., 1995).

As frações ricas (FRF) e deficientes em flavonóides (FDF) das duas espécies, na dose de 100 mg/kg, também causaram proteção significativa na mucosa gástrica contra a ação lesiva induzida pelo etanol absoluto em ratos. Essa proteção pode significar inibição da secreção ácida gástrica, o que em parte já seria suficiente para reduzir o número de lesões induzidas pelo etanol (MIZUI e DOUTEUCHI, 1981), ou aumento na liberação de substâncias protetoras da mucosa. Essa última ação parece ser mais provável já que as

úlceras induzidas por etanol são inibidas por agentes que estimulam a produção dos fatores defensivos da mucosa, fatores esses semelhantes as prostaglandinas (MORIMOTO et al., 1991).

O modelo de indução de úlcera pelo estresse causado por imobilização e frio é bastante utilizado para avaliar a atividade antiulcerogênica de novas substâncias em animais. Esse tipo de úlcera parece ser mediado por histamina, o que levaria tanto à acentuação da secreção ácida, quanto à redução da produção de muco, além de distúrbios na microcirculação da mucosa e na motilidade, o que também contribui para a depleção do muco. Contudo, úlceras induzidas por estresse podem ser prevenidas, parcialmente ou inteiramente, por vagotomia. A atividade vagal aumentada tem sido sugerida como principal fator da ulceração induzida pelo estresse (GOA e MONK, 1987).

Camundongos pré-tratados com EEOH (100 e 250 mg/Kg) obtidos da *Syngonanthus bisulcatus* e com EEOH (50, 100 e 250 mg/kg) obtido da *Syngonanthus arthrotrichus*, submetidos a estresse por imobilização e frio tiveram significativa proteção de suas mucosas gástricas contra as lesões ulcerativas em todo segmento glandular do estômago. Quando avaliamos as frações ricas (FRF) e deficientes (FDF) em flavonóides das duas espécies, nesse mesmo modelo experimental, observamos que tanto as FRF quanto as FDF protegeram, também de forma significativa, a mucosa gástrica das lesões causadas pelo estresse, em relação ao grupo controle. Esses resultados indicaram que os compostos ativos, presentes nesses extratos, e as frações podem agir, de algum modo, regulando a produção excessiva de ácido gástrico causada pelo estresse; podem ainda, interferir com a ação dos mediadores responsáveis pela secreção ácida aumentada, inibindo sua liberação ou bloqueando seus receptores específicos; por último, podem auxiliar na integridade da mucosa gástrica, aumentando a produção de muco e bicarbonato da mucosa e/ou

restabelecendo a integridade vascular que mantém o fluxo sanguíneo local, o que se constitui em ação gastroprotetora (OATES e HAKKINEN, 1988; LEWIS e HANSON, 1991; EVANS, 1996; PANDOLFINO et al., 2000).

É conhecido que tanto as drogas que inibem a secreção gástrica, quanto aquelas que aumentam os mecanismos de defesa da mucosa gástrica, auxiliam na prevenção do aparecimento de lesões ulcerativas induzidas pelo estresse, porque restabelecem a circulação na mucosa gástrica e modulam ou abolem o estímulo para liberação ácida (LEWIS e HANSON, 1991; HIRSCHOWITZ et al., 1995; BRUNTON, 1996; EVANS, 1996; WOLFE e SACHE, 2000).

Nossos resultados, até aqui obtidos, não apontavam para nenhum mecanismo em especial e, além disso, não havia indicação alguma de que extrato e frações de uma espécie fossem mais ativos que os de outra espécie. Por isso, continuamos a investigação usando agora o modelo de lesões gástricas induzidas por drogas antiinflamatórias.

As drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINES), semelhantes a indometacina, aspirina, piroxicam e diclofenaco, induzem ulcerações gástricas, principalmente por inibição da síntese de prostaglandina (PG), levando à produção de leucotrienos e de outros produtos da via da 5-lipoxigenase (LEVINE, 1971), além de causar hipermotilidade gástrica, desintegração vascular e peroxidação lipídica (TAKEUCHI et al., 1988).

O contato direto da indometacina com a mucosa gástrica potencializa a capacidade de difusão do íon hidrogênio, o que leva à diminuição da resistência da barreira gástrica, além de uma redução do fluxo sanguíneo local (DAJANI e AGRAWAL, 1995).

É reconhecido que a prostaglandina (PG), um importante mediador da inflamação e de outras funções fisiológicas normais, tem um papel vital no estômago, onde mantém o

fluxo sanguíneo, estimula a secreção de bicarbonato e muco, além de regular o “turnover” e o reparo das células da mucosa. A perda da proteção, após inibição da síntese de prostaglandinas, torna o estômago vulnerável aos danos induzidos pelo ácido gástrico (BJORKMAN, 1998; HAYLLAR e BJARNASON, 1995; HAWKINS e HANKS, 2000).

Quando um potente inibidor da síntese de prostaglandina (indometacina) foi utilizado em associação com um agente parassipatomimético (betanecol) lesões ulcerativas na mucosa gástrica de camundongos puderam ser observadas (RAINSFORD, 1987). O pré-tratamento dos animais com EEOH (50, 100 e 250 mg/kg), FRF e FDF (100 mg/kg) da *S. bisulcatus* e EEOH (100 e 250 mg/kg), FRF e FDF (100 mg/kg) da *S. arthotrichus* inibiu significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas induzidas por esta combinação de agentes lesivos. Esses resultados sugeriram um papel citoprotetor para extratos e frações.

Com isso pudemos concluir até aqui que os EEOH, FRF e FDF, de ambas as espécies, inibiram as úlceras gástricas induzidas por agentes que aumentavam os níveis de fatores agressivos relacionados à secreção ácida e também por agentes que aumentavam os fatores defensivos da mucosa.

Deste modo, na tentativa de reforçar os resultados até então obtidos passamos a investigar, através do modelo de ligadura do piloro, a atividade sistêmica das amostras vegetais (FRF e FDF), de ambas as espécies, através da administração intraduodenal. Esta forma de administração pressupõe absorção intestinal evitando o contato direto das substâncias com a mucosa e com o suco gástrico, como acontece com as drogas administradas por via oral. Assim, numa análise bioquímica dos parâmetros do suco gástrico foram investigados os efeitos das frações FRF e FDF, das espécies em estudo, sobre o pH, volume e concentração total de ácido do conteúdo estomacal de animais submetidos à ligadura do piloro. Foi observado um aumento significativo do pH nos

estômagos de animais tratados com FRF com conseqüente diminuição da concentração de H^+ . O volume gástrico se mostrou diminuído para FRF da *S. artrotrichus*. A proteção da mucosa pelo FRF de ambas as espécies provavelmente envolve mecanismo anti-secretório mediado pelos flavonóides existentes nestas frações, os quais estão ausentes nas FDF.

Os resultados obtidos até esse momento, explicaram, ao menos parcialmente, o efeito benéfico das preparações obtidas da *S. bisulcatus* e *S. artrotrichus*, em modelos de úlcera induzidos pelo HCl/etanol, etanol e estresse; porém, o efeito produzido pela indometacina/betanecol necessitava ser melhor investigado. Assim, nosso próximo passo foi avaliar a ação das frações de ambas as espécies sobre os mecanismos citoprotetores, isto é, produção de prostaglandinas E_2 e muco aderido pela a mucosa gástrica.

A ação citoprotetora de substâncias antiulcerogênicas é mediada por prostaglandinas (PG's) endógenas, as quais apresentam um papel importante na integridade e proteção da mucosa contra vários agentes agressivos (MILLER, 1987). As PG's, em especial a PGE_2 e seus análogos, exercem ação protetora contra os danos diretos de agentes necrotizantes gástricos estando, portanto, relacionadas a citoproteção (ROBERT et al., 1979).

Os fatores que podem contribuir para a ação protetora das PG's no estômago incluem a estimulação da produção de muco e da secreção de bicarbonato, manutenção do fluxo sanguíneo durante exposição a um agente irritante, a inibição de mediadores inflamatórios liberados dos mastócitos e modulação da secreção ácida gástrica (GARNER et al., 1984; GUTH et al., 1984; HOGABOAM et al., 1993; MOTILVA, 1996).

De acordo com os resultados observados para *S. bisulcatus*, o pré-tratamento dos animais com as amostras FRF, FRF mais indometacina e FDF impediu a alteração nos níveis de PGE_2 na mucosa gástrica desses animais. Entretanto, nos grupos tratados com FDF mais indometacina, houve redução significativa dos níveis de PGE_2 . Isso nos sugeriu

que os flavonóides das frações garantem a proteção da mucosa independente do aumento nos níveis PGE_2 . Quando avaliamos o nível de PGE_2 da mucosa para as frações obtidas da *S. arthrotrichus*, observamos que o pré-tratamento dos animais com FRF mais indometacina e FDF mais indometacina, reduziu significativamente os níveis de prostaglandina; sem a adição da indometacina, entretanto as amostras FRF e FDF deixam inalterados, os níveis de PGE_2 . Esses resultados sugerem que a ação protetora das frações sobre as lesões induzidas na mucosa gástrica independe de elevações nos níveis de PGE_2 ; no entanto, ambas as frações (principalmente, FDF da *S. bisulcatus* e FRF ou FDF da *S. arthrotrichus*) tem seus efeitos protetores reduzidos por ação da indometacina. Provavelmente, as ações protetoras das frações que são inibidas pelo DAINE são aquelas relacionadas ao muco, que aumenta via prostaglandinas.

Assim, a etapa seguinte de avaliação dos efeitos protetores das frações, sobre a mucosa gástrica foi a análise das possíveis alterações na produção do muco citoprotetor.

Sabe-se que o muco aderido é um importante fator de proteção da mucosa gástrica; ele se apresenta como um gel transparente, viscoso e elástico. Em sua constituição o muco apresenta água e glicoproteínas que ocorre como barreira aderida à mucosa, ou como muco livre solúvel presente no suco gástrico; quando o muco livre aumenta também está ocorrendo, concomitantemente, aumento no muco de barreira ou daquele aderido (REPETTO e LLESUY, 2002; BOLTON et al., 1978). A diminuição no muco gástrico torna a mucosa susceptível a injúrias induzidas pelo ácido gástrico ou por DAINES e estresse produzido pelo frio (PRICE et al., 1994).

Nossos resultados demonstraram que houve aumento da secreção de muco aderido à mucosa gástrica com os pré-tratamentos empregados (FRF ou FDF) de ambas as espécies estudadas, exceto para FDF da *S. arthrotrichus*. O aumento nos níveis de muco aderido teria

provavelmente, papel gastroprotetor quando as amostras foram administradas a animais submetidos a lesões gástricas.

O efeito gastroprotetor retratado nesses experimentos, ao que parecia até então, não dependia, exclusivamente, dos níveis aumentados de prostaglandinas existentes na mucosa. De acordo com Wallace e Miller (2000), em referência a Brown et al. (1993), o óxido nítrico (NO) é também importante regulador da secreção de muco no estômago; seus efeitos são produzidos via estimulação da guanilato ciclase na célula epitelial. Assim, NO parece ser produzido na célula epitelial em resposta à ativação de receptores colinérgicos e provoca a liberação de muco para essas células garantindo, dessa forma, a integridade da mucosa. Os flavonóides existentes na FRF de ambas as espécies poderiam estar agindo, entre outras possibilidades, via estimulação do óxido nítrico. Já o aumento do muco pelo FDF que só ocorreu para *S. bisulcatus* pode ser atribuído à composição dessa fração, ou seja, glicolipídeos. De acordo com Grisham et al. (1987), o muco possui atividade antioxidante e, em função disso, exerce um importante papel na proteção da mucosa gástrica. É conhecido que muitos açúcares (ex: manitol, glicose) são potentes varredores de radicais livres. O que tem sido sugerido, segundo Cross et al. (1984), é que a atividade antioxidante do muco se deve à sua elevada concentração de glicoproteínas, tendo sido confirmado posteriormente por Hiraishi et al. (1993) através de cultura de células epiteliais gástricas.

Segundo Gong et al. (1990), tanto as glicoproteínas do muco possuem propriedades antiradicais livres, como também os lipídios ligados à mucina gástrica são capazes de proteger as células da mucosa do ataque de radicais livres. Estudos desenvolvidos por Mojzis et al. (2001), indicam que drogas que estimulam a produção de muco também possuem grande atividade antioxidante. Enfim, é possível sugerir que, assim como acontece

com a quercetina, a atividade protetora das FRF das espécies em estudo, as quais apresentam como constituinte majoritário a luteolina, pode estar relacionada (entre os outros mecanismos), com atividade antioxidante de seus flavonóides; já a proteção obtida com as FDF (constituídas apenas de glicolipídeos) pode estar também ligada à sua capacidade de estimular a produção do muco que, por sua vez, atua como agente antioxidante. Essa hipótese pode justificar os efeitos citoprotetores produzidos pelos EEOH, FRF e FDF de ambas as espécies, nas lesões gástricas induzidas pela indometacina/betanecol.

Com isso é possível concluir que tanto drogas anti-secretórias e citoprotetoras semelhantes às PG's (como visto anteriormente), quanto alguns constituintes de plantas são capazes de prevenir ulcerações induzidas por DAINES em roedores, aumentando a produção de muco e bicarbonato induzidos por óxido nítrico (WALLACE e MILLER, 2000). Desse modo, passamos a investigar a participação de NO nos efeitos gastroprotetores.

O óxido nítrico é responsável tanto pela mediação das funções teciduais normais, quanto pelas lesões na mucosa gástrica; é um mediador das defesas e do reparo na mucosa gastrointestinal, mas exerce também papel crítico por: 1) contribuir com as injúrias teciduais num número de doenças digestivas; 2) alterar a motilidade gástrica; e 3) estar envolvido em doenças inflamatórias do trato gastrointestinal quando combinado a outras espécies de oxigênios reativos (CHO, 2001; MUSCARÁ e WALLACE, 1999).

A síntese de NO a partir do grupo guanidina da L-arginina ocorre por ação da NO-sintase constitutiva, processo esse dependente de Ca^{2+} ; o NO assim formado é citoprotetor, ou seja, a NO-sintase constitutiva é expressa em condições fisiológicas. Já a NO sintase

induzida, tem sua ação não dependente de Ca^{2+} , e o NO assim formado tem ações citotóxicas (NISHIDA et al., 1997; NAHAVANDI et al., 1999).

O efeito protetor do NO é atribuído à sua capacidade de reduzir a degranulação e liberação de mediadores dos mastócitos, reduzir as citocinas liberadas pelos macrófagos, aumentar a secreção de muco no epitélio gástrico, reduzir a aderência e secreção de neutrófilos, produzir vasodilatação, acelerar o mecanismo de reparo das lesões, regular o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e diminuir a secreção de ácido gástrico (WALLACE e MILLER, 2000; MARTINEZ-CUESTA et al., 1992; BROWN et al., 1993). O efeito citotóxico produzido pelo NO ocorre através da ação com os metabólitos do oxigênio reativo superóxido, produzindo peroxinitrito. Esse potente agente oxidante pode iniciar a peroxidação lipídica e, desse modo produzir danos na membrana celular (CROW e BECKMAN, 1995; BECKMAN et al., 1990). O NO funciona como um antioxidante durante a resposta inflamatória reagindo rapidamente com superóxido para inativar essa atividade biológica *in vitro* (KUBES e McCAFFERTY, 2000).

Nos experimentos em que avaliamos o papel do NO em mecanismo de proteção da mucosa gástrica foi utilizado o N^{G} -nitro-L-arginine-metil-éster (L-NAME), um inibidor da NO sintetases (endotelial, induzida e neuronal), que acentua as lesões da mucosa gástrica induzida pelo etanol (ALY, 1995). Nossos resultados demonstraram, como esperado, aumento significativo do índice ulcerativo no grupo de animais pré-tratados com L-NAME comparado ao grupo controle; esses dados representam agravamento das lesões induzidas pelo HCl/etanol, ou seja, redução dos mecanismos de proteção da mucosa gástrica. Entretanto, o aumento do IU nos animais pré-tratados com FRF de ambas as espécies foi menor que aquele obtido na ausência dessa fração, o que representa alguma proteção da mucosa gástrica conferida pelas FRF. Quando analisamos os pré-tratamentos com FDF, de

ambas as espécies, constatamos que as mesmas impediram completamente o agravamento das lesões induzidas pelo L-NAME.

A exposição ao etanol parece induzir ao estresse oxidativo, que pode acontecer pela diminuição da liberação do NO o qual se constitui o passo em direção a varredura de radicais livres. A expressão aumentada da enzima NO sintetase pode ser uma resposta ao aumento da demanda de NO (MENCONI et al., 1998). Isso sugere que o mecanismo de ação pelo qual as FRF de ambas as espécies deixam de proteger a mucosa gástrica depende de NO, aquele exercido pelas FDF não se mostrou dependente de NO.

Outro fator que contribui com a integridade da mucosa são os compostos sulfidríla (SH), que tem como finalidade básica reduzir a formação de radicais livres derivados de oxigênio relacionando-se com proteção celular (KONTUREK et al., 1990). SH são, portanto, elementos gastroprotetores capazes de manter o fluxo sanguíneo possibilitando a redução da lesão tecidual (ARUOMA, 1996; SZABO et al., 1987). Em contrapartida, redução dos níveis normais de SH tem impacto significativo na mucosa gástrica, tornando-a susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa e, dessa forma, facilitando a formação de lesões gástricas (KO e CHO, 1995).

A participação dos grupamentos sulfidríla na proteção da mucosa gástrica é passível de análise através da utilização de um bloqueador de SH, a N-etilmaleimida (NEM). O NEM, ao diminuir a concentração de SH na mucosa, potencializa os danos gástricos induzidos pelo etanol, danos estes associados à diminuição significativa nos níveis de SH, especialmente glutathiona (GSH), em animais de experimentação e no homem (KO e CHO, 1995; SZABO, 1987; SZABO e VATTAY, 1990; LONGUERCIO et al., 1991). Essa redução pode ser devida à oxidação da glutathiona, após a geração de metabólitos tóxicos, ou

devido à ligação da glutathione ao acetaldeído gerado através da oxidação de agentes necrotizantes pela atividade gástrica da enzima álcool desidrogenase (SHAW et al., 1990).

Nossos experimentos, utilizando o agente bloqueador de compostos sulfidril (N-etilmaleimida), demonstraram que, como era esperado, NEM agravou as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol. O pré-tratamento dos animais com FRF e FDF de *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*, embora com menor gravidade não foi capaz de impedir a diminuição da proteção da mucosa gástrica causada pelo NEM, ou seja, ainda ocorreu aumento significativo do índice ulcerativo quando comparado ao grupo controle. Esses resultados sugerem que a proteção exercida pelas frações analisadas das espécies em estudo são dependentes, ainda que parcialmente dos compostos sulfidril.

Neste ponto, consideramos que as ações dos EEOH e frações sobre os mecanismos de gastroproteção estavam, ao menos parcialmente, esclarecidos; entretanto, aqueles efeitos relacionados à interferência com a produção/secreção ácida necessitavam ainda de análise mais detalhada. Assim, além dos experimentos já relacionados, os níveis plasmáticos dos hormônios somatostatina e gastrina, ambos envolvidos com a secreção ácida-gástrica, foram avaliados para verificar possível interferência das amostras vegetais com esses hormônios.

A somatostatina (SMT), produzida pelas células D da mucosa do estômago e do pâncreas, é considerada, no estômago como reguladora das liberações do ácido e da gastrina, além daquela de pepsinogênio; a SMT teria ação ainda no esvaziamento gástrico (KARMELI et al., 1994). A gastrina (GT), produzida pelas células G do estômago e do duodeno, por sua vez, estimula receptores de colecistocinina- β (CCK- β) da célula parietal, através da elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} aumentando a secreção ácida.

Acredita-se que a secreção de GT ocorra devido à presença de proteínas nos alimentos, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , além daquela induzida por estimulação vagal e pela distensão e alcalinização do antro (DOCKROY et al., 1995; KONTUREK et al., 1996; KUTCHAI, 1996).

A somatostatina pode participar da secreção gástrica através de vários mecanismos. Sabe-se que a modulação das funções dos mastócitos tem contribuído para a proteção da mucosa contra a ação lesiva do etanol, além de apresentar uma propriedade vasoativa (DIEL e SZABO 1986). A SMT pode agir também sobre vasos sanguíneos, de forma direta, inibindo a liberação de substâncias vasodilatadoras (bradicinina, glucagon, acetilcolina, histamina, polipetídeo intestinal vasoativo); isso levaria indiretamente, a uma vasoconstrição e diminuição no fluxo sanguíneo mesentérico (LUCEY e YAMADA, 1989).

Quando os níveis plasmáticos do hormônio SMT foram determinados em ratos previamente tratados com FRF (100 mg/Kg) da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus artrotrichus*, aumentos dos níveis desses hormônios foram observados em relação aos níveis dos animais dos grupos controles. Esses resultados sugerem nossa hipótese de que o mecanismo protetor das FRF estaria envolvido também com inibição da secreção ácida gástrica.

No estômago, a somatostatina serve também como um regulador parácrino da liberação de ácido e gastrina, exercendo algumas das ações por meio da via do AMPc (MAKHLOUF e SCHUBERT, 1990). A gastrina, por sua vez, estimula não só a secreção ácida gástrica, como também a secreção de fator intrínseco, a de bicarbonato pelo pâncreas e a de insulina e calcitonina. Indiretamente, a gastrina tem efeito trófico na mucosa

digestiva, além de desempenhar papel de relativa importância, na motilidade digestiva (DOCKROY, 1999).

Ao investigarmos o possível papel do pré-tratamento dos animais com as FRF, frente à secreção de gastrina, pudemos observar que houve redução significativa dos níveis plasmáticos desse hormônio. Esses dados confirmaram o envolvimento dos EEOH e das frações obtidas das espécies do gênero *Syngonanthus* com os mecanismos de secreção ácida gástrica, o que explicaria parte da atividade gastroprotetora das amostras vegetais estudadas.

É conhecido que radicais livres participam da patogênese de lesões agudas na mucosa gástrica induzidas pelo etanol, estresse e DAINÉ (PIHAN et al., 1987; DEL SOLDATO et al., 1985). Diante dessa constatação passamos a investigar, com maior detalhamento, as ações de nossas amostras vegetais sobre o efeito produzido pelos radicais livres derivados do oxigênio (OHKAWA et al., 1979) na ulcerogênese aguda induzida por isquemia e reperfusão (UEDA et al., 1989).

Vários mecanismos têm sido propostos na tentativa de explicar a patogênese da isquemia e reperfusão (I/R); entretanto, a atenção tem sido focada principalmente para o papel das espécies de oxigênios reativos (ROS) a exemplo dos radicais superóxido (O_2^*), hidroxila (*OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GRANGER e KORTHUIS, 1995).

Na I/R ocorre formação de lesões gástricas como consequência da formação excessiva de ROS, adesão de neutrófilos pelas células endoteliais e disfunção microvascular (ANDREWS et al., 1995; KAWAI et al., 1994). A liberação extracelular de produtos citotóxicos dos neutrófilos inicia a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas que causa injúrias teciduais (KAHRAMAN et al., 2003).

Além disso, a isquemia enfraquece a barreira da mucosa gástrica e aumenta a difusão ácida, predispondo a mucosa gástrica a injúrias. A acentuação da liberação de endotelina-1, que causa disfunção microvascular e alteração na motilidade gástrica, é o evento inicial no desenvolvimento dos danos da mucosa induzidos por isquemia-reperfusão (KAWAI et al., 1994; WOOD et al., 1995).

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento dos animais submetidos a IR, com FRF de ambas as espécies protegeu significativamente a mucosa gástrica da formação de úlcera pela ação lesiva dos ROS produzidos na isquemia. Essa proteção, mais uma vez, foi atribuída à presença de flavonóides nessas frações, já que esses compostos apresentam atividade antioxidante (MILLER, 1996). Substâncias capazes de impedir a formação ou capturar radicais livres apresentam, portanto, potencial atividade antiulcerogênica (LA CASA et al., 2000).

O mecanismo bioquímico pelos quais os radicais livres são produzidos inclui entre outros, o sistema xantino-oxidase (XO), que é modificado durante a isquemia. Durante este passo, ATP é degradado até finalizar a hipoxantina, e a xantina desidrogenase é convertida a XO. Na reperfusão, a XO cataliza a conversão da hipoxantina em ácido úrico, com a liberação de radicais superóxido e H_2O_2 . Esses radicais derivados do oxigênio podem ser convertidos a radicais hidroxilas altamente citotóxicos. Isso inicia o processo de peroxidação lipídica e a liberação de substâncias que recrutam e ativam leucócitos polimorfonucleares. (LA CASA et al., 2000; CABEZA et al. 2001; ZIMMERMAN e GRANGER, 1994).

A atividade antioxidante de flavonóides como a quercetina deve-se à sua capacidade de seqüestrar radicais livres (MILLER, 1996), inibir a xantina-oxidase (CHANG et al., 1993), quelar íons e inibir a peroxidação lipídica (CHEN et al., 1990). Essa atividade

antioxidante pode ser explicada ainda através da capacidade dessas substâncias em estimular o muco, o que já foi descrito anteriormente.

Com o intuito de avaliar o papel das frações obtidas das espécies em estudo frente à atividade antioxidante passamos a investigar sua participação na peroxidação lipídica e nos níveis de tióis totais.

A peroxidação lipídica consiste num processo degenerativo das membranas biológicas mediado pelo ataque dos radicais livres de oxigênio às pontes metilênicas entre as duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados. Esse ataque oxidativo desencadeia uma série de reações em cascata que tem, como consequência, alterações na composição dos fosfolipídios de membrana, diminuindo sua fluidez, e conseqüentemente, produzindo alteração das suas funções de permeabilidade seletiva, atividade enzimática, transporte de íons e ligação a receptores (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1998).

Dentre os possíveis iniciadores da peroxidação lipídica estão OH, HO₂*, RO*, RO₂* e íon ferro provavelmente em estado de valência mista, complexados ao O₂ (AUST et al., 1982).

Os produtos finais da peroxidação lipídica são os aldeídos de baixo peso molecular (malondialdeído e β-hidroxinonenal) e os alcanos (etano e n-pentano). Os aldeídos são muito reativos e podem se conjugar com resíduos de aminoácidos pertencentes às proteínas, lipídios, carboidratos e bases nitrogenadas (ESTERBAUER, et al., 1991). Esses aldeídos também podem reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando complexos coloridos que podem ser quantificados. Os complexos formados por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são usados como biomarcadores de peroxidação lipídica em sistemas biológicos (sangue e tecido), podendo ser medidos por espectrofotometria ou

fluorescência (YAGI, 1976; OHKAWA et al., 1979; YAGI, 1987; ALVES, 2002). Os níveis de peroxidação lipídica, após a lesão da mucosa gástrica, podem ser avaliados através da quantificação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ARUOMA, 1996).

No trato gastrointestinal, os compostos endógenos (a exemplo dos grupos sulfidrilas) apresentam um importante papel nos mecanismos defensivos da mucosa gástrica (GLAVIN e SZABO, 1992). Incluem processos redutores e proteção celular frente ao estresse oxidativo induzido por diversos agentes e circunstâncias, como ocorre com a exposição a agentes tóxicos como etanol e em situações de estresse experimental (TAKEUCHI et al., 1988; KONTUREK et al., 1990). Tem sido demonstrado, que os tióis intracelulares reagem com os peróxidos e hidroperóxidos, diminuindo os níveis de peroxidação lipídica (PL). A queda dos níveis deste antioxidantes endógenos produz aumento potente da PL; mecanismo inverso pode provocar queda da PL.

Em experimento de isquemia e reperfusão foi possível obter amostras (homogenato de tecido) da mucosa gástrica para quantificação da formação do complexo TBARS. Nossos resultados demonstraram redução significativa dos níveis de TBARS em animais pré-tratados com as frações ricas em flavonóides das espécies *Singonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus*. Esses dados sugeriram redução significativa da peroxidação lipídica, ou seja, diminuição nos danos impostos à mucosa gástrica. Essa redução da injúria pode ser atribuída à ação protetora dos flavonóides existentes nas frações, os quais podem atuar através de mecanismo antioxidante e, portanto, são capazes de exercer atividade protetora sobre a membrana lipídica das células teciduais (GÁLVEZ et al. 1994), o que vem corroborar com as teorias discutidas anteriormente.

A célula contém um complexo sistema de defesa antioxidante que consiste em tióis não proteicos (glutathiona - GSH, cisteína), tióis proteicos, superóxido desmutase (SOD), catalase e GSH peroxidase, dentre outros. De todos os tióis intracelulares, o GSH livre representa aproximadamente 90% e sua concentração é muito alta na porção glandular do estômago quando comparado com outras regiões do trato digestivo (TANAKA e YUDA, 1993; CABEZA, 1999).

Para confirmar a ação gastroprotetora exercida pelas FRF obtidas da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus* na mucosa gástrica foi feita a determinação dos níveis de tióis totais em homogenato de tecidos da mucosa de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Nossos resultados demonstraram aumento significativo dos níveis de tióis totais na mucosa gástrica de animais pré-tratados com as frações ricas em flavonóides das espécies em estudo, o que confirmou que essas frações estimulam a proteção da mucosa gástrica, mais uma vez confirmando a participação desses compostos na ação gastroprotetora investigada.

O conjunto de resultados obtidos com I/R, (determinação dos níveis de TBARS e tióis totais), além de demonstrar a eficácia das frações na prevenção das doenças ulcerativas, comprovou a existência de mecanismo antiulcerogênico adicional aos já discutidos mecanismos anti-secretório e citoprotetor. A atividade antioxidante dessas frações confirmou a afirmação do Di Carlo et al. (1999) que a atividade antioxidante é um dos principais mecanismos antiulcerogênicos relacionados à presença de flavonóides em amostras vegetais.

Por último, mas não menos importante, tem sido sugerido que radicais livres gerados por neutrófilos podem retardar o restabelecimento das úlceras gástricas induzidas no modelo subcrônico de ácido acético (SHII et al., 1992). Com isso, nosso passo seguinte

foi avaliar o potencial de cura, ou seja, a capacidade das frações de acelerar a cicatrização de lesões induzidas por ácido acético 30%.

Nossos resultados obtidos nos experimentos de úlceras induzidas por ácido acético (Takagi et al., 1969) demonstraram que o tratamento prolongado (14 dias) dos animais com FRF, mas não aquele com FDF, e de ambas as espécies estudadas, reduziu significativamente a área da lesão nos estômagos. Esse efeito curativo da FRF está associado à presença dos flavonóides nessas frações.

Sabe-se que a fase inicial da úlcera gástrica é caracterizada por necrose tecidual com atração de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares e termina quando o tecido de granulação se forma acima da depressão ulcerosa (HALTER et al., 1995). Durante a fase de cicatrização rápida o tecido de granulação resiste à remodelação contínua e mudanças na composição celular. No início, as células inflamatórias e macrófagos são abundantes, enquanto que nos estágios finais predominam fibroblastos. Ocorre mudança no fluxo sanguíneo da mucosa ao redor da úlcera, sugerindo que as PG's, que causam vasodilatação, foram sintetizadas em maior quantidade ao redor da úlcera do que em outras partes da mucosa gástrica (SKARSTEIN, 1996). O grande suprimento sanguíneo local traduz-se em reepitelização, a qual requer abundante fornecimento de glicose e oxigênio (SATO et al., 1995)

Após a realização dos experimentos envolvendo indução de úlcera aguda e subcrônica, seguida da elucidação dos prováveis mecanismos de ação passamos a investigar a relação existente entre o efeito terapêutico e tóxico das amostras vegetais por entendermos que esse equilíbrio entre esses dois parâmetros são de grande importância para avaliação de um agente farmacológico. Para isso optamos pela cultura de células que tem possibilitado avaliar a citotoxicidade basal (EKWALL e EKWALL, 1988), a toxicidade nos

órgãos alvos (SEIBERT et al., 1996; MELO et al., 2000) além de poder fornecer informações sobre a dose letal *in vivo* (SHIRIVASTAVA et al., 1991). A escolha dos testes *in vitro* foi em função destes serem geralmente rápidos, sensíveis e econômicos quando comparados ao uso de animais.

Este experimento teve como objetivo investigar o efeito citotóxico das frações FRF e FDF obtidas das espécies *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus* utilizando cultura de fibroblastos de Hamster Chinês (V79).

Os ensaios de viabilidade que medem a capacidade metabólica ou de morte celulares no material testados foram aplicado com uma ampla área de extensão de concentração como é usual quando se inicia o exame de toxicidade de compostos não conhecidos (CINGI et al., 1991; MELO et al., 2001 a,b).

A capacidade metabólica é avaliada por diferentes aspectos da função celular como, redução enzimática, conteúdo proteico e permeabilidade da membrana independente da capacidade de detoxificação dos xenobióticos. Nesse estudo foram usados fibroblastos V79 porque essas células são bem caracterizadas e comumente usadas em testes de mutagenicidade e estudos de toxicidade (CINGI et al., 1991). Além dessas características, a linhagem de células V79 não possui o sistema citocromo P450 e durante condições normais a cultura expressa unicamente funções celulares basais, por essa razão é comumente usado para estudos de citotoxicidade do tipo basal (RODRIGUEZ e HAUN, 1999). Assim, o uso de células V79 nesse estudo reconhecidamente avalia a toxicidade de FRF e FDF obtida de escapos da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus* sem nenhum processo de detoxificação de drogas via P450.

Nossos resultados mostram que as frações deficientes em flavonóides (FDF) obtidas das espécies em estudo foram menos citotóxicas do que as frações ricas em flavonóides

(FRF). Esses resultados corroboram com os dados da literatura mostrando os efeitos citotóxicos dos flavonóides nas células tumorais (MARTINEZ et al., 2003; GALVEZ et al., 2003), essa toxicidade pode ser extrapolada para diferentes tipos de células (células normais e tumorais). A cultura de células em alguns casos pode fornecer informações sobre a dose letal *in vivo* (SHIRIVASTAVA et al., 1991). Avaliando os estudos de FRF e FDF, os mais citotóxicos foram os obtidos da *S. bisulcatus* comparado aos FRF e FDF da *S. arthrotrichus*. Neste sentido os FRF e FDF da *S. arthrotrichus* provavelmente serão menos tóxicos *in vivo* do que as frações da *S. bisulcatus*. Contudo, em ambas as espécies, os FRF foram mais citotóxicos do que os FDF. De acordo com a literatura, os bioflavonóides apresentam uma variedade de atividades terapêuticas e quimioprotetoras atribuídas a sua atividade antioxidante. Contudo, muitos flavonóides tem também mostrado serem genotóxicos em uma variedade de sistemas procarióticos, eucarióticos e *in vivo*. Snyder e Gillies (2002) mostraram que a genotoxicidade de muitos flavonóides é devido a intercalação no DNA e inibição da topoisomerase II em células V79 provavelmente mediado através do metabolismo de flavonóides a quinonas.

Com isso é possível concluir, que as frações da *S. bisulcatus* foram mais citotóxicas do que as frações da *S. arthrotrichus* para células V79. Além disso, é importante verificar o efeito terapêutico *versus* toxicidade, as frações da *S. arthrotrichus* são substâncias em potencial para serem investigados em relação a sua atividade farmacológica.

De acordo com os estudos realizados com os extratos etanólicos e frações ricas e deficientes em flavonóides obtidas da *Syngonanthus bisulcatus* e *Syngonanthus arthrotrichus* foi possível concluir que:

- As substâncias majoritárias presentes nas amostras vegetais das espécies em estudo são flavonóides do tipo luteolina e luteolina glicosilada;
- Para os EEOH de ambas as espécies, as doses de melhor efeito farmacológico foram as de 50, 100 e 250 mg/kg, sendo que a dose de 100 mg/kg apresentou resultados mais estáveis. Já para o estudo das frações a melhor dose foi a de 100 mg/kg;
- Os EEOH e as FRF e FDF, de ambas as espécies, apresentaram atividade de proteção da mucosa gástrica em modelos agudos de úlcera, o que se constitui em atividade antiulcerogênica;
- As FRF são responsáveis pelo processo de cicatrização em úlceras induzidas por ácido acético;
- A atividade antiulcerogênica dessas espécies está relacionada à diminuição da secreção ácida, ao aumento do muco, presença de compostos sulfidrilas e de óxido nítrico, a aumento de somatostatina e redução da gastrina, a redução de peroxidação lipídica e aumento dos grupamentos tióis;
- As frações da *Syngonanthus bisulcatus* são mais tóxicas que as frações da *Syngonanthus arthrotrichus*;

Assim, a atividade antiulcerogênica dos EEOH e frações FRF e FDF, obtidas da *S. bisulcatus* e *S. arthrotrichus*, pode ser atribuída a um sinergismo entre mecanismos anti-

secretório, citoprotetor e antioxidante, provavelmente relacionado à presença dos flavonóides luteolina e luteolina glicosilada.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K. **Carbon 13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; LÓPEZ, A.; MOTILVA, V. Gastroprotection and prostaglandin E₂ generation in rats by flavonoids of *Ditrichia viscosa*. **Planta Med.**, v. 59, p.497-501, 1993.
- ALONSO, J. Bases Clínicas y Farmacológicas In_____ **Tratado de Fitomedicina**. Buenos Aires, Argentina: ISIS, p.198-735, 1998.
- ALVES, A. A. **Marcadores de estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e tecnologia para sua quantificação**. 2002. p. 8-12, 24-26. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- ALY, A.T.M.M. The role of nitric oxide and sulfhydryls in gastric mucosal protection induced by sodium cromoglycate in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, p.739-743, 1995.
- ANDRADE, F.D.P. **Estudo químico de plantas que apresentam atividade biológica**. 1996. p. 1-62. Monografia (conclusão de curso). Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 1996.
- ANDREOLI, T.E. Free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 108, p. 650-651, 2000.
- ANDREWS, F.J.; MALCONTENTI, C.; O'BRIEN, P.E. Sequence of gastric mucosal injury following ischemia and reperfusion. **Dig. Dis. Sci**, v. 37, p. 1356-1361, 1992.
- ARIMURA, A.; LUNDQVIST, G.; ROTHMAN, J.; CHANG, R.; FERNANDEZ-DURANGO, R.; ELDE, R.; COY, D.H.; SCHALLY, A. V.; MEYERS, C. Radioimmunoassay of somatostatin. **Metabolism**, 27, Suppl 1, p.1139-44, 1978.
- ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radical Biol. Med.**, v. 20, n. 5, p.675-705, 1996.

AUST, S.D.; SVINGER, B.A.; TIEN, M. An investigation into the role of hydroxyl radical in xanthine oxidase-dependent lipid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 216, p.142-151, 1982.

BAGCHI, M.; MILNES, B.S.M.; WILLIAMNS, B.S.C.; BALMOORI, M.S.J.; YE, B.S.X.; STOHS, S.; BAGCHI, D. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinale injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanidin extract. **Nutr. Res.**, v. 19, n. 8, p. 1189-1199, 1999.

BATE-SMITH, E.C.; HARBONE, J.B. Quercetin and patuletin in *Eriocaulon*. **Phytochemistry**, v. 8, p. 1025-1037, 1969.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K-FR. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Drug Res.**, v. 45, n.1, p. 697-700, 1995.

BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A., FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peorynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p.1620, 1990.

BJORKMAN, D.J. The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins. **Am. J. Med.**, v. 105, n.1B, p. 8S-12S, 1998.

BOLTON J. P.; PALMER D.; COHEN M. Stimulation of mucus and nonparietal cell secretion by E₂. **Dig. Dis.**, v. 23, p. 359-364, 1978.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. Review article: The plant Kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BROWN, D. J.; DATNER, A. M. Phytotherapeutic approaches to common dermatologic condition. **Arch. Dermatol.**, v. 134, p. 401-1404, 1998.

BROWN, J.F.; KEATES, A.C.; HANSON, P.G.; WHITTLE, B.J.R. Nitric oxide generators and cGMO stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. G418-G422, 1993.

BRUNTON, L.L. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN A. G. **Goodman e Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th edition, New York: McGraw-Hill, p. 663-691, 1996.

CABEZA, J. **Influencia de la melatonina en la gastropatía inducida por isquemia-reperfusión en rata: mecanismos implicados**. 1999. p. 42-58. Tese (Doutorado), Universidade de Sevilla, Espanha. 1999.

CABEZA, J., MOTILVA, V., MARTIN, M.J., ALACON DE LA LASTRA, C. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. **Life Sciences**, v. 68, p. 1405-1415, 2001.

CALAM, J.; BARON, J.H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **Brit. Med. J.**, v. 323, p. 980-983, 2001.

CHANG, Y. T., LEE, Y.J., LU, F.J., CHIANG, H.C. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. **Anticancer Res.**, v. 13, p. 2165-2170, 1993.

CHEN, Y. T., ZHENG, R.L., JIA, Z.J., YU, Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 9, p. 19-21, 1990.

CHO, C.H. Current role of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J. Physiol. Paris**, v.95, p. 253-256, 2001.

CINGI, M.R.; DE ANGELIS, I.; FORTUNATI, E.; REGGIANI, D.; BIANCHI, V.; TIOZZO, R.; ZUCCO, F. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicol. in vitro**, v. 5, p. 119-125, 1991.

COELHO, R.G. **Estudo químico de Sempre-Vivas brasileiras: *Syngonanthus bisulcatus* (Eriocaulaceae)**.p. 15-16, 72-90. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química, Universidade Paulista, Araraquara, 2000.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Review article: Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **J. Nutri. Biochem.**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CRISTONI, A.; MALANDRINO, S.; MAGISTRETTI, M.J. Effect of a natural flavonoid on gastric mucosal barrier. **Drug Res.**, v. 39, n. 1, p. 590-592, 1989.

CROSS, C. E.; HALLIWELL, B.; ALLEN, A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. **Lancet**, v. 1, p. 328-330, 1984.

CROW, J.P.; J.S. BECKMAN. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 196, p.57, 1995.

CZINNER, E.; HAGYMASI, K.; BLAZOVICS, A.; KERY A.; SZOKE, E.; LEMBERKOVICS, E. The in vitro effect of Helichysi flos on microsomal lipid peroxidation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 31-35, 2001.

CURTIS, G.H.; MACNAUGHTON, W.K.; GALL, D.G.; WALLACE, J.L. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 73, p. 130-134, 1995.

DAJANI, E.Z.; AGRAWAL, N.M. Prevention and treatment of ulcers induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 46, p. 3-16, 1995.

DEL SOLDATO, P.; FOSCHI, D.; BEBONI, G.; SCARPIGNATO, C. Oxygen free radicals interact with indomethacin to cause gastrointestinal injury. **Agents Actions**, v. 17, p. 484-488, 1985.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Review article: Flavonoids Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIEL, F.; SZABO, S. Dose dependent effects of linear and cyclic somatostatin on ethanol-induced gastric erosions: The role of mast cells and increased vascular permeability in the rat. **Regul. Pept.**, v.13, p. 235-243, 1986.

DOCKROY, G.J.; VANA, A.; DIMOLINE, R. Gastric endocrine cells: gene expression, processing and targeting of active products. **Physiology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 767-798, 1995.

DOCKROY, G.J. Gastrin and gastric epithelial physiology. **J. Physiol.**, v. 518, n. 2, p. 315-324, 1999.

DOKKEDAL, A.; SALATINO, A. Flavonoids of Brazilian species of *Leiothrix*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 20, p. 31-32, 1992.

EKWALL, B.; EKWALL, K. Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. **Atla**, v. 15, p. 193-200, 1988.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynoneal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 11, p.81-128, 1991.

EVANS, F. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. In: **The Gastro-intestinal Tract**. WILLIAMSON, E. M.; OKPAKO, D.T.; EVANS, F.; J. John Wiley: ChicHEster, p. 25-45, 1996.

FAURE, P.; LAFOND, J.L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: **Analysis of free radicals in biological systems**. FAVIER A. E., Boston: Verlag, p. 237-248, 1995.

GÁLVEZ, J.; DE LA CRUZ, J.P.; ZARZUELO, A.Z.; SANCHEZ DE MEDINA, F.; DE LA CUESTA, F. S. Oral administration of Quercitrin Modifies Intestinal Oxidative Status in Rats. **Gen. Pharm.**, v. 25, n. 6, p. 1237-1243, 1994.

GALVEZ, M.; MARTIN-CORDERO, C.; LOPEZ-LAZARO, M.; CORTES, F.; AYUSO, M.J. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. On cancer cell lines. **J. Ethnopharmacol.**, v. 88, p.125-130, 2003

GARNER A.; FLEMSTROM G.; ALLEN A.; HEYLINGS J. R.; MCQUEEN S. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 19, p. 79-86, 1984.

GIULIETTI, A.M.; WANDELEY, M.G.L.; WAGNER, H.M.L.; PIRANI, J.R.; PARRA, L.R. Estudos em sempre-vivas: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 10, n. 2, 1996.

GLAVIN, G.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB J.**, v. 6, p.825-831, 1992.

GOA, K.L.; MONK, J.P. Emprostil: A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. **Drugs**, v. 3, p. 359-559, 1987.

GONG, D. H.; TURNER, B.; BHASKAR, K.R.; LAMONT, J. T. Lipid binding to gastric mucin: protective effect against oxygen radicals. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. G681-G686, 1990.

GONÇALES, F.; PORTELA, T.; STIPP, E.; DI STASI, L. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea blomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 41-447, 2001.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUSA BRITO, A. R. M. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Biol. Pharm. Bull.** v. 25, n. 4, p. 487-491, 2002.

GRANGER, D.N.; KORTHUIS, R.J. Physiology mechanisms of postischemic tissue injury. **Annu Ver. Physiol.**, v.57, p. 311-332, 1995.

GRISHAM, M. B.; VON RITTER, C.; SMITH, B.F.; LAMMONT, J. T.; GRANGER, D.N. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. **Am. J. Physiol.**, v. 2, n. 53, p. G93-G96, 1987.

GURBUZ, I.; AKYUZ, C.; YESILADA, E.; SENER, B. Anti-ulcerogenic effect of *Mormodica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 77-82, 2000.

GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. **Dig. Disg.**, v. 5, p. 21-32, 1987.

GUTH, P. H.; PAULSEN, G.; NAGATA, H. **Gastroenterol.**, v. 87, p. 1083-1090, 1984.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Chem. Toxic.**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWEEL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2^a ed. Oxford University Press, 1998.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; TARNAWSKI, A. Review article: healing of experimental gastric ulcers. Interference by gastric acid. **Dig. Dis. Sci.**, v. 40, n. 11, p. 2481-2486, 1995.

HARBONE, J. F.; WILLIAMS, C. A. Review : Advances in flavonoid research since. **Phytochem.**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARBONE, J.B. **The flavonoids advances in research since**. London: Chapman and Hall, 1996.

HAYLLAR, J., BJARNASON, I. NSAIDS, COX-2 inhibitors, and the gut **Lancet**, v.346, p. 521-522, 1995.

HAWKINS, C.; HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a review of the literature. **J. Pain. Symptom Manage**, v. 20, p. 140-151, 2000.

HIRAISHI, H.; TERANO, A.; OTA, S.; MUTOH, S.; SUGIMOTO, T.; HARADA, T.; RAZANDI, M.; IVEY, K.J. Role for mucous glycoprotein in protecting cultured rat gastric mucosal cells against toxic oxygen metabolites. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 121, p. 570-578, 1993.

HIRSCHOWITZ, B. I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K.; WALLMARK, B.; SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Dig. Dis. Sci.**, v. 40, n. 2, p. 3s-23s, 1995.

HOGABOAM C. M.; BISSONNETTE E. Y.; CHIN B.; BEFUS A. D.; WALLACE J. L. **Gastroenterol.**, v.104, p.122-129, 1993.

JOHNSON, B; JOHNSON, L. R. Regulation Peptides of the Gastrointestinal Tract. In: **Gastrointestinal Physiology** Ed. LEONARD R. JOHNSON. St. Louis: Mosby, p. 14, 1997.

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; SERTESER, M.; KOKEN, T. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **J. Nephrol.**, v. 16, p. 219-224, 2003.

KARMELI, F.; ELIAKIM, R.; OKON, E.; RACHMILEWITZ, D. Gastric and mucosal damage by ethanol is mediated by substance P and prevented by ketotifen, a mast cell stabilizer. **Gastroenterology**, v. 10, p. 1206-1216, 1994.

KAWAI, T.; JOH, T.; IWATA, F.; ITOH, M. Gastric epithelial damage induced by local ischemia-reperfusion with or without exogenous acid. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. G263-G270, 1994.

KHAYYAL, M.; EL-GHAZALY, M.; KENAWY, S.; SEIF-EL-NASR, M.; MAHRAN, L.; KAFABI, Y.; OKPANYI, S. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. **Arzneim.-Forsch.**, v. 51, suppl 7, p. 545-553, 2001.

KINOSHITA, M.; TSUNEHISA, N.; TAMAKI, H. Effect of a combination of Ecabet Sodium and cimetidine on experimentally induced gastric lesions and gastric mucosal resistance to ulcerogenic agents in rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, n. 2, p. 223-226, 1995.

KO, J.K.S.; CHO, C.H. The role of non-protein sulfhydryl compound in gastric adaptive cytoprotection against ethanol-induced mucosal damage in rats. **Inflamm. Res.**, v. 44, p. 242-244, 1995.

KONTUREK, P.K.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; DEMBINSKI, A. Role of epidermal growth factor, prostaglandin and sulphhydryls in stress-induced gastric lesions. **Gastroenterol.**, v. 99, p. 1607-1615, 1990.

KONTUREK, S.J.; RADECCKI, T.; BRZOZOWSKY, T.; DROZDOWICZ, D.; PIASTUCHI, L.; MURAMATSU, M.; TANAKA, M.; AIHARA, H. Antiulcer and gastroprotective effects of solon, a synthetic flavonoid derivative of sophoradin- Role of endogenous prostaglandins. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 125, p. 185-192, 1996.

KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; SZLACHCIC, A.; HAHN E.G. Polyamines and epidermal growth factor in the recovery of gastric mucosa from stress-induced gastric lesions. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 27, p. S97-S104, 1998.

KUBES, P.; McCAFFERTY, D.M. Nitric oxide and intestinal inflammation. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 150-158, 2000.

KUTCHAI, H.C. Gastrointestinal secretions. In: R.M. BERNE; M. N. LEVY (Eds.), **Principles of Physiology**. 2nd Edition, St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc., p. 516-589, 1996.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 45-53, 2000.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic gastritis: a prospective evaluation. **Gastroenterol.**, v. 94, p.1254-1262, 1988.

LEVINE, R. J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: C. J. PFEIFFER. **Peptic Ulcer**. Munksgaard, Copenhagen, p. 92-97, 1971.

LEWIS, D. A. E; SHAW, G. P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12, p. 95-100, 2001.

LEWIS, D. A.; HANSON, P. J. Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin In: G. P. Ellis; G. B. West. **Progress in Medicinal Chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 28, p.201-231, 1991.

LEWIS, D. A. Antiulcer drugs from plants. **Chemistry in Britain**, v. 28, n. 2, 141-144, 1992.

LONGUERCIO, C.; ROMANO, M.; DI SAPIO, M.; NARDI, G.; TARANTO, D.; GREELLA, A. Regional variations in total and non-protein sulfhydryls compounds in the human gastric mucosa and effects of ethanol. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 26, p.1042-1048, 1991.

LUCEY, M.R., YAMADA, T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. **Dig. Dis. Sci.**, v. 34, p. 5S-13S, 1989.

MAKHLOUF, G.M.; SCHUBERT, M.L. Gastric somatostatin: a paracrine regulator of acid secretion. **Metabolism**, v.39, suppl 2, p. 138-142, 1990.

MARTINEZ-CUESTA, M. A.; BARRACHINA, M.D.; PIQUE, J.M.; WHITTLE, B.J.R.; ESPLUGUE, J.V. The role of nitric oxide and platelet-activating factor in the inhibition by endotoxin of pentagastrin-stimulated gastric acid secretion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 218, p.351-354, 1992.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotections of escins Ia, Ib, Iia, and Iib on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 373, n. 1, p. 63-70, 1999.

MCCHESENEY, J. D. Biological diversity, chemical diversity, and search for new pharmaceuticals. In: M.J. BALICK, E. ELISABETSKY, E. S. A. LAIRD. **Medicinal**

Resources of the Tropical Forest – Biodiversity and its importance to human health.
New York: Columbia University Press, p. 11-17, 1996.

MELO, P.S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURÁN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cel. Devel. Biol. Animal** v. 36, p. 539-543, 2000.

MELO, P.S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicol.** v. 159, p. 135-141, 2001a.

MELO, P.S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. **Toxicol. Letters**, v. 16, p. 237-242, 2001b.

MENCONI, M.J.; UNNO, N.; SMITH, M.; AGUIRRE, D.E.; FINK, M.P. Nitric oxide donor-induced hypermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1425, p.189-203, 1998.

MILLER, T.A. Mechanisms of stress-related mucosal damage. **Am. J. Med.** v. 83, p. 8-14, 1987.

MILLER, A. L. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. **Altern. Med. Ver.**, v.1, p. 103-111, 1996.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Jap. J. Pharmacol.**, v. 33, p. 939-945, 1981.

MOJZIS, J.; HVISCOVÁ, K.; GERMANOVÁ, D.; BUKOVICOVÁ, D.; MIROSSAY, L. Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Physiol. Res.**, v. 50, n. 501-506, 2001.

MONCADA, S. The l-arginine nitric oxide pathway. **Acta Physiol. Scand.** v.145, p. 201-227, 1992.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Jap. J. Pharmacol.**, v. 57, p. 495-505, 1991.

MOTILVA, V.; LÓPEZ, A.; MARTIN, M. J.; La CASA, C.; ALACÓN DE LA LASTRA, C. Cytoprotective activity of cisapride on experimental gastric mucosal lesions induced by ethanol. Role of endogenous prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 52, p. 63-74, 1996.

MUSCARÁ, M.N.; WALLACE, J.L. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors **Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 276 n. 6, p. G1313-G1316, 1999.

NAHAVANDI, A.; DEHPOUR, A.R.; MANI, A.R.; HOMAYOUNFAR, H.; ABDOLI, A. N^{G} -nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 170, p. 283-286, 1999.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; ISHIGURO, I. Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthesis in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 236, p. 275-279, 1997.

OATES, P. J.; HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of Ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterol.**, v. 94, p.10-21, 1988.

OHKAWA, H.; NOBUKO, O.; YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PANDOLFINO, J. E.; HOWDEN, C. W.; KAHRILAS, J. P. Motility-modifying agents and management of disorders of gastrointestinal motility, **Gastroenterol.**, v.118, p. s32-s47, 2000.

PESKAR, B. M.; MARICIC, B. B. N. Role of prostaglandins in gastroprotection. **Dig. Dis. Sci.**, v. 43, n. 9, p. 23-29, 1998.

PIHAN, G.; REGILLO, C.; SZABO, S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol or aspirin-induced gastric injury. **Dig. Dis. Sci.** v.32, p. 1395-1401, 1987.

PRICE, K. J.; HANSON, P. J.; WHITTLE, B. J. R. Stimulation by carbachol of mucus gel thickness in rat stomach involves nitric oxide. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 263, p. 199-202, 1994.

RAFFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M. A.; MOSSA, J. S.; AGEEL, A. M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J. Ethnopharmacol.** v. 29, p 25-34, 1990.

RAINSFORD, K. D. Gastric ulcerogenicity of non-steriroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 39, p. 669-672, 1987.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. O Trato Gastrointestinal. In _____ **Farmacologia**. 4^aed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.305-310, 1999.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 600-613, 2001.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **Atla-Altern. Lab. Anim.**, v. 21, p. 89-96, 1993.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S. L. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 5, p.523-534, 2002.

RICCI, C.V.; PATRÍCIO, M.C.B.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A.; GIULIETTI, A.M. Flavonoids of *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae): Taxonomic implications. **Bioch. System Ecol.**, v. 24, n. 6, p. 577-583, 1996.

RIDDELL, R.; PANACER, D.; WILDE, S.; CLOTHIER, R.; BALLS, B. The importance of exposure period and cell type in vitro cytotoxicity test. **Atla-Altern. Lab. Anim.** v. 14, p. 86-92, 1986.

RINALDI, V. **Estudo químico de plantas da família Eriocaulaceae**. 2000.Monografia (Conclusão de curso). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

RODRIGUEZ, J.A.; HAUN, M., Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. **Planta Med.** V. 65, p. 1-5, 1999

SANDVIK, A. K.; CUI, G.; BAKKE, I.; MUNKVOLD, B.; WALDUM, H.L. PACAP stimulates gastric acid secretion in the rat by inducing histamine release. **Am. J. Physiol.**, v. 281, p.G997-G1003, 2001.

SATO, N.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; OGIHARA, T.; YAMADA, S. Gastric blood flow in ulcer diseases. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 208, p.14-20, 1995.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. IN: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul e Santa Catarina: Editora da UFSC e UFRGS 1ª edição, 1999.

SEIBERT, H.; BALLS, M.; FENTEM, J. H.; BIANCHI, V.; CLOTHIER, R.H.; DIERICKX, P.J.; EKWALL, B.; GARLE, M. J.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; GRIBALDO, L.; GULDEN, M.; LIEBSCH, M.; RASMUSSEN, E.; ROGUET, R.; SHRIVASTAVA, R.; WALUM, E. Acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. **Atla- Alt Lab Anim** v. 24, p. 499-510, 1996.

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHAW, S.; HERBERT, V.; COLMAN, N.; JAYATILLEKE, E. Effect of ethanol-generated free radicals on gastric intrinsic factors and glutathione. **Alcohol** v. 7, p.153-157, 1990.

SHELDON, J.W.; BALICK, M.J.; LAIRD, S.A. Ed. New York Botanical Garden, New York, p. 87-82, 1997.

SHRIVASTAVA, R.; JOHN, G. W.; RISPAT, G.; CHEVALIER, A.; MASSINGHAM, R. Can the *in vivo* maximum tolerated dose be predicted using *in vitro* techniques – a working hypothesis. **Atla – Alt. Lab. Anim.**, v. 19, p. 393-402, 1991.

SHII, D.; INAGUMA, K.; ITO, M.; SUZUKI, Y. Role of oxygen radicals in healing process of acetic acid-induced ulcers in rats with limited food-intake-time and effects of oxygen radical scavengers on the healing. **Exp. Ulcer**, v. 19, p. 105-109, 1992.

SIKIRIC, P.; SEIWERTH, S.; GRABAREVIC, Z.; et al., The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on NG-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. **Eur. J. Pharmacol.** v. 332, p. 23-33, 1997.

SKARSTEIN, A. Effect of indomethacin on blood flow distribution in the stomach of cat with acute gastric ulcer. **Scand. J. Gastroenterol.** v. 14, p. 905-911, 1996.

SLINGERLAND, D.W.; CARDERALLI, J. A. et al.; The utility of serum gastrin levels in assessing the significance of low serum B₁₂ levels. **Arch. Intern. Med.**, v. 144, 6, p. 1167-8, 1984.

SNYDER, R.D.; GILLIES, P.J. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. **Environ. Mol. Mutagen.** 40: 266-276, 2002.

SOUZA BRITO, A.R.M. **Manual de Ensaio Toxicológicos in Vivo**. Campinas, Editora UNICAMP, p. 122, 1994.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection;. A comprehensive and up-to-date review of *H. pylori* infection and clinical consequences. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 1175-1186, 2002.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch. Toxicol.**, p. 41, 99-105, 1978.

SZABO S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: Time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.22, Supp. 127, p.21-28, 1987.

SZABO, S.; VATTAY, P. Experimental gastric and duodenal ulcers. *Gastroenterology*. **Clin. N. Am.** v.19, p. 67-85, 1990.

SZABO, S.; KUSSTATSCHER, S.; SAKOULAS, G.; SANDOR, Z.; VINCZE, A.; JADUS, M. Growth Factors: new endogenous drugs for ulcer healing. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, Suppl. 210, p. 15-18, 1995.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Jap. J. Pharmac.**, v. 19, p.418-426, 1969.

TAKEUCHI, K.; MEGUMU, O.; HIROMICHI, M.; OKABE, S. Role of suphydryls in mucosa injury caused by ethanol. Relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 248, p. 836-839, 1988.

TANAKA, J.; YUDA, Y. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion in pylorus-ligated rat. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 16, n. 1, 29-32, 1993

TEIXEIRA, M. A. Sempre-vivas: folclore e verdade. **Ciência Hoje**. p. 14-15, 1987.

UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; OYAMADA, H.; TANIGAWA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 162, p.55-58, 1989.

VARANDA, E.; VILEGAS, W. **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese ambiental**. In: Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2, Gramado: UFRGS, 1994.

VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochem.**, v. 29, p. 2299-2301, 1990.

VILEGAS, W.; SANTOS, L.C.; ALÉCIO, A. C.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; DEPAUW, E.; SANO, P. T. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochem.**, v. 49, p. 207-210, 1998.

WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer, p. 303, 1984.

WALLACE, J.L.; MILLER, M.J.S. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterol.**, v. 119, p. 512-521, 2000.

Wallace, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Amer. J. Med.**, v. 110, n. 1A, p.19S-23S, 2001.

WOLFE, M. M.; SANCHS, G. Acid suppression: Optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterol.**, v. 118, p. 9-31, 2000.

WOLFE, M.M.; SOLL, A.H. The physiology of gastric acid secretion. **N. Engl. J. Med.**, v.319, n. 26, p. 1707-15, 1988.

WOOD, J.G.; ZHANG, Z.Y.; CHEUNG, L.Y., Ischemia-reperfusion increases gastric motility and endotelin-1-induced vasoconstriction. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. G524-G531, 1995.

YAGI, K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochem. Med.**, v. 15, p. 212-216, 1976.

YAGI, K. Lipid peroxides and human diseases. **Chem. Phys. Lipids**, v. 45, p. 337-351, 1987.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidentais e oriental. In: YUNE, R. A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Ed. 1^a edição, Santa Catarina: Argos editora, p 20-46, 2001.

ZAKI, M.; KODURU, S.; MCCUEN, R.; VUYYURU, L.; SCHUBERT, M. L. Amylin, released from the gastric fundus, stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in mice. **Gastroenterol.**, v. 123, n. 1, p. 247-255, 2002.

ZIMMERMAN, B.J.; GRANGER, D.N. Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: role in ischemia-reperfusion injury. **Hepatogastroenterol.**, v. 41, p. 337-342, 1994.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: C. M. O. SIMÕES; SCHENKEL; G. GOSMANN; J. C. P. MELLO; L. A. MENTZ; P. R. PETROVICK. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**, 1ª edição, Florianópolis, Santa Catarina: Editora da Universidade do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, p. 489-516, 1999.

