

Juliano de Souza Gracioso

**Atividade de *Turnera diffusa* Willd. e *Turnera ulmifolia* L. fornece
suporte a indicação de flavonóides como nova fonte de moléculas
farmacologicamente ativas para o tratamento de úlceras gastrointestinais**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Biologia Funcional e Molecular – Área de concentração
em Fisiologia. Departamento de Fisiologia e Biofísica.
Universidade Estadual de Campinas - SP

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Juliano de Souza Gracioso
Albanteira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	Re
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	G753a
V	EX
TOMBO BC/	53878
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/05/03
Nº CPD	

CM00184082-5

BIB 0 293984

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

G753a **Gracioso, Juliano de Souza**
Atividade de *Turnera diffusa* Willd. e *Turnera ulmifolia* L.
fornece suporte a indicação de flavonóides como nova fonte
de moléculas farmacologicamente ativas para o tratamento de
úlceras gastrointestinais/Juliano de Souza Gracioso. --
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

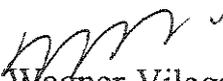
Orientadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito
Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

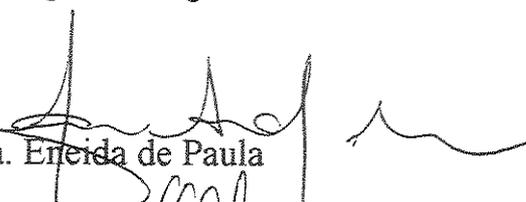
1. Úlcera gástrica. 2. Plantas medicinais. 3. Flavonóides.
I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

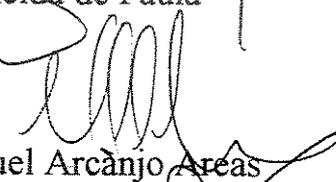
Banca examinadora


Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira


Prof. Dr. Wagner Vilegas


Profa. Dra. Eneida de Paula


Prof. Dr. Miguel Arcânjo Areas


Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Profa. Dra. Mirtes Costa

9821276

*“Se não tiveres a coragem de desafiarte, farás sempre e somente
o necessário” (Walter Grandó).*

*Aos meus pais,
João e Jocelina;
irmãs, Luciana e Ana Maria “ in memorian ”;
Hellen;
e a todos os animais, Lady em especial.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito, pela orientação e apoio durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas pelas informações fitoquímicas e exemplo profissional.

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima pela coleta de *T. ulmifolia*

Aos colegas de laboratório Walber, Luciana, Fernanda, Ana Claudia, Ana Beatriz e Leônia, pelo auxílio técnico.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp.

A Desi, amiga espanhola, por tornar meus dias na Espanha tão simples como os que tenho aqui.

Aos Professores Antonio Zarzuelo Zurita e Julio Galvés, e aos alunos de pós-graduação e Funcionários do Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia, Granada, Espanha, pelos ensinamentos, carinho e confiança.

Ao Walber e a Marizia pela ajuda em todos os momentos e fiel amizade.

Aos professores Everardo e Bosquero, pela credibilidade em meu trabalho, além da amizade.

Ao professor Miguel, exemplo para antigos, atuais e futuros professores.

Ao Jairo, amigo e companheiro; exemplo de simplicidade e eficiência.

Ao professor José Marcelino, por abrir-me as portas à uma nova carreira.

A Andréa, secretária da pós-graduação deste curso.

E a Fapesp, pela confiança e apoio financeiro durante todos estes anos como bolsista.

ÍNDICE

Resumo.....	xi
Abstract.....	xiv
I- INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A úlcera péptica e alguns aspectos da terapia ulcerosa.....	1
1.2. Flavonóides como uma nova fonte de moléculas farmacologicamente ativas.....	10
1.3. Turneras.....	18
II- OBJETIVOS.....	24
III- MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Coleta e identificação das espécies em estudo.....	26
3.2. Extração e preparação dos extratos de <i>T. ulmifolia</i> e <i>T. diffusa</i>	26
3.3. Extração e preparação dos infusos de <i>T. ulmifolia</i> e <i>T. diffusa</i>	27
3.4. Animais utilizados.....	28
3.5. Ensaio toxicológicos <i>in vivo</i>	29
3.5.1. Toxicidade aguda em camundongos.....	29
3.6. Ensaio farmacológicos.....	30

3.6.1.	Úlcera gástrica induzida por estresse	31
3.6.2.	Úlcera gástrica induzida por HCl/etanol	32
3.6.3.	Úlcera gástrica induzida por indometacina e betanecol....	33
3.6.4.	Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico	34
3.6.5.	Colite aguda induzida por TNBA em ratas.....	35
3.6.6.	Determinação do índice de lesão colônica.....	36
3.6.7.	Determinação de glutathione total.....	37
3.6.8.	Determinação dos níveis de mieloperoxidase.....	38
3.6.9.	Determinação da inibição da peroxidação lipídica.....	39
3.6.10.	Úlcera duodenal induzida por cisteamina.....	40
3.6.10.	Indução de úlcera crônica por ácido acético.....	41
3.6.11.	Determinação de muco livre.....	43
3.6.12.	Determinação da síntese de prostaglandina.....	44
3.6.13.	Análise cromatográfica dos infusos.....	44
3.7.	Análise Estatística.....	46
IV-	RESULTADOS.....	47
4.1.	Toxicidade aguda	47

4.2.	Atividade antiulcerogênica dos extratos de <i>T. ulmifolia</i> e <i>T. diffusa</i>	49
4.2.1	Úlcera gástrica induzida por estresse.....	49
4.2.2.	Úlcera gástrica induzida por HCl/etanol.....	51
4.2.3.	Úlcera gástrica induzida por indometacina e betanecol.....	53
4.2.4	Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico.....	55
4.3.	Atividade antiulcerogênica dos infusos de <i>T. ulmifolia</i> e <i>T. diffusa</i>	57
4.3.1	Úlcera gástrica induzida por estresse.....	57
4.3.2.	Úlcera gástrica induzida por HCl/etanol.....	60
4.3.3.	Úlcera gástrica induzida por indometacina e betanecol.....	63
4.3.4	Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico.....	65
4.3.5.	Úlcera duodenal induzida por cisteamina.....	68
4.3.6.	Colite aguda induzida por TNBA em ratas.....	70
4.3.7.	Peroxidação lipídica de membrana isoladas de fígado de ratas.....	75

4.3.8. Úlcera crônica induzida por ácido acético	76
4.3.9. Produção de muco livre na mucosa gástrica.....	79
4.3.10. Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica.....	82
4.4. Análise fitoquímica dos infusos.....	84
V- DISCUSSÃO.....	89
VI- CONCLUSÕES.....	127
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

RESUMO

T. ulmifolia e *T. diffusa* são plantas que pertencem à família Turneracea encontrada em países de clima tropical e subtropical, inclusive no Brasil. Estas plantas são utilizadas na medicina popular do México, Estados Unidos, Ilhas do Caribe e Brasil para o tratamento de diversas patologias incluindo disfunções sexuais, inflamação e distúrbios gástricos e intestinais. No Brasil e na maioria destes países *T. ulmifolia* e *T. diffusa* são conhecidas popularmente como Chanana e Damiana, respectivamente. Os efeitos toxicológicos agudos dos extratos de diferentes polaridades e dos infusos obtidos a partir das partes aéreas de cada espécie foram analisados e testados em diferentes doses, e nenhuma morte ou sinal de toxicidade foi observada até a dose de 5000 mg/kg, administrada por via oral, em camundongos. Estas amostras foram também testadas em diferentes experimentos de indução de úlcera gástrica em camundongos tais como o modelo de estresse, indometacina e betanecol, HCl/etanol e ligadura do piloro além de modelos de indução de úlcera duodenal e úlcera crônica em ratos, para avaliação de seu potencial antiulcerogênico. Os extratos administrados em dose de 100 mg/kg e os infusos administrados em doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg, por via oral ou intraduodenal, inibiram as lesões induzidas pelo HCl/etanol; pelo estresse e aquelas induzidas por indometacina e betanecol, em camundongos. Estas

amostras também alteraram os parâmetros bioquímicos da secreção gástrica, aumentando o pH do conteúdo gástrico e diminuindo a quantidade de íons H^+ no suco gástrico. Em relação aos infusos, ambos não foram eficazes em inibir o aparecimento de úlceras duodenais em ratos, mas foram eficazes em inibir o desenvolvimento da colite aguda nesta mesma espécie. A análise bioquímica das amostras de cólon destes animais revelou que o tratamento com o infuso de *T. ulmifolia* foi eficaz em aumentar os níveis de glutathione total no tecido lesado enquanto que o tratamento com o infuso de *T. diffusa* foi eficiente em diminuir os níveis de mieloperoxidase no tecido colônico. Ambos infusos, em doses de 500 e 1000 mg/kg, foram eficientes em reduzir a área da lesão ulcerativa crônica em estômago de ratos após 14 dias consecutivos de tratamento, por via oral. A análise da produção de muco na mucosa gástrica dos animais revelou que a administração dos infusos foi eficaz em aumentar a quantidade de muco livre nesta mucosa. O tratamento com os infusos também foi eficaz em impedir a degradação de prostaglandinas citoprotetoras na mucosa gástrica quando um potente inibidor da ciclooxigenase foi previamente administrado aos animais. Em relação aos ensaios da atividade antioxidante *in vitro* foi demonstrado que os infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* inibem a peroxidação lipídica das membranas isoladas de fígado de ratos. A IC_{50} obtida para cada infuso foi de 7,18 e 16,4 ug/ml,

respectivamente, confirmando, o potencial antioxidante dos compostos químicos presentes em cada espécie. A análise dos resultados sugere que os mecanismos de ação relacionados a atividade antiulcerogênica e antiinflamatória intestinal apresentadas estão relacionados com o aumento e manutenção dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica, tais como a produção de muco, manutenção da síntese de prostaglandina e atividade antioxidante dos compostos presentes em cada amostra vegetal. Ensaio fitoquímico revelaram que os compostos majoritários encontrados em ambos infusos são flavonas derivadas da luteolina e apigenina. A análise dos resultados e, as informações fitoquímicas obtidas, em comparação às informações contidas em literatura específica permitem concluir que, os resultados farmacológicos obtidos com a administração dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* estão diretamente relacionados à presença dos flavonóides identificados em cada infuso. A baixa toxicidade observada em experimentos *in vivo* e os resultados farmacológicos obtidos confirmam as indicações populares das espécies para o tratamento de inflamações intestinais e úlceras gástricas, indicando que o gênero *Turnera* constitui-se em uma nova fonte de flavonóides farmacologicamente ativos para o tratamento de distúrbios digestivos em geral.

ABSTRACT

T. diffusa and *T. ulmifolia* are plants that belong to the Turneraceae family, They are found in tropical and subtropical climate countries, including Brazil. These plants are used in the popular medicine of Mexico, United States, Caribbean Islands and Brazil for the treatment of several pathologies including sexual dysfunction, inflammation and gastric and intestinal disturbances. In Brazil and in most of these countries *T. ulmifolia* and *T. diffusa* are popularly known as Chanana and Damiana, respectively. The acute toxicological effects of the different polarity extracts and of the infusions obtained from the aerials parts of each species have been tested and analyzed in different doses; no deaths or toxicity symptoms were noted until the dose of 5000 mg/kg, orally administered, in mice. These samples have been also tested in different gastric ulcer induction experiments on mice such as the stress, indomethacin and bethanechol, HCl/ethanol and pylorus ligated model and also on the duodenal ulcer and chronic ulcer model in rats. The extracts administered in doses of 100 mg/kg and the infusions administered in doses of 100, 250, 500 and 1000 mg/kg, by oral or intraduodenal route, inhibited the lesions induced by HCl/ethanol, stress, indomethacin and bethanechol in mice. These samples also altered the biochemical parameters of gastric secretion, increasing the gastric content's pH and decreasing the amount of H⁺ ions in

the gastric juices. The infusions, although not effective in inhibiting the onset of the duodenal ulcer in rats, were effective in inhibiting the development of the acute colitis in the same species. The biochemical analysis of these animal's colon revealed that the treatment with *T. ulmifolia* infusion was effective in increasing the levels of the total glutathione in the injured tissue while the treatment with *T. diffusa* infusion was effective in decreasing the levels of myeloperoxidase in the colonic tissue. Both infusions, at doses of 500 and 1000 mg/kg, were efficient in reducing the chronic ulcerous injured area in the rat's stomachs after fourteen consecutive days of treatment, by oral route. The analysis of the mucus production in the mice gastric mucous revealed that the infusions' administration was effective in increasing the amount of free mucus. The treatment with the infusions was effective in avoiding the cytoprotective prostaglandin degradation in the gastric mucous when a cyclooxygenase potent inhibition was previously administered to the animals. Related to the in vitro antioxidant activity tests, it has been demonstrated that *T. diffusa* and *T. ulmifolia* infusions inhibited lipid peroxidation of the rat's liver isolated membrane. The IC₅₀ % obtained was 16,4 and 7,18 ug/ml, respectively, confirming the antioxidant potential of the chemical compounds present in each species. These results suggest that the mechanisms of action related to the gastric antiulcerogenic activity and anti-

inflammatory effect presented in these plants are related to the increase and maintenance of the integrity of gastric mucous and prostaglandin synthesis and also to the potent antioxidant activity presented by the infusions. Phytochemical analysis revealed that the major compounds found in both infusions are flavones derivated from luteolin and apigenin. The analyses of these results and the phytochemical information obtained, compared to the existing information in the specific literature, allow the conclusion that the pharmacological results obtained with the administration of *T. ulmifolia* and *T. diffusa* infusions are directly related to the presence of identified flavonoids in each infusion. The low toxicity noted in vitro experiments and the pharmacological results confirm the popular indication of the species for the treatment of intestinal inflammation and gastric ulcers, suggesting the *Turnera* genus constitutes a new source of pharmacological active flavonoids for the treatment of digestive distinctions in general.

I- INTRODUÇÃO

1.1. A úlcera péptica e alguns aspectos da terapêutica ulcerosa

Nas últimas décadas, tem sido relatado que as úlceras pépticas em geral, não dependem só da acidez gástrica, mas também da presença de fatores predisponentes os quais atuam coletivamente reduzindo a defesa da mucosa gástrica contra a ação de diferentes agentes lesivos, outros que não o ácido clorídrico e a pepsina, naturalmente presentes no estômago (Hirschowitz *et al.*, 1995). Esta relação também foi estudada por Szabo em 1987 e Szabo *et al.* em 1995, que estabeleceram que as úlceras pépticas seriam resultantes de uma diminuição dos fatores defensivos da mucosa, que representam forças de resistência ao suco gástrico. Entre estes fatores estão as secreções de muco e bicarbonato, além de prostaglandinas citoprotetoras.

Por outro lado é consenso entre os diferentes grupos de pesquisadores desta área que, desde que os processos fisiológicos da secreção ácida foram descritos, tornou-se evidente, que de alguma forma, a presença exacerbada de ácido no estômago seria nocivo à esta mucosa. A partir de então, esta substância tornara-se, o principal agente responsável pela maioria dos processos patológicos que afetam este órgão e também seus adjacentes, principalmente esôfago e duodeno (Wolfe e Soll, 1988; Wolfe e Sachs, 2000). Por outro lado, também é consenso, que a secreção ácida e sua regulação não podem ser consideradas como únicos fatores

responsáveis pela úlcera péptica ou como alvo farmacológico restrito para a sua remissão, já que um número significativo de pacientes ulcerados apresentam quantidades normais de ácido no estômago. Este fato levou, nos últimos anos, ao estudo e a descoberta da bactéria *Helicobacter pylori*, a qual esta presente na mucosa da grande maioria dos pacientes com úlceras gástricas e duodenais. Por outro lado, também é relatado que esta bactéria pode estar presente na mucosa de indivíduos sadios os quais podem ou não, vir a desenvolver esta patologia. Assim, a presença da *H. pylori* e as alterações da secreção ácida, passaram a ser considerados como os principais agentes causadores de úlceras gastrointestinais na espécie humana (Bruton *et al.*, 1996). Apesar desta importante descoberta, fatores fisiopatológicos relacionados ao desenvolvimento de úlceras pépticas de forma geral, tais como; o aumento da secreção ácida e da pepsina e a diminuição da citoproteção da mucosa não podem ser desconsiderados durante o estudo de substâncias potencialmente ativas para o tratamento destas patologias, já que estes fatores contribuem ao menos, para o desenvolvimento e aumento do tamanho da lesão uma vez já instalada e ainda, dificultam sua cicatrização, podendo ocasionar inclusive à reincidência da lesão (Wolfe e Soll, 1988; Lewis e Hanson, 1991; Hirschowitz *et al.*, 1995; Wolfe e Sachs, 2000).

A recente busca por plantas úteis do ponto de vista medicinal é decorrente, pelo menos em parte, da crise na medicina ocidental. Este fato é claramente

relacionado às desvantagens impostas pelos altos custos das drogas produzidas sinteticamente, além do binômio, efeitos limitados em patologias crônicas e ocorrência de efeitos colaterais e reações adversas. Em recente estudo, a Organização Mundial de Saúde estimou que 80 % dos países em desenvolvimento utilizam-se da medicina tradicional; destes, 85% fazem uso das plantas medicinais ou de seus derivados como substâncias potencialmente ativas em diversas patologias, incluindo distúrbios gastrointestinais (Sheldon *et al.*, 1997).

Atualmente, uma nova abordagem sobre a forma de investigação das plantas medicinais tem sido proposta visando objetivar a pesquisa a partir de matéria prima vegetal para obtenção de novos medicamentos, envolvendo técnicas de monitoramento químico de substâncias farmacologicamente ativas, presentes em extratos brutos ou em frações enriquecidas das espécies investigadas (Mcchesney, 1996).

Já há algum tempo é possível observar que, na pesquisa com plantas medicinais, para selecionar uma dada espécie a ser estudada, não basta apenas uma indicação popular de uso medicinal. No entanto, sabe-se, que os fatores etnofarmacológicos, quando levados em consideração, podem reduzir o erro de se iniciar o estudo de espécies ou substâncias farmacologicamente inativas para o tratamento de determinada patologia. Assim, para o estudo concreto e elaborado de novas moléculas farmacologicamente ativas a partir da utilização de plantas

medicinais, faz-se necessário, a conjunção de vários profissionais em equipes multidisciplinares, compostas por etnobotânicos, etnofarmacólogos, fitoquímicos, químicos orgânicos, bioquímicos, agrotecnólogos, farmacólogos e toxicologistas, além de alunos de pós-graduação em programas de mestrado e doutorado, envolvidos em um trabalho multidisciplinar e interativo, na busca de substâncias ativas com potencial terapêutico (Souza Brito, 1996; Souza Brito e Nunes, 1997). E, neste contexto, o desenvolvimento deste projeto buscou estabelecer a atividade farmacológica das espécies *Turnera diffusa* e *Turnera ulmifolia*, para o tratamento de distúrbios gastrointestinais de maneira geral.

Nos últimos anos, muitas substâncias puras ou extratos fracionados de origem vegetal tem sido citados como fonte de compostos com atividade antiulcerogênica. Os compostos obtidos de plantas, que possuem atividade antiulcerogênica, apresentam variadas estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação tem sido propostos para estes compostos. Entre as principais classes químicas de compostos com atividade antiulcerogênica encontram-se os terpenos, triterpenos, flavonóides, alcalóides e glicosídeos mas outras substâncias, incluindo-se saponinas e polissacarídeos também podem apresentar este tipo de atividade (Lewis e Hanson, 1991). Em geral, os compostos obtidos de plantas com atividade antiulcerogênicos exercem seu efeito estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, como por exemplo, aumentando a síntese de prostaglandinas e/ou

estimulando a secreção de muco e bicarbonato. Outro importante mecanismo estimulado por substâncias de origem vegetal seria a inibição da secreção ácida gástrica através da interação com diferentes receptores farmacológicos ou ainda, enzimas e hormônios, envolvidos com o processo secretor (Lewis e Hanson, 1991; Souza-Formigoni *et al.*, 1991; Borrelli e Izzo, 2000).

Assim, para o estudo da atividade farmacológica antiulcerogênica (preventiva ou curativa e seu possível mecanismo de ação), de compostos de origem vegetal ou não foram desenvolvidos diversos modelos experimentais, os quais possibilitam estudar o efeito destes compostos sobre distúrbios gastrointestinais. Os modelos disponíveis de indução experimental de úlceras em animais são múltiplos e podem ser conduzidos de diferentes formas, utilizando diversos agentes indutores. Estes modelos são frequentemente utilizados por diversos grupos de pesquisadores em todo o mundo, já que é possível garantir que eles reproduzem em animais, as mesmas lesões estabelecidas em humanos.

No método de úlceras induzidas pelo etanol, o contato direto deste agente com a mucosa gástrica, solubiliza o muco protetor deixando assim, a mucosa gástrica indefesa à ação hidrolítica e proteolítica do ácido clorídrico e da pepsina, respectivamente. Esta substância pode induzir ainda, a um aumento na secreção do ácido gástrico e por contato direto, alterar a rede de vascularização local e romper vasos sanguíneos que irrigam a mucosa gástrica desencadeando processo

necrotizante no tecido em contato (Mizui e Douteuchi, 1983; Lewis e Hanson, 1991; Tabata *et al.*, 1996; Evans, 1996;). Deste modo, a hipersecreção gástrica juntamente com a fragilidade da rede vascular e a dissolução da camada mucoprotetora da mucosa gástrica constituem os principais fatores envolvidos na instalação de uma úlcera induzida pelo etanol (Mizui e Douteuchi, 1983; Oates, 1988; Lewis e Hanson, 1991; Evans, 1996; Pandolfino *et al.*, 2000).

Já os modelos experimentais utilizados para avaliação de atividade antiulcerogênica que utilizam antiinflamatórios não esteroidais (DAINEs) como indometacina, aspirina, piroxicam e diclofenaco como indutores, baseiam-se no fato de que estas drogas têm, como principal mecanismo de ação, a inibição de enzimas denominadas ciclooxigenases (COX) e, é esta inibição inespecífica sobre as ciclooxigenases, o principal mecanismo responsável pelo aparecimento de lesões gástricas durante a execução destes modelos em animais e também em seres humanos (Robert *et al.*, 1979; Lewis e Hanson, 1991; Brunton, 1996; Wallace *et al.*, 2000).

As ciclooxigenases, de forma geral, geram como produto final autacóides importantes no desenvolvimento da resposta inflamatória e, dentre estes, encontram-se prostanóides de diferentes subclasses. Um destes, é a prostaglandina do tipo E₂ que, além de ser potente vasodilatadora e hiperalgésica, na mucosa gástrica, é capaz de inibir parcialmente a secreção do ácido clorídrico e garantir, em

grande parte, a manutenção do fluxo sanguíneo para esta mucosa (Robert, 1979; Wallace *et al.*, 2000). Esta mesma prostaglandina garante ainda, em grande parte, a produção e secreção de muco e bicarbonato para a mucosa; compostos fundamentais para a atividade citoprotetora conferida a esta substância. (Robert, 1979; Lewis e Hanson, 1991; Beck *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2000).

Portanto, quando esta cascata de formação de autacóides é interrompida pela ação inespecífica de DAINes sobre as ciclooxigenases, todos os benefícios exercidos pelas prostaglandinas na mucosa gástrica são revertidos, deixando a mucosa desprotegida à ação do ácido clorídrico e à pepsina. Estes agentes, em questão de minutos, levam ao aparecimento das lesões ulcerativas. Neste modelo, o agente parassimpatomimético associado à indometacina, atua como potente estimulante para uma maior secreção ácida, facilitando o desenvolvimento da lesão iniciada pelas DAINes, já que a associação destes agentes é necessária para induzir as úlceras em camundongos (Rainsford, 1987).

No modelo de úlcera induzida por estresse, as alterações circulatórias na mucosa gástrica constituem-se como um dos principais fatores para o início da lesão gástrica. A ação de substâncias constritoras nos vasos que irrigam o tecido gástrico e a consequente redução do fluxo sanguíneo que supre a mucosa gástrica, juntamente a outros problemas causados pela falta de irrigação tais como; dificuldades para drenagem do ácido clorídrico e uma diminuição do suprimento de

oxigênio para o tecido mucoso tornando-o mais frágil e susceptível à ação do ácido clorídrico e da pepsina, podem ser considerados como fatores essenciais para o desenvolvimento das úlceras induzidas pelo estresse em animais. Por outro lado, alterações fisiológicas desencadeadas pelo estresse também envolvem estímulos exacerbados da acetilcolina; esta substância em excesso acabaria por promover uma liberação descontrolada de histamina armazenadas nas células “enterocromafin-like” na porção glandular do estômago; assim, histamina e acetilcolina, em conjunto, constituiriam os principais responsáveis pela hipersecreção ácida também observada durante a execução dos modelos de indução de úlceras gástricas por estresse. Ácido clorídrico aumentado e por sua vez, a pepsina, atuando sobre a mucosa fragilizada, iniciariam e/ou promoveriam o desenvolvimento da lesão gástrica neste modelo experimental (Yano *et al.*, 1978; Raffatullah *et al.*, 1990; Lewis e Hanson, 1991; Hirschowitz *et al.*, 1995; Evans, 1996; Bruton, 1996; Wolfe e Sachs, 2000).

O método de ligadura de piloro modificado foi estabelecido também no intuito de verificar uma possível atividade sistêmica dos compostos presentes nas amostras vegetais, já que neste modelo as amostras em estudo, são administradas por via intraduodenal. Apesar da não determinação do Índice de Lesões Ulcerativas (ILU), a realização deste modelo é de grande importância para a avaliação antiulcerogênica de compostos de origem natural e sintética, principalmente se seus

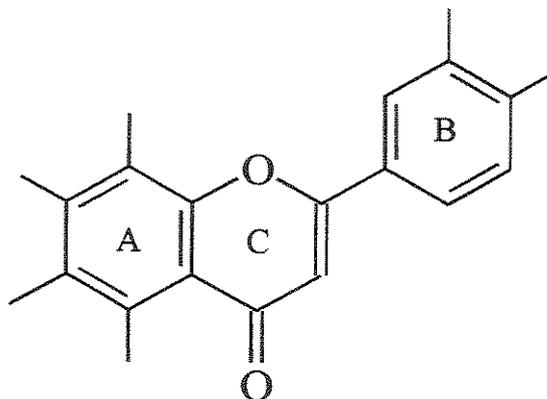
resultados forem analisados juntamente aos resultados obtidos nos modelos de estresse, etanol e indometacina. Mesmo que indiretamente, os resultados obtidos no modelo de ligadura de piloro em camundongos, podem direcionar os estudos dos possíveis mecanismos de ação antiulcerogênico para as amostras vegetais e/ou substâncias isoladas.

O método de ligadura do piloro quando realizado em ratos induz lesões gástricas principalmente pelo estímulo mecânico do conteúdo gástrico sobre a mucosa gástrica (Shay *et al.*, 1945; Lewis e Hanson, 1991). O acúmulo de ácido e do conteúdo gástrico em geral promovido pela obstrução do piloro gera, entre outros fatores, distensão exagerada da mucosa, além de hipersecreção ácida promovida pela liberação de acetilcolina proveniente de ramificações do nervo vago na mucosa gástrica. A acetilcolina, induziria a secreção de ácido clorídrico atuando em receptores presentes nas células parietais. Ainda, de forma indireta, a acetilcolina promoveria a liberação de histamina e gastrina pelas células “enterocromafin-like” e células (G) de gastrina, respectivamente, que iriam estimular também a secreção ácida, por sua ação respectiva, em receptores histamínicos (H_2) e de colecistoquinina (CCK-B), presentes nas células parietais da mucosa gástrica (Shay *et al.*, 1945; Lewis e Hanson, 1991; Raffatullah *et al.*, 1994, Hirschowitz *et al.*, 1995; Pandolfino *et al.*, 2000). Entretanto, não foi possível até o momento, em nossas condições experimentais, obter lesões ulcerativas passíveis de

determinação com este modelo, utilizando-se camundongos na experimentação. No entanto, parâmetros da secreção gástrica tais como pH, volume e concentração de íons H^+ do conteúdo gástrico podem ser devidamente avaliados, quando se utiliza camundongos na experimentação. Assim, a avaliação destes parâmetros, é de grande importância para nossos estudos, já que possíveis alterações auxiliam e/ou fundamentam resultados obtidos em outras metodologias.

1.2. Flavonóides como uma nova fonte de moléculas farmacologicamente ativas

Flavonóides são um grupo de substâncias químicas polifenólicas, com baixo peso molecular, constituídos de três anéis fenólicos centrais referidos como A, B e C ou anéis de pirano.



Estrutura química 1: Esqueleto básico dos flavonóides

As atividades bioquímicas e farmacológicas dos flavonóides e de seus metabólitos depende de sua estrutura química e de uma relativa orientação dos componentes ligados à sua estrutura principal. Os flavonóides são classificados de acordo com sua estrutura química. As maiores classes de flavonóides incluem os flavonóis, as flavonas, flavononas, catequinas (ou flavanol) antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonas e as chalconas. Estas classes surgem de acordo com variações que ocorrem nas ligações de radicais em diferentes locais dos anéis centrais de um flavonóide. Assim, a estrutura dos flavonóides pode variar amplamente dependendo dos processos de substituição no seu anel principal, os quais podem incluir processos de hidrogenação, hidroxilação, metilação, malonilação, sulfatação e glicosilação (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999; Zuanazzi, 1999; Harbone e Willians, 2000). Muitos flavonóides ocorrem naturalmente como flavonóides glicosilados e a substituição de carboidratos nos anéis centrais também é comum; elas incluem principalmente ligações dos anéis com D-glucose, L-raminose, glucoramnose, galactose, ligninas, arabinose e outros diferentes açúcares. Porém, flavonóides também podem ser encontrados naturalmente em vegetais na forma de aglicona, ou seja, sem açúcares ligados aos anéis centrais. No entanto, independentemente da ligação com açúcares, diferentes flavonóides tem se mostrado farmacologicamente ativos em diversos processos patológicos. Quercetina e rutina, tem sido os flavonóides mais comumente

utilizados e estudados em relação à sua atividade biológica na forma desprovida de açúcar (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999).

A prevalência de flavonóides no reino vegetal não é acidental; eles não somente atuam como pigmentos de coloração nas flores como também podem ser precursores de outras substâncias protetoras relacionadas ao sistema de defesa dos vegetais, principalmente, contra a radiação ultravioleta proveniente da luz solar. Nos vegetais, estes compostos são também capazes de quelar metais tóxicos e causar a redução de alguns agentes oxidantes lesivos ao mesmo, preservando assim sua integridade em relação, principalmente, a alterações químicas e físicas relacionadas às variações do meio ambiente no qual está inserido. Em adição, flavonóides estão envolvidos em processos de fotosensitização, transferência de energia, morfogênese, determinação do sexo das plantas, níveis de respiração e no processo de fotossíntese da maioria dos vegetais. (Zuanazzi, 1999; Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999; Harbone e Willians, 2000).

Mesmo com o significativo efeito farmacológico dos flavonóides em diferentes patologias, principalmente coronárias, informações sobre sua absorção, metabolismo e excreção em humanos são ainda escassas. Alguns estudos já relataram que flavonóides são absorvidos pelo trato gastrointestinal depois de terem sido oralmente administrados, embora outros estudos concluam que estes compostos teriam pouca absorção, não alcançando ou alcançando em pequenas

concentrações, a circulação sistêmica (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999; Harbone e Willians, 2000). Mesmo com ressalvas, os flavonóides já demonstraram diferentes atividades biológicas em uma grande maioria, úteis para a prevenção ou tratamento de determinadas patologias. Por exemplo, já foi relatado que estes compostos são usados terapêuticamente na como protetores da integridade vascular, como agentes anti-osteoporóticos e também como anti-hepatotóxicos. Vários flavonóides vem sendo experimentados em relação à sua atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Diversos flavonóides tem sido relatados ainda para atuarem como moléculas protetoras no trato gastrointestinal e como agentes antiulcerogênicos além de antiespasmódico, antsecretório e antidiarréico (Di Carlo *et al.*, 1999).

Por fim, vários flavonóides já foram descritos como providos de potente atividade antiinflamatória a qual estaria principalmente relacionada à capacidade destes compostos em inibir o processo inflamatório interagindo com o metabolismo das vias das enzimas cicloxigenases e lipoxigenases, além de sua possível interação com mecanismos relacionados à síntese do óxido nítrico e seus efeitos vasodilatadores (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999; Harbone e Willians, 2000). Estas substâncias, atuando em conjunto, levariam à formação e migração de importantes mediadores do complexo processo da inflamação (Wallace *et al.*, 2000).

Um dos mais importantes efeitos colaterais das drogas antiinflamatórias convencionais é seu potencial ulcerogênico em virtude da inibição da liberação de prostaglandinas responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica. Flavonóides com potente atividade antiinflamatória são capazes também, em alguns casos, de proteger a mucosa gástrica contra uma variedade de agentes ulcerogênicos. Atualmente, muitos estudos têm sido realizados examinando a atividade antiulcerogênica de flavonóides naturais e também daqueles obtidos em processos semi-sintéticos. Nos últimos anos, alguns trabalhos descrevendo o potencial antilcerogênico de flavonóides isolados, frações enriquecidas ou extratos, contendo diferentes flavonóides em sua composição foram realizados (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999; Harbone e Willians, 2000; Borrelli e Izzo, 2000). Um exemplo interessante é o do solon, um flavonóide sintético derivado do sofaradina (flavonóide originalmente isolado de uma planta utilizada tradicionalmente na medicina popular chinesa, a *Sophora subprostata*), apresenta boa atividade antiulcerogênica devido aos seus efeitos gastroprotetores. O exato mecanismo de ação relacionado a esta atividade não foi totalmente elucidado mas foi proposto que este flavonóide exerceria um efeito modulador no metabolismo das prostaglandinas na mucosa gástrica, provavelmente, mantendo sua integridade, impedindo assim, o aparecimento das lesões ulcerativas (Konturek *et al.*, 1986). Um significativo efeito do 8 hipolaetin-8-glicosídeo, um flavonóide presente em

várias espécies do gênero *Sideritis* também foi relatado com propriedades semelhantes (Villar *et al.*, 1984).

Outros flavonóides já foram descritos como sendo capazes de exercer atividade antiulcerogênica; entre estes destacam-se rutina e narigina além da quercetina, kaempferol e sofaradina (Lewis, 1992; Di Carlo *et al.*, 1999; Harbone e Willians, 2000; Borrelli e Izzo, 2000). Em experimentos usando modelos de indução de úlcera gástrica em ratos a rutina, narigina e a quercetina demonstraram significativo efeito antiulcerogênico. Os autores sugeriram que o efeito gastroprotetor da rutina poderia ser explicado, em parte, através da indução da formação de um complexo citoprotetor na mucosa gástrica que não dependeria das prostaglandinas, mas sim do aumento de glicoproteínas e do aumento da viscosidade do muco protetor na mucosa gástrica, por ação direta dos flavonóides sobre a mucosa gástrica. Estes mesmos autores fundamentaram ainda uma possível propriedade de “varredores” de radicais livres, a qual poderia também contribuir para a atividade antiulcerogênica demonstrada por este flavonóide (Di Carlo *et al.*, 1999).

Outro estudo descreve que a quercetina também é efetiva em inibir o aparecimento das lesões ulcerativas em roedores. No entanto, para este composto foi postulado que os efeitos citoprotetores sobre a mucosa gástrica aconteceriam através de um complexo mecanismo envolvendo, de um lado, a estimulação da

síntese de prostaglandinas citoprotetoras e aumento na produção do muco protetor, e de outro, a inibição da formação de leucotrienos nesta mucosa. As propriedades antioxidantes da quercetina também foram sugeridas como auxiliar no mecanismo de inibição das lesões ulcerativas (Di Carlo *et al.*, 1999).

Também foi recentemente relatado que a “camomila” (*Chamomilla recutita* L.), uma planta geralmente utilizada no Brasil para o tratamento da inflamação e casos de irritação moderada do sistema gastrointestinal, apresenta em sua composição, além dos clássicos óleos voláteis como o alfa bisabolol e o potente antiinflamatório camazuleno, a presença de flavonóides, sendo os principais a apigenina e, em menor quantidade, a luteolina e quercetina (Brown e Datner, 1998). Ainda, foi relatado por Volhardt, (2000) que a apigenina e seu precursor a apigenina-7-glicosídeo, além da quercetina isoladas deste mesmo vegetal, seriam providas de potente atividade antioxidante *in vitro*.

Além da “camomila”, estudos realizados com o “alcaçuz” (*Glycyrriza glabra* L.) uma planta com propriedades antiulcerogênicas comprovadas, relataram que em sua composição química existem cerca de trinta diferentes flavonóides, os quais compreendem 1 % dos constituintes químicos deste vegetal. Foi descrito também que este vegetal, além de todas as propriedades já relatadas, seria também capaz de diminuir a geração de espécies reativas de radicais de oxigênio induzidas por neutrófilos humanos em um tecido lesado (Dwech, 1996; Akamatsu *et al.*, 1991;

Shibata *et al.*, 1991). Desta forma, seria possível propor que a atividade antioxidante apresentada por estes dois vegetais poderia, ao menos em parte, contribuir com atividade protetora sobre o sistema digestivo, já que a inibição da formação de radicais livres tem sido constantemente relacionada à atividade citoprotetora gastrointestinal, para diversas espécies com flavonóides em sua constituição (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999).

A ação de flavonóides na regulação da secreção ácida e na síntese de prostaglandinas e também sobre a bactéria *H. pylori* também tem sido relatada experimentalmente. Alguns autores encontraram que flavonas, flavononas e a quercetina foram eficientes em inibir o desenvolvimento de úlceras causadas pelo *H. pylori* e também aquelas causadas pelo aumento da liberação de ácido clorídrico pela célula parietal em resposta a um estímulo exacerbado da histamina. Estes flavonóides teriam sido eficazes em inibir a bomba $H^+/K^+/ATPase$ no canalículo secretor da célula parietal, mecanismo este que seria responsável pela diminuição da produção do ácido clorídrico na mucosa gástrica, auxiliando na redução do processo de lesão. Também foi relatado que diferentes flavonas e flavononas seriam eficazes em aumentar a liberação de prostaglandinas E_2 na mucosa gástrica de roedores, contribuindo para a inibição dos processos ulcerativos desta mucosa, na presença de um agente lesivo (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999).

De forma geral, a maioria dos autores concluem que, devido à baixa toxicidade relacionada à administração de flavonóides para animais de laboratório, e devido as suas diversas propriedades terapêuticas sobre o trato gastrointestinal demonstradas experimentalmente (efeito antisecretório, estimulador da síntese de prostaglandinas e inibidor da *H. pylori*, além de efeitos antiinflamatórios clássicos) que, flavonóides representariam uma nova e promissora classe terapêutica para diferentes processos patológicos (Lewis, 1992; Cook e Samman, 1996; Zuanazzi, 1999; Di carlo *et al.*, 1999; Harbone e Willians, 2000; Borrelli e Izzo, 2000).

1.3. Turneras

O gênero *Turnera* pertence à família Turneraceae e compreende as mais variadas formas de vegetais, desde ervas até árvores, com predominância de sub-arbustos e arbustos (Schultz, 1973). Esta família é representada por nove gêneros e cerca de noventa espécies.

A *Turnera diffusa* é conhecida popularmente no Brasil e em vários países da América do Sul e América Central como Damiana; no entanto, conhece-se por este nome as seguintes espécies da família das Turneraceas: *Bohadschia humifera* Presl, *Triacis microphilla* Griseb, *Turnera aphrodisiaca* Ward, *T. humifusa* Endl, *T. microphilla* Desv. e *T. pringlei* Rose (Pio Correa, 1984).

Esta espécie é um arbusto pubescente muito ramoso de até 2 m de altura; apresenta ramos delicados, folhas pecioladas, mais ou menos ovado-rombeas, espatuladas ou oblanceoladas, obtusas ou agudas, quase sempre cuneadas na base, com 1-2 cm de comprimento, crenado-serradas ou duplo dentadas, revolutas nas margens, profundamente nervadas e pubescentes ou glabras na página superior e tomentoso-pubescentes ou apenas pilosas na página inferior; os pedúnculos são muito curtos; as flores são amarelas com 8-12 mm, o cálice tomentoso, pentadentado, pétalas espatuladas, estames curtíssimos; os fruto tem cápsula subglobosa com 4-5 mm. A planta é aromática e de sabor agradável; encerra óleo essencial amargo e adstringente, com sabor de cânfora (Pio Corrêa, 1984).

Encontrada praticamente em todo a América, no Brasil, a *Turnera diffusa*, aparece livremente em campos e jardins, desde o Amazonas até São Paulo (Pio Corrêa, 1984), mas a cada dia torna-se mais difícil encontrá-la em nosso território. No México e em Cuba, índios utilizam a planta inteira de *Turnera diffusa*, na forma de extrato aquoso como expectorante, diurético, afrodisíaco e para o tratamento de espermatorrêia, otites e nefrites (Fryer, 1965; Perez *et al.*, 1984). Em diversas regiões o decocto de folhas secas de *T. diffusa* é utilizado para o alívio de distúrbios do sistema digestivo (Weniger *et al.*, 1986; Ishikura, 1982; Kraig, 1976; Pio Corrêa, 1984).

A *Turnera ulmifolia* L., conhecida popularmente como chanana ou albina, aparece como um sub-arbusto silvestre encontrado principalmente em terrenos

arenosos. Esta espécie é frequentemente cultivada em pátios e jardins e apresenta diversas formas, que variam no tamanho e na cor das flores, na forma e pubescência das folhas. É uma planta arbustiva, erecta, ramificada, de 30 a 90 cm de altura. As folhas são lanceoladas a ovado-oblongas, delgadas, curtamente pecioladas, de 1 a 11 cm, asserradas, agudas ou acuminadas no ápice e, em sua maioria, estreitas na base glandular. As flores são axiliares, os pedúnculos são curtos e as brácteas podem ter a mesma largura ou serem mais largas que o cálice, lanceoladas, aserradas em sua parte baixa. O cálice é profundamente penta-lobado, com seis segmentos lanceolados, agudos ou acuminados. As pétalas são oblongas com 1 a 3 cm, inseridas no meio do cálice. Os estames são quintuplos e as anteras são alargadas e erectas. Os ovários são sésseis com estilos duplos no ápice. As placentas são triplas com cápsula de 6 a 10 mm de largura (Roig, 1988). A maior ocorrência da *T. ulmifolia* é na América Tropical; porém a espécie pode também ser encontrada na África e na Ásia. A chanana é encontrada, de forma espontânea, das Guianas até o sudeste do Brasil, sendo considerada invasora em algumas áreas (Pio Correa, 1984).

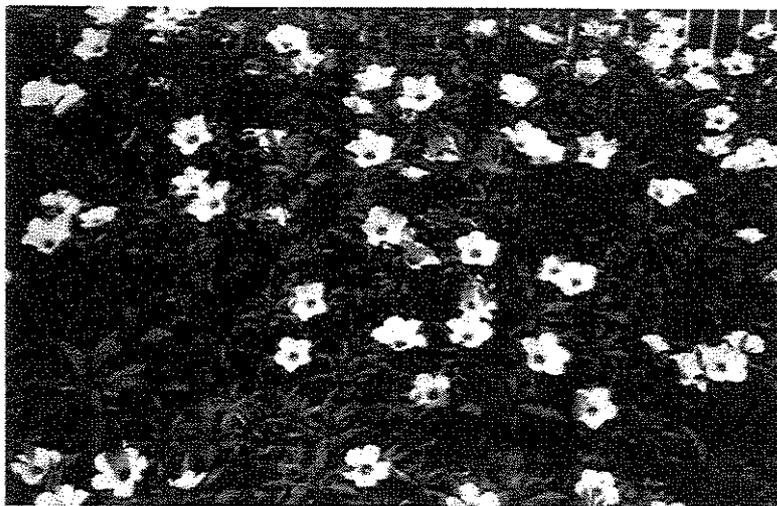
O chá de *T. ulmifolia* preparado utilizando-se a planta inteira, é indicado para mulheres em período de pós-parto e para aquelas que apresentam amenorréia (Ayensu, 1978). Em Cuba, o extrato aquoso a quente das flores é utilizado para o alívio de cólicas menstruais (Roig e Mesa, 1945); na Jamaica, o extrato aquoso das folhas é

utilizado como antipirético (Asprey e Thornton, 1955); na Colômbia, o decocto das folhas é utilizado como abortivo (Garcia-Barriga, 1975).

Foto das Plantas



Turnera diffusa



Turnera ulmifolia

Algumas atividades farmacológicas do gênero *Turnera* foram, em algumas oportunidades, descritas por diferentes autores. Os extratos etanólico e aquoso das raízes secas de *Turnera* sp apresentaram atividade hipotensora, sendo que apenas o extrato etanólico demonstrou ação relaxante muscular lisa em duodeno de coelho e estimulante no útero de rata (Vieira *et al.*, 1968). O extrato diclorometano, obtido a partir de folhas secas de *T. acuta*, apresentou atividade antimutagênica na concentração de 600 ug/placa (Wall *et al.*, 1988); o extrato etanólico, obtido a partir de folhas e caules frescos mostrou ações espasmogênicas em íleo de cobaio e vasodilatadora em ratos (Nakanishi *et al.*, 1965).

Estudos fitoquímicos da espécie *T. diffusa* detectaram 0,15 a 0,17% de arbutina benzenóide nas folhas (Tantisewie *et al.*, 1969); Outro estudo demonstrou a presença de 0,16% do flavonóide gonzalitosina, 0,008% do alceno hexacosano-1-ol, 0,0033% do esteróide beta-sitosterol, 0,013% do alceno triacontano, nas partes aéreas (Dominguez e Hinojosa, 1976); o alceno tricosano-2,1 foi isolado da planta inteira (Fryer, 1965), enquanto que do óleo essencial extraído das folhas isolou-se 11 % do monoterpene cineol-1,8, 1,8% do monoterpene p-cimeno, 2,0% do monoterpene (-) alfa-pineno, 1,0% de monoterpene (-)beta-pineno (Auterhoff e Haufel, 1968 a e b).

Das folhas e caule da *Turnera* sp isolou-se 0,08% de deidaciclina alicíclica (Spencer e Seigler, 1980), 2,4 $\mu\text{mol/g}$ de ciclopentanil glicina (Tober e Conn,

1985). Do óleo extraído das sementes detectou-se 1,0% de ácido láurico, 25,5% de ácido linoléico, 5,6% de ácido malválico, 1,0% de ácido mirístico, 13,8% de ácido oléico, 18,4% de ácido palmítico, 2,4% de ácido palmitoléico, 5,6% de ácido esteárico, 4,3% de ácido esterculínico e 22,3% de ácido vernólico (Hosamani, 1993). Foi detectada a presença de 1,0 a 1,2% de cafeína em sementes de *T. ulmifolia* variedade *angustifolia* (Tarab e Patil, 1979); da variedade *elegans* isolou-se 0,1 a 0,22% do mesmo alcalóide (Freise, 1935).

Em estudos realizados previamente, foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico (EH) 70% de *T. ulmifolia*, uma fração aquosa e uma fração hidroalcoólica intermediária apresentaram significativa atividade antiulcerogênica em diversos modelos de úlcera gástrica induzida em ratos. O extrato aquoso e o EH de *T. ulmifolia* não produziram sinais de toxicidade em doses superiores a 10 g/kg, por via oral (Antônio e Souza-Brito, 1998). Recentemente, o fracionamento do infuso de *T. ulmifolia*, seguido da purificação das frações resultou na obtenção de três diferentes compostos derivados de flavonas. Comparação com dados de literatura (Agrawal, 1989; Cody e Harbone, 1996) mostraram que estes compostos eram flavonas C-glicosiladas derivadas de luteolina e apigenina, ainda não estudadas farmacologicamente.

II- Objetivos

Considerando-se: a) as indicações e utilização popular de *Turnera ulmifolia* e *Turnera diffusa* para o tratamento de inflamações e problemas digestivos em geral; b) os critérios utilizados na seleção das espécies; c) a importância farmacológica de se estudar substâncias potencialmente ativas em úlceras e inflamações gastrointestinais; d) as informações químicas preliminares descritas para cada espécie selecionada e, por último, e) os resultados farmacológicos antiulcerogênicos e toxicológicos preliminarmente obtidos, demonstrando baixa toxicidade e elevada eficácia do gênero *Turnera* para o tratamento de úlceras em geral, foram objetivos deste trabalho:

- 1) Determinar os possíveis efeitos toxicológicos das amostras obtidas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, no intuito de dar respaldo científico à sua utilização popular;
- 2) Avaliar a atividade antiulcerogênica dos extratos de diferentes polaridades e dos infusos obtidos a partir das partes aéreas das espécies selecionadas, administrados por via oral ou intraduodenal, em modelos clássicos de indução de úlcera gástrica em camundongos;
- 3) Avaliar a atividade antiulcerogênica dos infusos obtidos a partir das partes aéreas das espécies selecionadas em relação a úlcera duodenal induzida por cisteamina em ratos;

- 4) Avaliar a atividade antiinflamatória dos infusos obtidos a partir das partes aéreas das espécies selecionadas em relação à colite aguda induzida por ácido trinitrobenzóico acético em ratas;
- 5) Avaliar a atividade farmacológica curativa dos infusos obtidos a partir das partes aéreas das espécies selecionadas em relação à úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos;
- 6) Avaliar o possível mecanismo de ação antiinflamatório relacionado à prevenção da colite aguda induzida pelo ácido trinitrobenzóico acético em ratas;
- 7) Avaliar o possível mecanismo de ação antiulcerogênico relacionado à prevenção das úlceras gástricas induzidas por diferentes agentes em camundongos;
- 8) Identificar nos infusos obtidos a partir das partes aéreas das espécies selecionadas os compostos responsáveis pelas atividades farmacológicas obtidas;
- 9) Comparar as atividades farmacológicas, toxicológicas e fitoquímicas obtidas para cada uma das espécies, buscando fundamentos para sugerir o gênero *Turnera* como uma nova fonte de flavonóides farmacologicamente ativos para o tratamento de distúrbios gastrointestinais de maneira geral.

III - MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Coleta e identificação das espécies em estudo

A espécie *T. ulmifolia* L. foi coletada em 1999 pela Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima na cidade de Porto Nacional, Tocantins, Brasil e foi identificada e autênticada pela Dra. Solange de Fátima Lolis do Instituto de Biologia e Saúde Pública do Instituto de Biologia da Universidade do Tocantins. A excicata foi depositada no herbário desta mesma universidade sob o número 0071.

A espécie *T. diffusa* Willd. foi coletada pela equipe de botânicos do “Centro de Investigación Científica del Yucatan” na cidade de Quintana Roo, Mexico, em janeiro de 2000. A excicata foi depositada no herbário desta mesma instituição sob sigla C. Chan 3773.

3.2. Extração e preparação dos extratos de diferentes polaridades de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*

A partir das partes aéreas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* foi efetuada, em conjunto com a equipe do Prof. Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, a extração do material utilizado na primeira etapa do projeto.

As partes aéreas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, depois de secas e devidamente trituradas em moinho de fâcas foram colocadas em contato com os solventes em ordem crescente de polaridade na proporção de 500 g de matéria prima vegetal para 2 litros de solvente. Após

sete (7) dias de extração com cada solvente, foi realizada a filtração do conteúdo obtido e a concentração do mesmo, feita logo a seguir por evaporação em rotaevaporador a 45 °C.

O material obtido resultou em um extrato hidroalcoólico 70 %; um extrato alcoólico 100 % e um extrato diclorometano para a espécie *T. diffusa* sendo estes codificados como EHd 70 %, EAd 100 % e EDCMd, respectivamente. Para a espécie *T. ulmifolia* foram obtidos um extrato alcoólico 100 %; um extrato diclorometano e um extrato hexânico, os quais foram codificados como EAu 100 %, EDCMu e EHXu, respectivamente.

3.3. Extração e preparação dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*

Novamente em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Wagner Vilegas; do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, foi realizado o processo de obtenção dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*.

Depois de secas e devidamente trituradas em moinho de faca, as partes aéreas de ambas as espécies passaram por um processo de extração em água fervente (100 °C) durante 15 min na proporção de 50 g de matéria prima vegetal para 500 ml de água ou uma solução a 10 %. Em seguida, após resfriamento em temperatura ambiente, o material foi filtrado e levado ao liofilizador. O rendimento aproximado do infuso liofilizado obtido de *T. diffusa* foi de aproximadamente 4 % e o do infuso de *T. ulmifolia* de 7,5 %.

Ensaio cromatográficos confirmaram a fidelidade de composição das diferentes preparações dos infusos durante a realização do projeto (dados não demonstrados).

3.4. Animais utilizados nos ensaios biológicos

Para a determinação da atividade antiulcerogênica das amostras obtidas de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* e posterior determinação da quantidade muco livre produzido, foram utilizados, camundongos, Swiss, albinos com peso adequado à cada metodologia. Nos testes de determinação da atividade antiulcerogênica duodenal, determinação da atividade curativa e no ensaio para avaliação da produção de prostaglandinas na mucosa gástrica foram utilizados ratos, Wistar, albinos, machos, albinos com peso adequado à cada metodologia.

Todos os animais foram aclimatados às condições do biotério por pelo menos 7 dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclos claro-escuro de 12 h controlados. Os animais foram alimentados com ração nuvital (Nuvilab) e 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 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.

Especificamente para os experimentos de indução de colite aguda foram utilizadas ratas Wistar, fêmeas, com peso adequado a este método. Os animais foram fornecidas pelo “Laboratory of Service Animal” da Universidade de Granada, Granada, Espanha. Os animais foram randomicamente distribuídos em vários grupos experimentais em caixas com 4-8 animais, mantidos sob temperatura ideal e ciclo claro escuro de 12 h controlados, com livre acesso à água e ração (Panlab A.04). Os animais foram sempre deixados em jejum durante a noite e anestesiados pela manhã, quando em dias de experimentação.

3.5. Ensaio toxicológicos *in vivo*

3.5.1. Toxicidade aguda em camundongos após dose única

O teste para avaliação da toxicidade aguda dos extratos e infusos obtidos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* em dose única foi realizado de acordo com o método descrito por Souza-Brito (1994). Grupos de camundongos pesando entre 30 e 35 g foram tratados, em dose única, com 100, 500, 1000, 2500 e 5000 mg/kg de cada extrato de diferente polaridade e com os infusos obtidos de cada espécie em estudo. Procedeu-se à observação diária durante 14 dias consecutivos para avaliar alterações de peso corporal, consumo de água e ração, fezes e urina, bem como alterações dos pelos e mucosas, presença de diarreia, convulsões e estados de depressão ou excitação nervosa. O número de morte de animais em cada grupo, se alguma, é utilizada para

o cálculo e determinação da DL₅₀ (dose letal 50 %) conforme descrito por Litchfield e Wilcoxon (1949).

3.6. Ensaaios farmacológicos

Para avaliar a atividade antiulcerogênica das amostras vegetais de cada uma das espécies foram realizados experimentos de indução de úlcera gástrica em camundongos utilizando-se os modelos de; HCl/etanol, estresse por contenção e frio, indometacina e betanecol e ligadura de piloro. Os extratos de diferentes polaridades e os infusos foram 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 controles.

Cada um dos modelos experimentais foi realizado especificamente para cada grupo de amostra e seus respectivos controles (cimetidina ou lansoprazol como controle positivo) e o (Tween 80 ou NaCl 0,9 %) como controle negativo, solventes utilizados para a dissolução das diferentes amostras vegetais.

Em todos os experimentos de indução de úlcera gástrica as lesões ulcerativas foram contadas e classificadas de acordo com a severidade Szelenyi e Thiemer (1978); lesões nível 1 (pontos hemorrágicas < 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 de lesões ulcerativas (ILU) obtido através da equação:

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

3.6.1 Úlcera gástrica induzida por estresse em camundongos

A metodologia utilizada foi descrita por Levine (1971); no entanto, foram realizadas algumas modificações durante sua padronização em nosso laboratório. Após 36 h de jejum, camundongos pesando entre 40 ± 2 g foram tratados com os extratos de diferentes polaridades obtidos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* em dose de 100 mg/kg, com cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e Tween 80 a 12 % (controle negativo), por v.o. (10 ml/kg), 30 min. antes da indução da lesão gástrica por estresse. O estresse foi produzido através da imobilização das patas dianteiras e traseiras do animal. Estes foram então colocados no interior de contêntores de PVC com 9 cm de comprimento x 3,5 cm de diâmetro e levados à geladeira (4° C), por um período de 4 h. Após este tempo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura para contagem e classificação das lesões gástricas. Em outro momento, este mesmo experimento foi realizado, porém, realizando-se o pré-tratamento dos animais com os infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* em doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg, utilizando-se cimetidina (100 mg/kg) como controle positivo e salina 0,9 % como controle negativo.

3.6.2. Úlcera gástrica induzida por HCl-Etanol

Este método foi realizado conforme descrito por Mizui e Doteuchi (1983). Após 24h de jejum, os grupos experimentais foram tratados 50 min. antes da indução de lesão gástrica. Grupos de animais receberam lansoprazol 30 mg/kg (controle positivo), Tween 80 a 12 % (controle negativo) e os extratos de diferentes polaridades obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* na doses de 100 mg/kg. Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose-volume final de 10 ml/kg.

A lesão gástrica foi induzida pela administração oral de 0,2 ml de uma solução 0,3M HCl / etanol 60 %. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 1 hora após a administração do agente lesivo; 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 de lesões ulcerativas (ILU). Em outro momento, este mesmo experimento foi realizado, porém, fazendo-se o pré-tratamento dos animais com os infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* em doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg, utilizando-se lansoprazol (30 mg/kg) como controle positivo e salina 0,9 % como controle negativo.

3.6.3. Úlcera gástrica induzida por antiinflamatório não esteroidal associada a um agente parassimpatomimético

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Rainsford (1987). Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando 30 ± 2 g, deixados em jejum por um período de 36h. A estimulação parassimpática foi realizada pela administração i.p. de betanecol, na dose de 5mg/kg, preparado em solução 0,15M de NaCl, estéril. Indometacina, preparada em solução estéril de 5% de NaHCO₃, foi administrada concomitantemente ao betanecol na dose de 30 mg/kg, por via intraperitoneal. Os tratamentos com os extratos de diferentes polaridades (100 mg/kg), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e Tween 80 a 12 % (controle negativo) foram realizados 30 minutos antes da administração dos agentes indutores, por via oral. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 4 h após o estímulo lesivo. Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da maior curvatura para a contagem das lesões e determinação do ILU. Em outro momento, este mesmo experimento foi realizado, porém, fazendo-se o pré-tratamento dos animais com os infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* em doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg, utilizando-se cimetidina (1000 mg/kg) como controle positivo e salina 0,9 % como controle negativo.

3.6.4. Análise dos parâmetros bioquímicos do estômago de camundongos submetidos à ligadura do piloro

Algumas modificações foram realizadas no método de ligadura de piloro descrito por Shay (1945) para ratos, no intuito de padronizá-lo para camundongos. Após 36 h de jejum os animais, sob anestesia de éter, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para localização e amarradura do piloro. A administração dos extratos de diferentes polaridades (100 mg/kg) ou cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e NaCl 0,9 % (controle negativo), todos em dose-volume final de 10 ml/kg, foi realizada logo após a amarradura, por via intraduodenal (Morimoto, 1991). Procedeu-se então as suturas das incisões logo após a administração. Quatro horas após a cirurgia os camundongos foram sacrificados, a incisão reaberta e, após ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico), o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida, foi determinado pesando-se todo conteúdo. Este conteúdo foi expresso em mg, sendo a quantidade total de substâncias presentes no estômago após a amarradura. O pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica também foram determinados. Para tal, adicionou-se água destilada ao conteúdo do estômago até completar um volume de 10 ml; esta solução foi então centrifugada por 10 min. a 3000 rpm e o sobrenadante titulado com NaOH 0.01 N em bureta digital modelo EM-burette, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração total de

ácido foi expressa em mEq/ml/4h. O pH foi determinado em pHmêtro modelo PA 200. Em outro momento, este mesmo experimento foi realizado, porém, fazendo-se o tratamento dos animais com os infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* em doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, utilizando-se cimetidina (1000 mg/kg) como controle positivo e salina 0,9 % como controle negativo.

3.6.5. Colite aguda induzida por TNBA em ratas

Os experimentos para indução de Colite em ratas foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Morris *et al* (1989). Ratas Wistar fêmeas, com peso entre 180-220 g, foram utilizadas. Os animais foram sempre deixados em jejum durante a noite e anestesiados pela manhã quando em dias de experimento. Sob anestesia, os animais receberam 30 mg de TNBA dissolvidos em 0,25 ml de etanol a 50 % (v/v), por via retal, através de uma cânula de teflôn de 8 cm de comprimento. Diferentes grupos de animais receberam, por via oral, salina 0,9 % e doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg da infusão de *Turnera ulmifolia* e de 250 e 500 mg/kg da infusão de *Turnera diffusa* durante 5 dias antes da indução da colite aguda pelo TBNS e 24 horas depois da indução. Todas as amostras vegetais testadas foram sempre suspensas em salina 0,9% e administradas em volume final de 1 ml. Os animais foram sacrificados 48 horas depois da administração do agente indutor da colite para determinação do índice de lesão e preparação das amostras de

cólon para determinação dos parâmetros bioquímicos. Um grupo de animais foi utilizado como grupo “sham”.

3.6.6. Determinação do índice de lesão colônica

Os animais foram sacrificados 48 horas depois da administração do TNBA e o cólon de cada animal foi totalmente removido. O segmento colônico foi devidamente limpo e uma porção de 2 g deste segmento foi separada. Esta porção foi aberta longitudinalmente e, inicialmente, uma contagem macroscópica das lesões foi feita por dois observadores atribuindo pontos de 1 a 10, dependendo do tipo de lesão encontrada, e o índice de lesão foi determinado conforme o método descrito por Morris *et al* (1989). Após a determinação do índice de lesão, a referida porção do cólon foi subseqüentemente dividida em 4 porções idênticas para futura determinação de parâmetros bioquímicos. Um dos fragmentos foi pesado e congelado a -30 °C para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO). Outro segmento foi pesado e congelado em 1 ml de solução de ácido tricloroacético a 5 %, para determinação do conteúdo de glutathiona total. Os dois segmentos restantes foram imediatamente processados após a contagem das lesões, para futura determinação de leucotrienos B₄ (LTB₄) e interleucina 1 β (IL-1 β), respectivamente, por kit imunoenzimático (os dois últimos ensaios não foram realizados).

3.6.7. Determinação de glutathiona total

O total de glutathiona foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Andersen (1985). As amostras de cólon previamente armazenadas, obtidas de cada rata lesada com TNBA, pré-tratadas com o infuso de *T. ulmifolia* em doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg ou com o infuso de *T. diffusa* em doses de 250 e 500 mg/kg, e também amostras de cólon de animais tratados com salina e do grupo “sham”, foram descongeladas e picotadas com tesoura. Em seguida foram homogenizadas adicionando-se TCA (ácido tricloroacético) à 5 % na relação 1:20 (peso da amostra : volume de TCA). O homogenizado obtido foi centrifugado a 4000 rpm a 4°C durante 10 min. Após, 1ml do sobrenadante foi recolhido em ependorfe e novamente centrifugado a 10000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação da concentração de glutathiona total, utilizando-se um leitor de placa (Bio Rad - microplate Reader – Benchmark) 412 nm, durante 3 min. Os resultados obtidos foram expressos como a quantidade de nanomoles de glutathiona total produzida, por grama de tecido utilizado. A porcentagem de aumento da concentração de glutathiona total foi calculada em relação à quantidade de glutathiona produzida pelas amostras obtidas dos animais do grupo tratado com salina.

3.6.8. Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase foi determinada de acordo com a técnica descrita por Krawisz *et al* (1984). As amostras de cólon previamente armazenadas, obtidas de cada rata lesada com TNBA, pré-tratada com o infuso de *T. ulmifolia* em doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg e com o infuso de *T. diffusa* em doses de 250 e 500 mg/kg, e também amostras de cólon de animais tratados com salina e do grupo “sham” foram descongeladas e ressuspensas em 1 ml de tampão fosfato a 50 mM, incorporado com brometo de hexadeciltrimetilamonio (pH=6.0) e picoteadas com tesoura por 15 seg sob uma placa fria. O produto resultante foi subsequentemente diluído em proporção 1:20 (peso/volume) com tampão fosfato, homogenizado e sonificado por 10 seg, logo após a completa homogeneização. Em seguida, esta solução foi submetida a 3 processos de congelamento e descongelamento, em dias consecutivos. Ao final do último processo de descongelamento, os homogenizados foram centrifugados por 7000 rpm a 4 °C durante 10 min e o sobrenadante (100 ul) foi utilizado para a determinação dos níveis de MPO utilizando-se 0,0005% de peróxido de hidrogênio como substrato para reação e orto-dianisidine dihidroclorídrica (0,169 mg/ml) como marcador para a reação de oxidação, em 3 ml de tampão fosfato a 50 nM (pH 6.0). A atividade enzimática foi determinada em leitor de placa (Bio Rad - microplate Reader – Benchmark) a 460nm. Uma unidade da atividade de MPO foi definida como a

degradação de 1 mmol/min de peróxido de hidrogênio a 25 °C. Os resultados estão expressos como unidades de MPO produzida, por grama de tecido utilizado.

3.6.9 Determinação da inibição da peroxidação lipídica

A determinação da inibição da peroxidação lipídica de membrana foi realizada utilizando-se membranas (de fígado) isoladas de ratas normais como produto para peroxidação. As membranas foram obtidas e preparadas de acordo com o método descrito por De la Cruz *et al* (1992). Sulfato de ferro e ácido ascórbico foram utilizados para induzir a peroxidação da membrana através da formação de radicais hidroxila (OH⁻) conforme descrito por De La Cruz *et al* (1992). Previamente, vários tubos de ensaio contendo uma mistura de 900 μ l de membrana de fígado preparadas em tampão glicina 50 mM, 50 μ l de sulfato de ferro e 50 μ l de ácido ascórbico foram misturados. Em seguida, para cada tubo contendo esta solução, foram adicionados 100 μ l dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* em concentrações de 25,0, 18,7, 12,5, 6,25, 2,5, 1,25 e 0,25 μ g/ml. Cada amostra foi testada em pelo menos sete tubos contendo membranas obtidas de fígados de ratas distintas. Tubos contendo somente a solução de reação foram utilizados como controle (100 % de peroxidação). Todas as amostras foram incubadas a 37 °C por 45 min e, subsequentemente, 500 μ l de uma solução de ácido acético a 30 % foram adicionado às amostras, as quais foram então incubados a 100

°C por 15 min; em seguida as amostras foram centrifugadas a 2750 g por 15 min a 4 °C. O produto que expressa a peroxidação da membrana (quantidade produzida de malonildialdeído - MDA) foi determinado em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados obtidos estão expressos como porcentagem de inibição da produção de MDA como descrito por Gálvez *et al* (1994).

3.6.10. Indução de úlcera duodenal em ratos

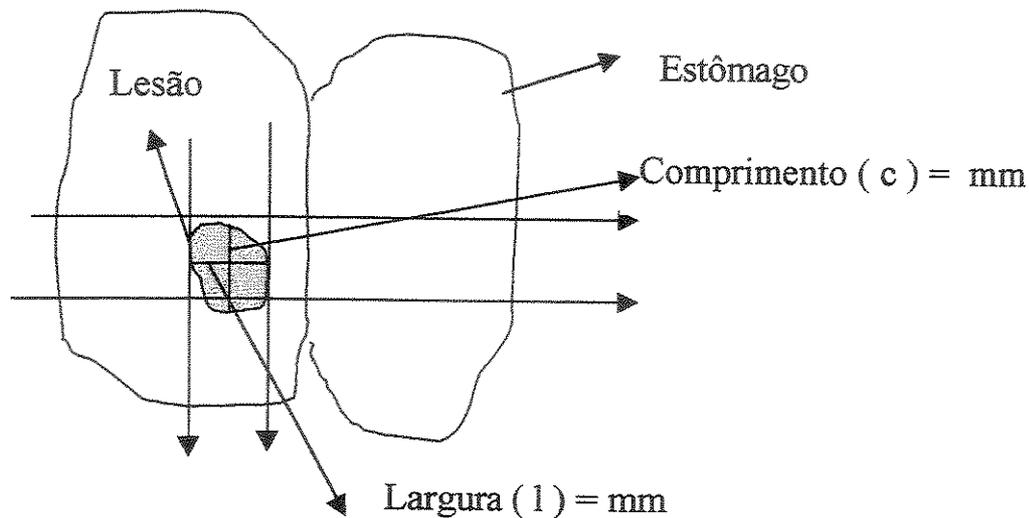
Diferentes ensaios foram realizados utilizando cada uma das amostras vegetais em acordo com o método descrito por Szabo (1978). Ratos albinos machos pesando entre 200 e 220g foram utilizados sem a necessidade de jejum. A úlcera duodenal foi induzida por duas administrações de uma solução aquosa de cisteamina hidrocloreídrica (400 mg/kg), por via oral, em intervalos de 4 horas. A droga padrão cimetidina 100 mg/kg (controle positivo), veículo 10 ml/kg (controle negativo) e as amostra vegetais de cada uma das espécies, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, foram administradas 60 minutos antes de cada administração de cisteamina. Todos os animais foram sacrificados 24 horas após a primeira dose de cisteamina administrada. O duodeno foi retirado e aberto na região antimesentérica. As úlceras foram contadas utilizando-se uma escala arbitrária de 0 a 3, onde 0 foi atribuído para a ausência de lesão; 1 para lesão superficial; 2 para úlcera profunda e 3 para úlcera perfurada ou com penetração em órgãos adjacentes (pâncreas ou fígado).

3.6.11. Indução de úlcera crônica por ácido acético em ratos

Diferentes ensaios foram realizados utilizando cada uma das amostras vegetais, conforme a técnica descrita por Takagi *et al* (1969). Ratos foram anestesiados para exposição do estômago através de uma incisão de aproximadamente 2 cm realizada abaixo da apófise xifóide. Após exposto o estômago, foi injetado com o auxílio de uma microseringa, 0,05 ml de uma solução de ácido acético à 30 %, na camada subserosa da junção do fundo com o antro do estômago. Dois dias após a inoculação do ácido, foram iniciados os tratamentos, por via oral, com as amostras de *Turnera diffusa* e *Turnera ulmifolia* em doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, cimetidina (100 mg/kg) e com o controle negativo (NaCl 0,9 %) os quais persistiram durante 14 dias consecutivos.

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

comprimento (c) pelo maior eixo que cruza o primeiro exatamente na metade em 90°, sendo este eixo o da largura (l) da lesão.



O efeito dos infusos sobre as lesões foi calculado pela fórmula:

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

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

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

T = ALU dos animais dos grupos tratados com os infusos

Fotografias

Para serem fotografadas, as amostras de estômago foram mantidas em solução salina 0,9% e, em seguida, colocadas numa mesa de reprodução com iluminação de 100 Watz. As fotos foram tiradas com uma lente macro de 50 mm e filme de 135 mm. Foi

utilizada uma régua de escala de 1 cm como anteparo para real dimensão das lesões e o paquímetro digital mostra o maior eixo da lesão.

3.6.12. Determinação de muco livre no conteúdo gástrico

Este experimento foi descrito inicialmente por Bolton *et al* (1978) com algumas modificações realizadas por Sun *et al* (1991). Grupos de camundongos, pesando entre 35 e 38 g, permaneceram em jejum por um período de 24 h sob anestesia de éter, o abdome foi aberto para ligadura do piloro. Cada grupo teste recebeu 10 ml/kg de Salina 0,9 % (controle negativo), 100 mg/kg de cimetidina (controle positivo) e 250, 500 e 1000 mg/kg dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*, por via intraduodenal, logo após a ligadura do piloro. Outros grupos, receberam estes mesmos tratamentos, porém, foram submetidos previamente a uma administração subcutânea de indometacina (30 mg/kg). Três horas após a amarradura do piloro os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a incisão foi reaberta, o estômago retirado e seu conteúdo imediatamente coletado e imerso em 10 ml de uma solução contendo 0,02 % de “alcian blue” dissolvido em tampão sacarose 0,16 M / acetato de sódio 0.05 M (pH 5,8). Esta mistura foi incubada por 24 h, a uma temperatura de 20 °C e logo após centrifugada por 10 min a 3000 rpm. A quantidade de muco livre no conteúdo gástrico foi determinada pela quantidade de muco ligado ao “alcian blue”, em espectrofotômetro a 615 nm.

3.6.13. Determinação da síntese de prostaglandina na mucosa gástrica

Realizou-se o experimento segundo a metodologia descrita por Curtis *et al* (1995). Ratos Wistar machos, pesando entre 150 e 160 g, foram tratados com salina 0,9 % (controle negativo), 100 mg/kg de cimetidina (controle positivo) e 500 e 1000 mg/kg dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*, por via oral. Outros grupos, tratados com estas mesmas amostras, foram submetidos previamente a uma administração subcutânea de indometacina (30 mg/kg). Uma hora após o tratamento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O estômago foi retirado e aberto, a mucosa foi raspada até sua total remoção. O conteúdo foi pesado e extensivamente picotado, sendo logo após suspenso em uma solução de 1 ml de tampão sódio fosfato (10 mM; pH 7.4), esta solução permaneceu incubada a 37°C, por um período de 20 min. A prostaglandina presente no tampão foi determinada por “kit” imunoenzimático (RPN222-Armersham), em espectrofotômetro a 450 nm.

3.6.14. Análise cromatográfica dos infusos de *Turnera diffusa* e *Turnera ulmifolia*

Os constituintes presentes no infuso liofilizado de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* foram identificados de acordo com o método descrito por Wagner *et al* (1984). A análise cromatográfica foi realizada em placas de vidro (10 x 20 cm) com sílica gel

Fluka F254, de 0.25 mm, eluídas com 3 diferentes sistemas de solventes: n-butanol/ ácido acético/ água (BAW) 65:15:35 v/v/v; clorofórmio/ metanol/ amônia 8:2:0.5 v/v/v; e clorofórmio/ metanol/ n-propanol/ água 5:6:1:4 v/v/v. Os infusos de *T. diffusa* e de *T. ulmifolia* foram dissolvidos (10 mg) em 1 ml de uma mistura 1:1 v/v de metanol-água, submetidos a banho de ultra-som por 5 min e centrifugados para remoção de resíduos. Aproximadamente 10 µL destas soluções foram adicionados às placas previamente preparadas. Alcalóides foram detectados com reagente de Dragendorff ou iodoplatinato. Antraquinonas foram detectadas usando uma solução de 10% de hidróxido de potássio em metanol. Flavonóides foram detectados pela fluorescências mediante exposição à luz UV após a revelaçãoem reagente (NP/PEG). Compostos fenólicos foram detectados depois da exposição das placas ao vapor de amônia pela presença de manchas fluorescentes sob luz UV. Saponinas, triterpenos e esteróides foram detectados com soluções reagente de vanilina/ácido sulfúrico. Taninos foram detectados com solução 5% de FeCl₃ em metanol ou com 1% de solução gelatinosa. Amostras de soluções contendo rutina, isoquercetrina, ácido clorogênico e catequina foram solubilizadas em metanol. Os infusos foram fracionados por cromatografia em coluna de permeação em gel de Sephadex LH-20 eluída em metanol. As frações resultantes foram purificadas por HPLC. As substâncias puras foram identificadas por técnicas espectroscópicas

(Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massa, Infravermelho e Ultravioleta).

3.7. Análise estatística

Os resultados farmacológicos relacionados aos ensaios de indução de úlcera gástrica, úlcera duodenal e úlcera crônica, colite aguda, dosagem de muco e prostaglandina e dos ensaios bioquímicos relacionados, estão expressos como média \pm desvio padrão (dp) da média. Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett quando buscou-se comparar cada grupo teste em relação aos resultados obtidos para o grupo controle ou o teste de Tukey, quando buscou-se comparar cada amostra entre si. O nível de significância mínimo foi de “ $p < 0,05$ ” em todas as análises. Os dados de peroxidação lipídica foram determinados utilizando-se o Teste *T de Student*, comparando cada grupo individualmente, em sua respectiva concentração, em relação ao grupo que produziu 100 % de peroxidação da membrana.

IV - RESULTADOS

4.1. Toxicidade aguda em camundongos

O índice de sobrevivência foi obtido através da observação de ausência de mortalidade dos animais até o 14º dia após uma única administração dos extratos de diferentes polaridades e dos infusos obtidos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*, em doses de 100, 500, 1000, 2500 e 5000 mg/kg. Sinais e sintomas de toxicidade foram observados 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 hs após a administração de cada dose avaliada. Os resultados deste experimento estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Sobrevivência de camundongos após administração dos extratos de diferentes polaridades e dos infusos obtidos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*, por via oral, em diferentes doses.

Espécie	Amostra utilizada	Dose (mg/kg)	n	Animais Mortos
<i>Turnera diffusa</i>	Extrato hidroalcolico 70 %	100	08	0
		500		
		1000		
		2500		
		5000		
	Extrato alcoólico	100	08	0
		500		
		1000		
		2500		
		5000		
	Extrato diclorometânico	100	08	0
		500		
		1000		
		2500		
		5000		
Infuso	100	08	0	
	500			
	1000			
	2500			
	5000			
<i>Turnera ulmifolia</i>	Extrato alcoólico	100	08	0
		500		
		1000		
		2500		
		5000		
	Extrato diclorometânico	100	08	0
		500		
		1000		
		2500		
		5000		
	Extrato hexânico	100	08	0
		500		
		1000		
		2500		
		5000		
Infuso	100	08	0	
	500			
	1000			
	2500			
	5000			

Nenhuma das amostras vegetais promoveu a morte dos animais, em nenhuma das doses empregadas. Não foi observado nenhum sinal ou sintoma significativo de toxicidade aguda que pudesse estar relacionado à administração dos extratos ou dos infusos de ambas as espécies, em doses de 100, 500, 1000, 2500 e 5000 mg/kg. Estes resultados indicam que as amostras preparadas a partir das partes aéreas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, em nossas condições experimentais, não apresentam toxicidade aguda até a dose de 5000 mg/kg.

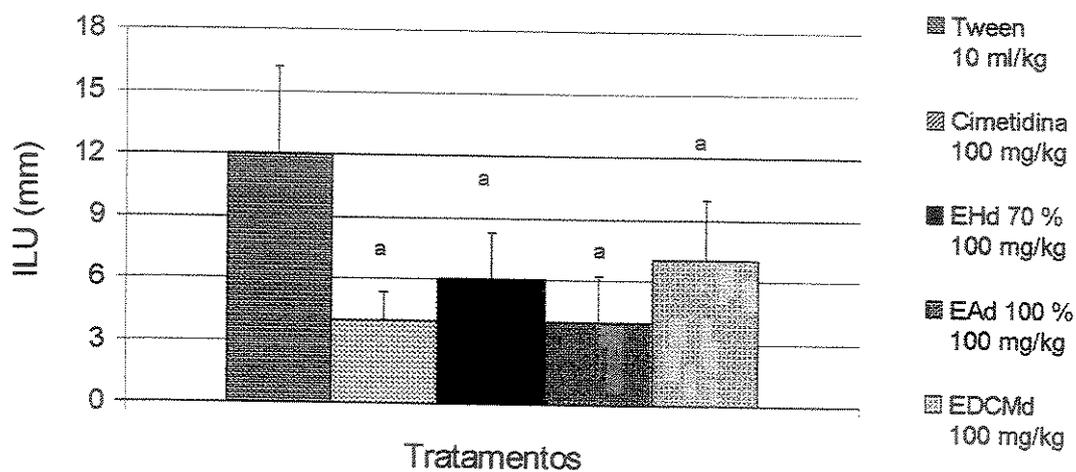
4.2. Atividade antiulcerogênica dos extratos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*

4.2.1. Úlcera gástrica induzida por estresse em camundongos

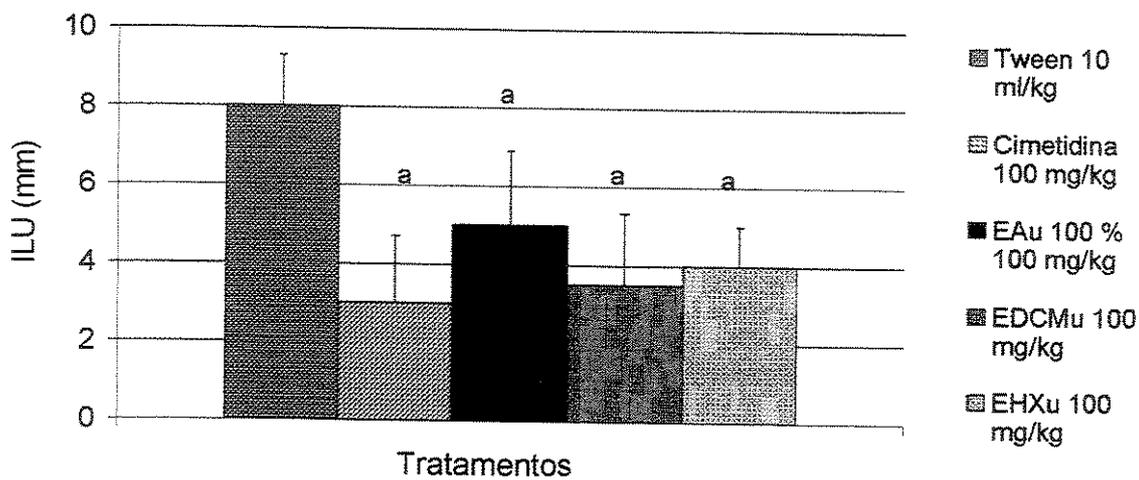
Os resultados obtidos com os extratos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* estão apresentados como média \pm desvio padrão da média, na figura 1 (A) e (B).

Figura 1: Efeitos dos extratos de diferente polaridade obtidos a partir das partes aéreas de *T. diffusa* (A) e *T. ulmifolia* (B) no modelo de úlcera gástrica induzida por estresse em camundongos.

A



B



T. diffusa - ANOVA $F_{(4,25)} = 8,15$ $p < 0,05$; Teste de Tukey a = Tratados \neq Tween, * $p < 0,05$ (n=6);

T. ulmifolia - ANOVA $F_{(4,30)} = 10,76$ $p < 0,05$; Teste de Tukey a = Tratados \neq Tween $p < 0,05$ (n=7).

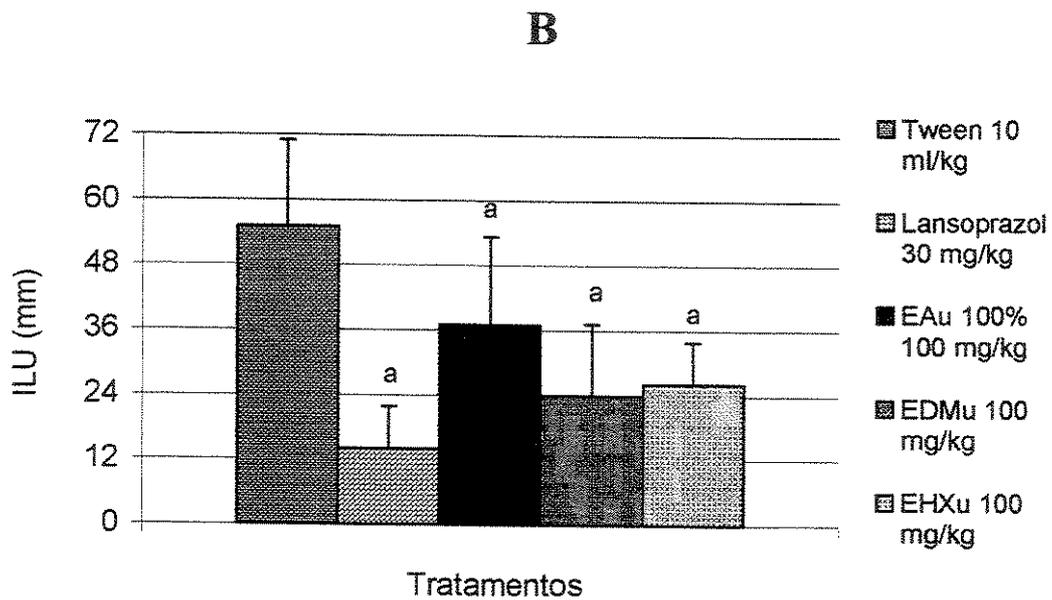
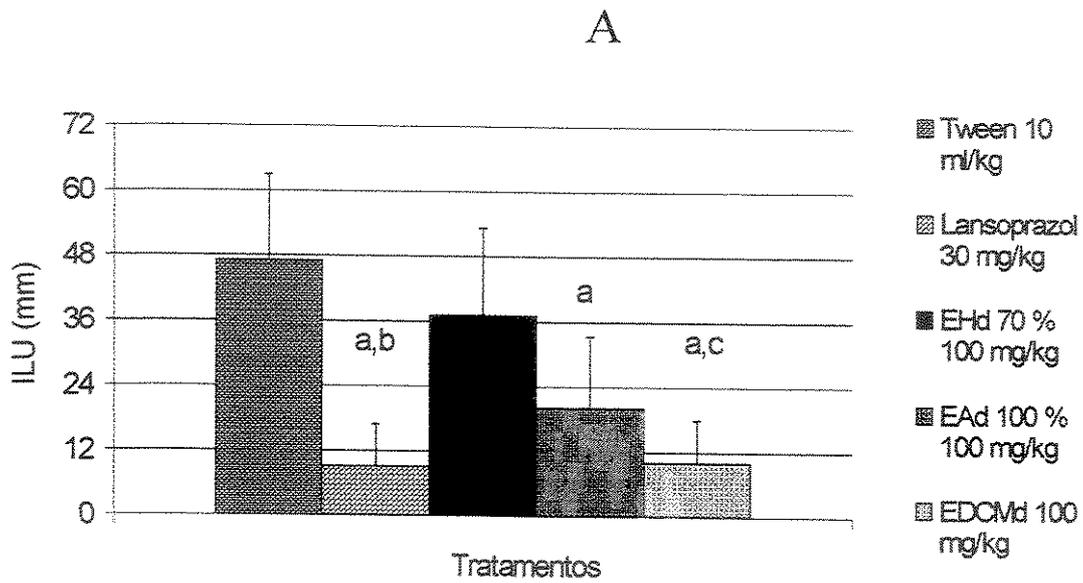
Os resultados obtidos para *T. diffusa* no modelo de estresse demonstram que o EHD 70 %, EAd 100 % e EDCMd inibiram significativamente o aparecimento das lesões em 47, 65 e 40 % respectivamente, em relação ao controle; estes resultados foram os mesmos alcançados pela cimetidina. Não houve ainda, diferença significativa entre os diferentes extratos quando comparados entre si.

Os resultados obtidos para a espécie *T. ulmifolia*, no mesmo modelo, demonstram que o EAU 100 %, EDCMu e EHXu inibiram significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas em 34, 57 e 50 %, respectivamente, em relação ao grupo controle. Neste modelo, também não houve diferença significativa entre a inibição das lesões alcançada pela cimetidina e aquelas alcançadas pelos extratos. Não houve também, nenhuma diferença significativa entre os diferentes extratos quando comparados entre si.

4.2.2. Úlcera induzida por HCl/Etanol em camundongos

Os resultados obtidos com os extratos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* estão apresentados como média \pm desvio padrão da média, na figura 2 (A) e (B).

Figura 2: Efeitos dos extratos de diferentes polaridades, obtidos de *T. diffusa* (A) e *T. ulmifolia* (B) no modelo de úlcera gástrica induzida por HCl/etanol em camundongos.



T. diffusa ANOVA $F_{(4,30)} = 12,45$ $p < 0,05$; Teste de Tukey a = Lansoprazol, EAd 100 % e EDCMd \neq Tween; b = Lansoprazol \neq EHd 70 %; c = EDCMd \neq EHd 70 % $p < 0,05$ (n=7).

T. ulmifolia - ANOVA $F_{(4,30)} = 12,45$ $p < 0,05$; Teste de Tukey a = Tratados \neq Tween $p < 0,05$ (n=7).

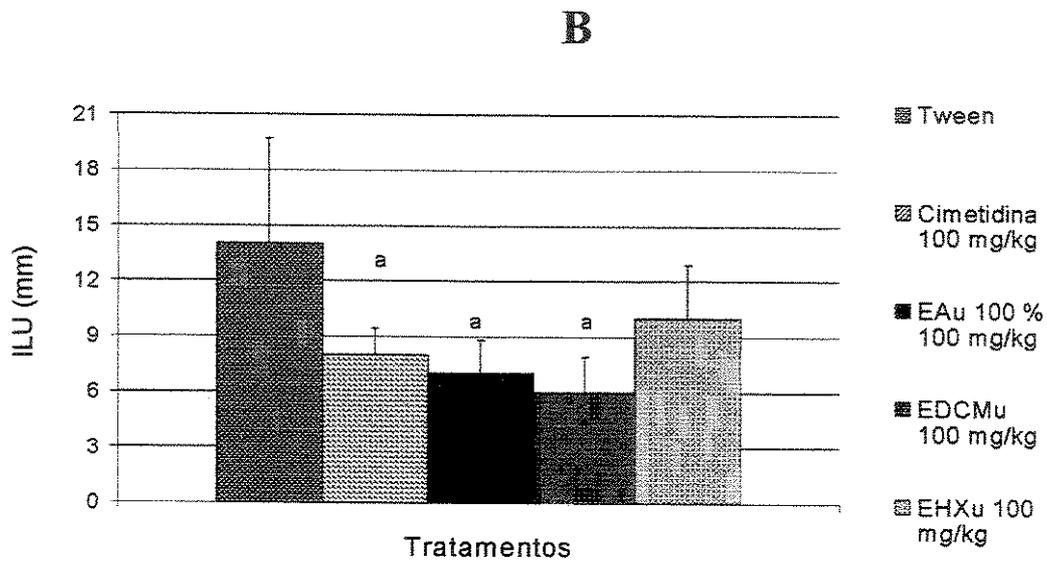
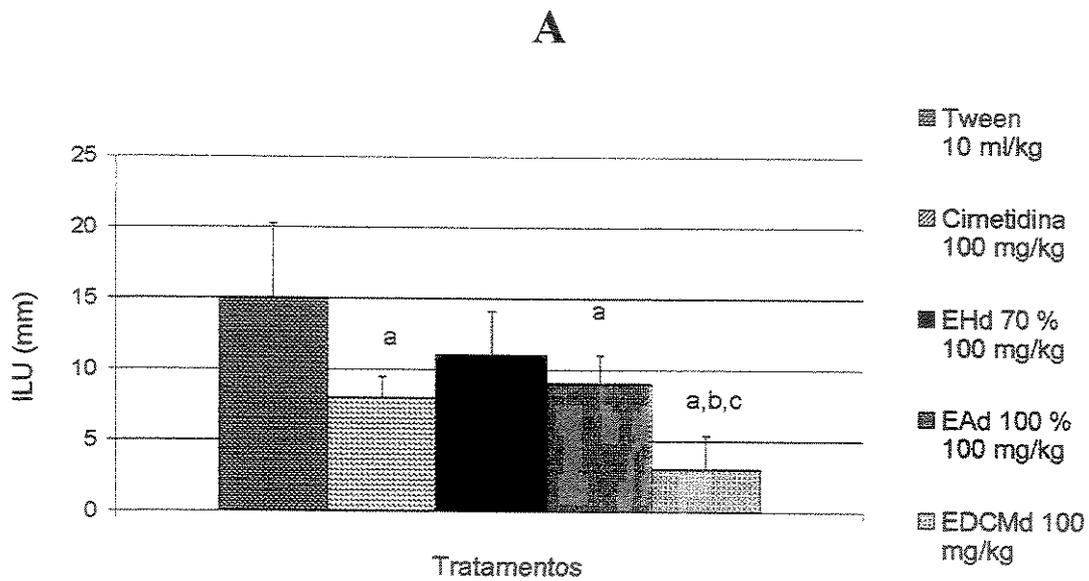
Os resultados obtidos para a espécie *T. diffusa* no modelo de HCl/etanol demonstram que o EAd 100 % e EDCMd inibiram significativamente o aparecimento das lesões em 57 e 79 %, respectivamente, em relação ao controle. A amostra EHd 70 % não apresentou resultado significativo para este modelo (20 % de inibição). Para esta espécie houve ainda diferença significativa entre o EDCMd e o EHd 70 %, mas não entre o EDCMd e EAd 100 %, quando comparados entre si. Também não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo EDCMd e EAd 100 % em relação à cimetidina.

Os resultados obtidos para *T. ulmifolia*, no mesmo modelo, demonstram que as amostras EAU 100 %, EDCMu e EHXu inibiram significativamente o aparecimento das lesões em 38, 53 e 50 %, respectivamente, em relação ao controle. Não houve diferença significativa entre as amostras obtidas de *T. ulmifolia* quando comparadas uma em relação à outra ou em relação à cimetidina.

4.2.3. Úlcera induzida por indometacina e betanecol em camundongos.

Os resultados obtidos com os extratos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* estão apresentados como média \pm desvio padrão da média, na figura 3 (A) e (B).

Figura 3: Efeitos dos extratos de diferente polaridade de *T. diffusa* (A) e *T. ulmifolia* (B) no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina e betanecol.



T. diffusa - ANOVA $F_{(4,29)} = 11,66$ $p < 0,05$; Teste de Tukey a = Cimetidina, EAd 100 % e EDCMd \neq Tween; b = EDCMd \neq EHd 70 %; c = EDCMd \neq EAd 100 % $p < 0,05$ (n=6-7);

T. ulmifolia - ANOVA $F_{(4,30)} = 7,28$ $p < 0,05$; Teste de Tukey: a = Cimetidina, EAu 100 % e EDCMu \neq Tween $p < 0,05$ (n=7).

Os resultados obtidos no modelo de indometacina e betanecol para a espécie *T. diffusa* demonstram que o EAd 100 % e EDCMd inibiram significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas em 39 e 77 %, respectivamente, em relação ao grupo controle. A amostra EHd 70 % não apresentou resultado significativo para este modelo (inibição de 27 %). Além da diferença demonstrada em relação ao controle ficou evidenciada uma diferença significativa entre a inibição das lesões para o EDCMd em relação ao EHd 70 % e para o EDCMd com o EAd 100 %.

Para a espécie *T. ulmifolia*, ensaiada no mesmo modelo, verificou-se que as amostras EAu 100 % e EDCMu inibiram significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas em 52 e 55, respectivamente, em relação ao grupo controle; já o EHXu não apresentou resultado significativo. Observou-se ainda que não houve diferença significativa entre o EAu 100 % e EDCMu, ou entre ambos e a cimetidina.

4.2.4. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de camundongos submetidos à ligadura do piloro.

No teste de ligadura de piloro não foi avaliada a atividade antiulcerogênica da cimetidina e das amostras vegetais; não há, portanto, o cálculo do (ILU). Este modelo foi empregado na avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico destes animais, tais como pH, concentração de íons H^+ e volume de conteúdo, após

administração intraduodenal de cimetidina e das amostras vegetais das duas espécies. Os resultados obtidos neste experimento tanto para o extratos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* estão expressos na tabela 2, e representam a média \pm dp da média de todas as amostras.

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de camundongos submetidos a ligadura de piloro, tratados por via intraduodenal com os extratos de diferentes polaridades obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* e com cimetidina

Espécie	Tratamento	Dose (mg/kg)	pH	Volume (mg)	[H ⁺] mEq/ml/4h
<i>Turnera diffusa</i>	Tween 80	10 ml/kg	3,42 \pm 1,24	405 \pm 233	8,79 \pm 3,56
	Cimetidina	100	5,07 \pm 1,6 ^a	416 \pm 221	4,0 \pm 2,0 ^a
	EHd 70 %	100	4,43 \pm 1,42	670 \pm 214	8,0 \pm 4,71
	EAd 100 %	100	4,0 \pm 1,65	475 \pm 204	6,6 \pm 2,1
	EDCMd	100	4,07 \pm 1,1	642 \pm 354	4,27 \pm 2,34
<i>Turnera ulmifolia</i>	Tween 80	10 ml/kg	3,42 \pm 1,24	405 \pm 233	8,79 \pm 3,56
	Cimetidina	100	5,07 \pm 1,6 ^a	416 \pm 221	4,0 \pm 2,0 ^a
	EAu 100 %	100	5,36 \pm 1,4 ^a	391 \pm 215	8,9 \pm 2,6
	EDCMu	100	5,3 \pm 1,5 ^a	566 \pm 220	3,08 \pm 1,91 ^{a,b}
	EHXu	100	3,57 \pm 1,1	558 \pm 205	6,5 \pm 3,48

ANOVA – *T. diffusa* - $F_{(4,32)}$ pH = 2,04; conteúdo gástrico = 1,33; [H⁺] = 2,99 $p < 0,05$; Teste de Tukey a = Cimetidina \neq Tween, $p < 0,05$.

ANOVA – *T. ulmifolia* - $F_{(4,32)}$ pH = 4,63; conteúdo gástrico = 0,953; [H⁺] = 5,82 $p < 0,05$; Teste de Tukey - (pH) a = Cimetidina, EAu 100 % e EDCMu \neq Tween; ([H⁺]) a = Cimetidina e EDCMd \neq Tween; ([H⁺]) b = EDCMu \neq EAu 100 %, $p < 0,05$.

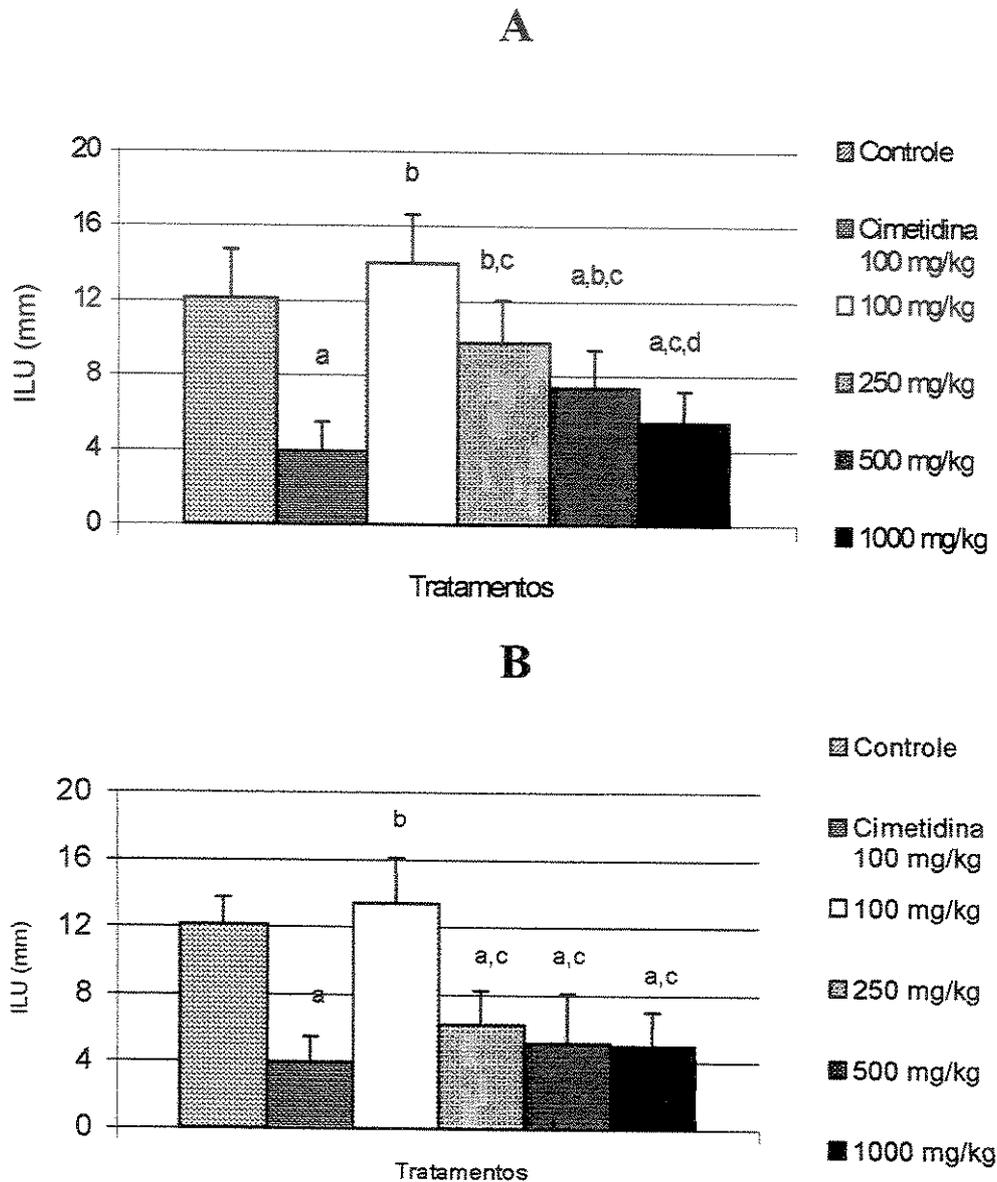
A análise dos resultados revelou que nenhuma das amostras vegetais obtidas de *T. diffusa* foram eficazes em alterar significativamente qualquer um dos parâmetros avaliados. Já para a espécie *T. ulmifolia* foram observadas alterações significativas no pH, onde as amostras EAU 100 %, EDCMu e cimetidina elevaram significativamente este parâmetro de 3.4 para 5.4, 5.3 e 5.0, respectivamente; porém, comparados entre si, não foram observadas diferenças significativas. Em relação aos íons H^+ , somente o EDCMu e a cimetidina foram eficazes em reduzi-los de 8.8 (controle negativo) para 3.1 e 4.0 mEq/ml/4h, respectivamente; para este parâmetro houve ainda, diferença significativa entre o EDCMu e o EAU 100 %, mas não entre o EDCMu e o HXu, ou ainda entre o EDCMu e a cimetidina. Nenhuma das amostras desta espécie foi eficaz em modificar o volume do conteúdo gástrico dos animais.

4.3. Atividade antiulcerogênica dos infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*

4.3.1. Úlcera induzida por estresse em camundongos

Os resultados obtidos nos experimentos de indução de úlcera gástrica por estresse, após o pré-tratamento dos animais com os infusos obtidos a partir das partes aéreas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, estão apresentados na figura 4 (A) e (B) como média \pm desvio padrão da média.

Figura 4: Efeitos dos infusos de *T. diffusa* (A) e *T. ulmifolia* (B), administrados em diferentes doses e da cimetidina sobre as lesões gástricas induzidas por estresse (contenção e frio) em camundongos.



ANOVA - *T. diffusa* - $F_{(5,42)} = 25,45$ $P < 0,05$; Teste de Tuckey: a) cimetidina, 500 e 1000 mg/kg \neq controle negativo; b) 100, 250 e 500 mg/kg \neq cimetidina; c) 250, 500 e 1000 mg/kg \neq 100 mg/kg; d) 1000 mg/kg \neq 100 e 250 mg/kg (n=8);

ANOVA - *T. ulmifolia* - $F_{(5,42)} = 23,66$ $P < 0,05$; Teste de Tuckey: a) cimetidina, 250, 500 e 1000 mg/kg \neq controle negativo; b) 100 mg/kg \neq cimetidina; c) 250, 500 e 1000 mg/kg \neq 100 mg/kg (n=8).

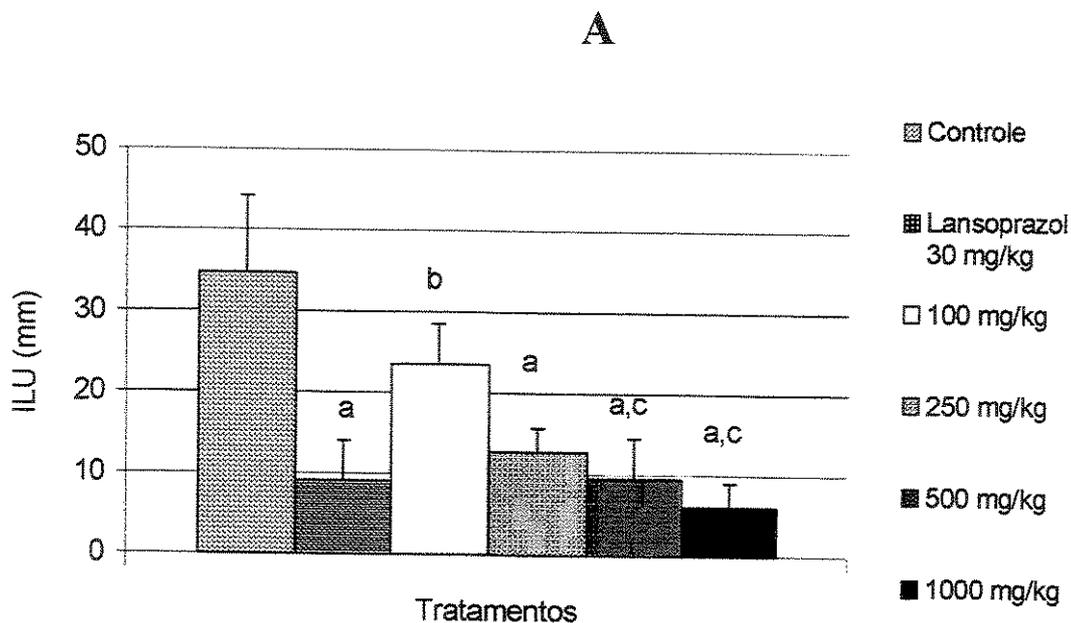
Os resultados obtidos com a administração do infuso da espécie *T. diffusa* no modelo de estresse demonstram que somente as doses de 500 e 1000 mg/kg e aquela da droga padrão cimetidina inibiram significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas em 39, 54 e 68 %, respectivamente. As inibições de 15 e 19 % sobre o ILU produzidas pelas doses de 100 e 250 mg/kg não foram estatisticamente significativas. Também foi demonstrado que a inibição obtida pela cimetidina foi significativamente maior do que aquelas alcançadas pelo infuso nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg; entretanto, a dose de 1000 mg/kg não se mostrou mais eficaz do que a cimetidina. Por último, verificou-se, que a dose de 1000 mg/kg do infuso de *T. diffusa* foi significativamente mais ativa do que a dose de 100 e 250 mg/kg.

Os resultados obtidos com a administração do infuso da espécie *T. ulmifolia*, empregando-se o mesmo modelo e as mesmas doses descritas anteriormente, demonstram que as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg e aquela de cimetidina inibiram significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas, respectivamente, em 48, 57, 58 e 68 %; a dose de 100 mg/kg do infuso não apresentou inibição significativa (10 %). Os resultados obtidos com as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg foram praticamente os mesmos alcançados pela droga padrão cimetidina, não havendo diferenças significativas entre os mesmos. Para esta espécie, também não foram observadas diferenças significativas na atividade antiulcerogênica apresentada pelas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg quando comparadas entre si.

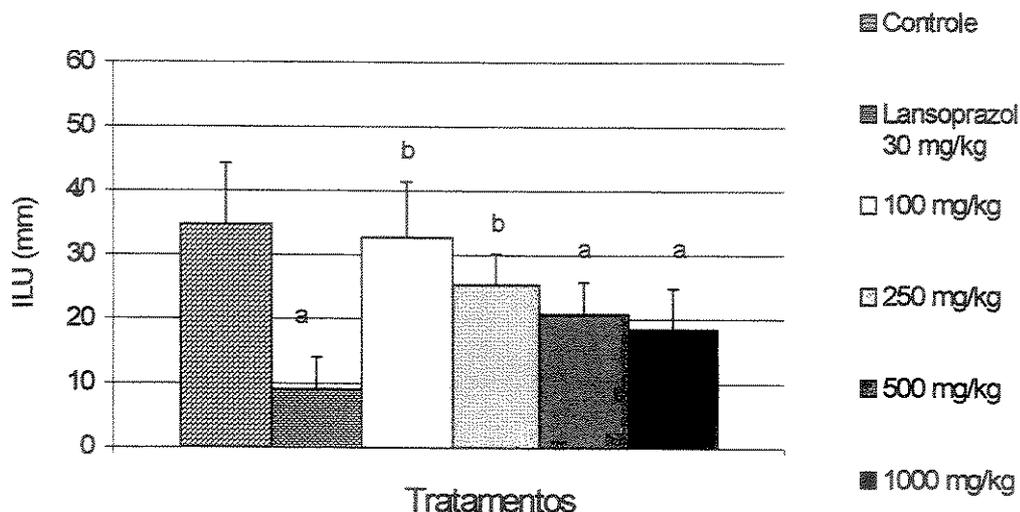
4.3.2. Úlcera induzida por HCl/Etanol em camundongos

Os resultados obtidos nos experimentos de indução de úlcera gástrica por HCl/etanol, após o pré-tratamento dos animais com os infusos obtidos a partir das partes aéreas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, estão apresentados na figura 5 (A) e (B) como média \pm desvio padrão da média.

Figura 5: Efeitos dos infusos obtidos de *T. diffusa* (A) e *T. ulmifolia* (B), administrados em diferentes doses e do lansoprazol, sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol em camundongos.



B



ANOVA – *T. diffusa* - $F_{(5,36)} = 14.06$ $P < 0,05$; Teste de Tuckey: a) lansoprazol, 250, 500 e 1000 mg/kg \neq controle negativo; b) 100 mg/kg \neq lansoprazol; c) 500 e 1000 mg/kg \neq 100 mg/kg (n=7); ANOVA – *T. ulmifolia* - $F_{(5,36)} = 6.41$ $P < 0,05$; Teste de Tuckey: a) cimetidina, 500 e 1000 mg/kg \neq controle negativo; b) 100 e 250 mg/kg \neq cimetidina (n=7).

A análise dos resultados obtidos com o pré-tratamento dos animais com o infuso da espécie *T. diffusa* no modelo de HCl/etanol demonstrou que as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg e aquela do lansoprazol inibiram de modo significativo o aparecimento das lesões ulcerativas em 63, 72, 82 e 74 %, respectivamente, quando comparadas em relação ao controle negativo. Foi possível demonstrar também que as doses ativas apresentaram o mesmo padrão de prevenção ao aparecimento das lesões ulcerativas induzidas pelo HCl/etanol do lansoprazol, já que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando as mesmas foram comparadas entre si. Por último, pode-se observar que as doses de 500 e 1000

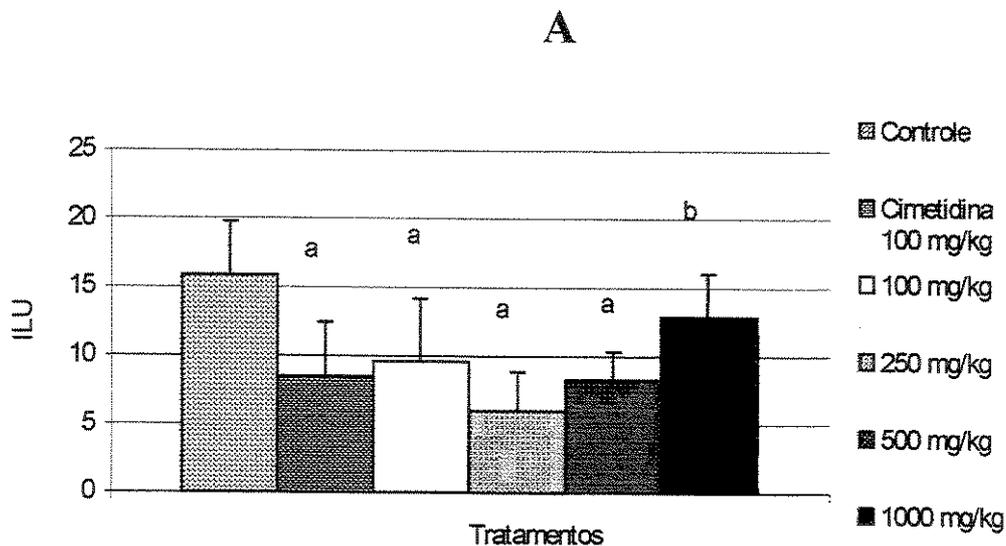
mg/kg do infuso de *T. diffusa*, foram significativamente mais eficazes em inibir o aparecimento das lesões ulcerativas do que a dose de 100 mg/kg (32 %), mas não em relação à dose de 250 mg/kg; porém, estas duas doses não apresentaram diferenças significativas de atividade quando comparadas uma em relação à outra.

Os resultados obtidos no mesmo modelo nas diferentes doses empregadas demonstram que para a espécie *T. ulmifolia*, as doses de 500 e 1000 mg/kg e o lansoprazol foram os tratamentos que se mostraram mais eficientes em inibir o aparecimento das lesões ulcerativas induzidas pelo agente agressor (HCl/etanol), já que as duas doses de infuso e aquela do lansoprazol apresentaram-se significativas quando comparadas em relação ao controle negativo com inibição de 40, 42 e 82 %, respectivamente. Foi possível observar também que as doses de 500 e 1000 mg/kg, apresentaram atividade semelhante à da droga padrão utilizada, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre estes resultados. As inibições alcançadas com as doses de 100 mg/kg e 250 mg/kg, neste modelo, foram de apenas 5 e 18 %, respectivamente, não tendo sido estatisticamente significativas. Por último, não foram detectadas diferenças significativas entre os resultados alcançados pela dose de 500 e 1000 mg/kg deste infuso quando foram comparadas entre si.

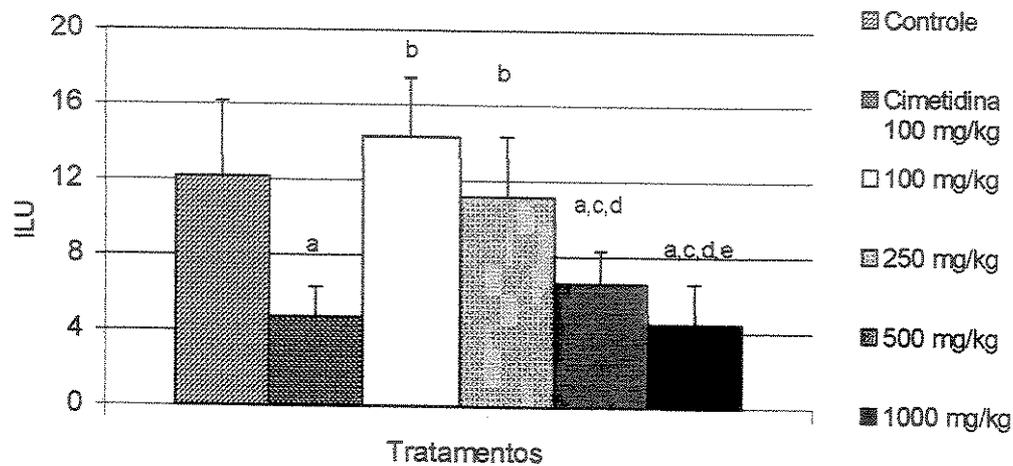
4.3.3. Úlcera induzida por indometacina e betanecol em camundongos

Os resultados obtidos nos experimentos de indução de úlcera gástrica por indometacina e betanecol, após o pré-tratamento dos animais com os infusos obtidos a partir das partes aéreas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, estão apresentados na figura 6 (A) e (B) como média \pm desvio padrão da média.

Figura 6: Efeitos dos infusos obtidos de *T. diffusa* (A) e *T. ulmifolia* (B), administrados em diferentes doses e da cimetidina sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina e betanecol em camundongos.



B



T. diffusa - ANOVA - $F_{(5,36)} = 7.05$ $P < 0,05$; Teste de Tuckey: a) cimetidina, 100, 250 e 500 mg/kg \neq controle negativo; b) 1000 mg/kg \neq 250 mg/kg (n=7);

T. ulmifolia - ANOVA - $F_{(5,36)} = 14.18$ $P < 0,05$; Teste de Tuckey: a) cimetidina, 500 e 1000 mg/kg \neq controle negativo; b) 100 e 250 mg/kg \neq cimetidina; c) 500 e 1000 mg/kg \neq 100 mg/kg; d) 500 e 1000 mg/kg \neq 250 mg/kg; e) 1000 mg/kg \neq 500 mg/kg (n=7).

O pré-tratamento dos animais com o infuso de *T. diffusa* no modelo de indometacina e betanecol revelou que as doses de 100, 250 e 500 mg/kg e a cimetidina foram significativamente eficazes em inibir o aparecimento das lesões em 39, 62, 47 e 46 %, respectivamente, em relação ao controle. Além disso, não houve diferenças significativas entre estas amostras quando comparadas entre si e com a cimetidina. A dose de 1000 mg/kg, neste modelo, não apresentou atividade inibitória significativa (18 %) apresentando índice de lesões muito próximo ao do

controle, resultado este que já tinha sido parcialmente (mas em menor intensidade) evidenciado com a dose de 500 mg/kg.

Os resultados obtidos no mesmo modelo só que utilizando-se agora o infuso de *T. ulmifolia* demonstram que somente as doses de 500 e 1000 mg/kg e aquela de cimetidina foram significativamente eficientes em inibir o aparecimento das lesões ulcerativas em 58, 72, e 46 %, respectivamente, em relação ao controle. Os resultados obtidos com as doses de 500 e 1000 mg/kg não se diferenciaram significativamente daqueles obtidos com a cimetidina. Neste experimento, foi demonstrado também que as doses de 500 e 1000 mg/kg apresentaram inibições significativamente maiores que aquelas obtidas com as doses de 100 mg/kg (10 %) e 250 mg/kg (29 %), por último, foram observadas diferenças significativas entre a dose de 1000 mg/kg e aquela de 500 mg/kg, quando comparadas entre si.

4.3.4. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de camundongos submetidos à ligadura do piloro.

Este modelo foi empregado para avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico dos animais tais como pH, concentração de íons H^+ e volume, após administração intraduodenal de cimetidina e dos infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* em doses de 250, 500 e 1000 mg/kg. Os resultados obtidos neste experimento estão apresentados como média \pm desvio padrão da média, nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de camundongos submetidos à ligadura de piloro, tratados por via intraduodenal, com diferentes doses do infuso de *Turnera diffusa*.

Tratamento	Dose (mg/kg)	pH	Volume (mg)	[H+] mEq/ml/4h
Salina	10 ml/kg	2,56 ± 0,48	336 ± 87	11,34 ± 2,35
Cimetidina	100	5,56** ± 1,03	213 ± 97	5,16** ± 1,23
Infuso	250	3,68 ± 0,98	409 ± 101	9,72 ± 1,86
Infuso	500	3,75 ± 1,11	424 ± 91	8,94 ± 1,63
Infuso	1000	4,87* ± 1,23	429 ± 102	3,45** ± 0,87

ANOVA - $F_{(4,35)}$ - pH = 8,24; conteúdo gástrico = 10,04; [H+] = 16,16 $p < 0,05$;
 Teste de Dunnett - * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Tabela 4: Análise dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico de camundongos submetidos a ligadura de piloro, tratados por via intraduodenal, com diferentes doses do infuso de *Turnera ulmifolia*.

Tratamento	Dose (mg/kg)	pH	Volume (mg)	[H+] mEq/ml/4h
Tween 80	10 ml/kg	2,56 ± 0,48	336 ± 87	11,34 ± 2,35
Cimetidina	100	5,56** ± 1,03	213 ± 97	5,16** ± 1,23
Infuso	250	3,37 ± 0,78	295 ± 76	8,92 ± 1,61
Infuso	500	3,75 ± 0,96	327 ± 89	6,23* ± 1,03
Infuso	1000	5,37** ± 1,81	292 ± 77	3,71** ± 0,67

ANOVA - $F_{(4,35)}$ - pH = 8,59; conteúdo gástrico $F_{(4,35)} = 1,95$; [H+] $F_{(4,35)} = 14,89$ $p < 0,05$; Teste de Dunnett - * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

A análise dos resultados revelou que somente a cimetidina e a dose de 1000 mg/kg do infuso de *T. diffusa* foram eficazes em alterar alguns dos parâmetros avaliados; foram observadas alterações significativas no pH, onde a dose de 1000 mg/kg a e cimetidina elevaram significativamente este parâmetro de 2.5, para respectivamente 4.8 e 5.5. Em relação à concentração de íons H^+ , a dose de 1000 mg/kg e a cimetidina foram eficazes em reduzir sua concentração de 11.3 (controle negativo) para 3.4 e 5.1 mEq/ml/4h, respectivamente. Assim como a cimetidina, nenhuma das amostras do infuso desta espécie foi eficaz em modificar o volume do conteúdo gástrico dos animais.

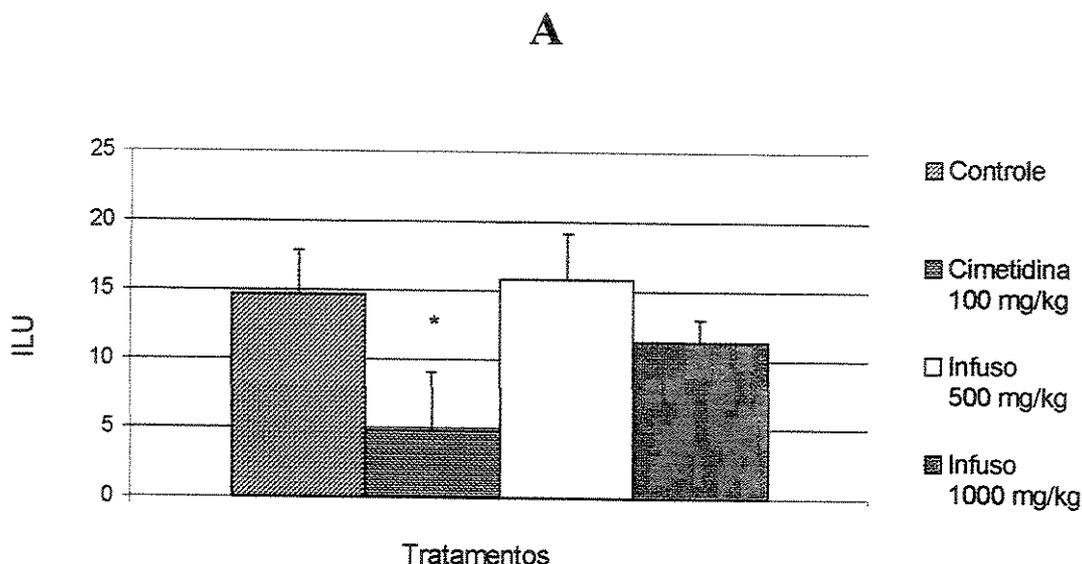
Em relação ao infuso de *T. ulmifolia*, a análise dos resultados revelou que somente a cimetidina e as doses de 500 e 1000 mg/kg foram eficazes em alterar alguns dos parâmetros avaliados; foram observadas alterações significativas no pH, onde a dose de 1000 mg/kg a e aquela da cimetidina, elevaram-no significativa e respectivamente, de 2.5 para 5.3 e 5.5. Em relação aos íons H^+ , as doses de 500 e 1000 mg/kg e de cimetidina foram eficazes em reduzir sua concentração de 11.3 (controle negativo) para 6.2, 3.7 e 5.1 mEq/ml/4h, respectivamente.

Assim como a cimetidina e o infuso de *T. diffusa*, nenhuma das amostras testadas de *T. ulmifolia* foi eficaz em modificar o volume do conteúdo gástrico dos animais.

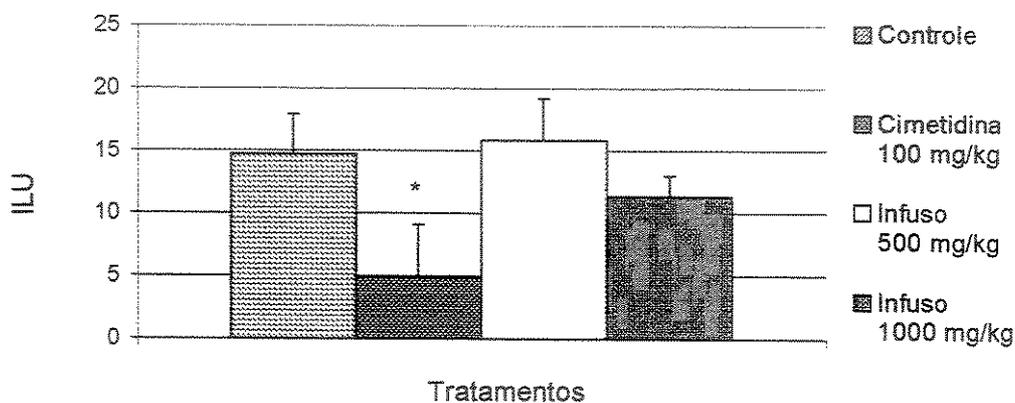
4.3.5. Úlcera duodenal induzida por cisteamina em ratos

Neste experimento estudou-se a atividade antiulcerogênica dos infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* em úlceras duodenais induzidas por cisteamina em ratos. Os infusos foram empregados em doses de 500 e 1000 mg/kg, administradas por via oral. Os resultados obtidos para as amostras vegetais e para a cimetidina estão expressos na figura 7 (A) e (B), na forma da média \pm d. p. da média, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

Figure 7: Lesões ulcerativas induzidas por cisteamina em ratos pré-tratados, por via oral, com o infuso de *T. diffusa* (A) e *T. ulmifolia* (B) em doses de 500 e 1000 mg/kg, administradas por via oral.



B



T. diffusa - ANOVA - $F_{(3,20)} = 9.04$ $P < 0,05$; Teste de Dunnett * $p < 0,05$, (n=6);

T. ulmifolia - ANOVA - $F_{(3,20)} = 9.11$ $P < 0,05$; Teste de Dunnett * $p < 0,05$, (n=6).

Os resultados demonstram que ambos infusos não foram significativamente eficazes em inibir as lesões duodenais induzidas pela cisteamina. O infuso de *T. diffusa* inibiu as lesões em 23,8 % na maior dose administrada (1000 mg/kg) enquanto que o infuso obtido de *T. ulmifolia* inibiu a formação das lesões duodenais em 22,8 %, na mesma dose empregada. Ambos resultados não foram estatisticamente significativos. A droga padrão utilizada, cimetidina (100 mg/kg), inibiu significativamente o desenvolvimento das lesões em 67 %.

4.3.6. Colite aguda induzida por TNBA em ratas

A- Efeitos do infuso de *T. ulmifolia*

Neste experimento foi avaliada a atividade inibitória da colite aguda induzida pelo TNBA, em animais pré-tratados com o infuso liofilizado de *T. ulmifolia* em doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg, administrado por via oral, durante 6 dias. A inibição alcançada pelas amostras vegetais está expressa na tabela 5 enquanto que os resultados obtidos durante a determinação dos parâmetros bioquímicos das amostras colônicas obtidas destes mesmos animais estão expressos na tabela 6, na forma de média \pm d. p. da média, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

Tabela 5= Efeitos da administração oral do infuso obtido de *T. ulmifolia* na colite aguda induzida por TNBA em ratas.

Tratamento	Dose mg/kg	Lesão (mg/cm)	Índice de Lesão	% inibição
“sham”	-	0,0	0,0	-
Salina	-	3,88 \pm 0,25	6,75 \pm 0,50	-
Infuso de <i>T. ulmifolia</i>	100	3,54 \pm 0,42	6,43 \pm 0,53	5,0
	250	2,70 \pm 0,63*	5,43 \pm 0,79*	20,0
“sham”	-	0,0	0,0	-
Salina	-	5,25 \pm 1,26	8,25 \pm 1,26	-
Infuso de <i>T. ulmifolia</i>	500	3,81 \pm 0,72*	6,64 \pm 0,75*	19,5
	1000	4,93 \pm 0,45	7,71 \pm 0,49	6,5

ANOVA - $P < 0,05$; Doses de 100 e 250 mg/kg, $F_{(3,18)} = 124.12$;
Doses de 500 e 1000 mg/kg, $F_{(3,18)} = 118.04$; Teste de Dunnett * $p < 0,05$, (n=4-7).

Tabela 6 = Determinação da glutatona total e da atividade da MPO em segmentos de cólon lesado com TNBA, obtidos de ratas pré-tratadas com o infuso de *T. ulmifolia* em diferentes doses.

Tratamento	Dose mg/kg	Glutaciona (nmol/g)	% aumento	MPO (U/g)	% inibição
“sham”	-	1117 ± 192	-	2110 ± 202	-
Salina	-	916 ± 176	-	42415 ± 10389	-
Infuso de <i>T. ulmifolia</i>	100	994 ± 204	8,5	42023 ± 11587	0,0
	250	1038 ± 175*	13,5	47184 ± 11587	0,0
“sham”	-	1168 ± 231	-	402 ± 207	-
Salina	-	881 ± 260	-	62427 ± 26347	-
Infuso de <i>T. ulmifolia</i>	500	1085 ± 112*	18,5	50805 ± 12784	0,0
	1000	943 ± 088	3,5	60665 ± 29413	0,0

ANOVA: Doses (100 e 250 mg/kg) - Glutaciona $F_{(3,18)} = 3.13$; MPO $F_{(3,19)} = 14.85$, $P < 0,05$;

Teste de Dunnett * $p < 0,05$;

ANOVA: Doses de 500 e 1000 mg/kg $F_{(3,17)} = 2.93$ - * $P < 0,05$; (n=4-7).

Os resultados obtidos no primeiro experimento, onde o infuso de *T. ulmifolia* foi testado nas doses de 100 e 250 mg/kg, demonstram que somente a dose de 250 mg/kg foi significativamente eficaz em inibir o desenvolvimento da lesão induzida pelo TNBA no cólon dos animais. O infuso inibiu o desenvolvimento da colite aguda em 20 % na dose de 250 mg/kg e somente em 5 % na dose de 100 mg/kg. A avaliação bioquímica das amostras de cólon obtidas destes mesmos animais revelou

que os níveis de glutathione total estavam significativamente aumentados (13,5 %) no cólon dos animais pré-tratados com a dose de 250 mg/kg, o que não aconteceu nas amostras de animais pré-tratados com o infuso em dose de 100 mg/kg (8,5 %).

A análise dos resultados obtidos no segundo experimento revelou que o infuso de *T. ulmifolia*, administrado em dose de 500 mg/kg, também foi significativamente eficaz em inibir o desenvolvimento da lesão inflamatória do cólon. O infuso inibiu o desenvolvimento da colite aguda em 19,5 %, na dose de 500 mg/kg, mas não foi eficiente em reduzir esta lesão quando administrado em dose de 1000 mg/kg (6,5 %). A avaliação bioquímica das amostras de cólon obtidas dos animais pré-tratados com a dose de 500 mg/kg revelou que os níveis de glutathione total no cólon destes animais estavam significativamente aumentados (18,5 %), o que não aconteceu com o tratamento com a dose de 1000 mg/kg (3,0 %). A análise bioquímica também revelou que nenhum dos pré-tratamentos realizados com o infuso de *T. ulmifolia* foi eficiente em reduzir a atividade da MPO no cólon lesado.

B- Efeitos do infuso de *T. diffusa*

Neste experimento foi avaliada a atividade inibitória da colite aguda induzida pelo TNBA, em animais pré-tratados com o infuso liofilizado de *T. diffusa* em doses de 250 e 500 mg/kg, administrado por via oral, durante 6 dias. A inibição no índice de lesões alcançada pelas amostras vegetais está expressa na tabela 7 enquanto que os resultados obtidos durante a determinação dos parâmetros bioquímicos das amostras colônicas obtidas destes mesmos animais estão expressos na tabela 8, na forma de média \pm d. p. da média, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

Tabela 7= Efeitos da administração oral do infuso obtido de *T. diffusa* na colite aguda induzida por TNBA em ratas.

Tratamento	Dose mg/kg	Lesão (mg/cm)	Índice de Lesão	% inibição
“sham”	-	0,0	0,0	-
Salina	-	4,16 \pm 0,78	6,70 \pm 0,67	-
Infuso de <i>T. diffusa</i>	250	3,36 \pm 1,07	5,93 \pm 0,93	10,5
	500	3,03 \pm 0,69*	5,86 \pm 0,38*	19,5

ANOVA – $F_{(3,19)} = 134.14$ - $P < 0,05$; Teste de Dunnett * $p < 0,05$ (n=4-7).

Tabela 8= Determinação da glutathiona total e da atividade da MPO em segmentos de cólon lesado com TNBA, obtidos de ratas pré-tratadas com o infuso de *T. diffusa* em diferentes doses.

Tratamento	Dose mg/kg	Glutathiona (nmol/g)	% aumento	MPO (U/g)	% inibição
“sham”	-	1026 ± 75,6	-	782 ± 114	-
Salina	-	7429 ± 1688	-	36708 ± 8922	-
Infuso de <i>T.</i>	250	6571 ± 1197	0,0	34512 ± 12701	6,0
<i>diffusa</i>	500	6426 ± 1018	0,0	27043 ± 12731*	26,5

ANOVA: Glutathiona, $F_{(3,17)} = 20.76$; MPO, $F_{(3,19)} = 11.08$, $P < 0,05$; Teste de Dunnett * $p < 0,05$, (n=4-7).

Os resultados obtidos neste ensaio demonstram que o infuso de *T. diffusa*, administrado em dose de 500 mg/kg, foi eficaz em inibir significativamente o desenvolvimento da lesão induzida pelo TNBA no cólon dos animais. Esta inibição foi de 19,5 %. A dose de 250 mg/kg inibiu de modo não significativo o desenvolvimento da lesão (10,5 %). A avaliação bioquímica das amostras de cólon obtidas destes mesmos animais revelou que os níveis de glutathiona total não foram aumentados. No entanto, o pré-tratamento com o infuso de *T. diffusa* na dose de 500 mg/kg foi significativamente eficiente em reduzir a atividade da MPO no cólon lesado, onde a porcentagem de inibição alcançada foi de 26,5 % em relação à atividade demonstrada nas amostras do grupo controle.

4.3.8. Peroxidação lipídica de membranas isoladas de fígado de ratas

Neste experimento foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* dos infusos obtidos de *T. ulmifolia* e de *T. diffusa*. Os resultados estão expressos na tabela 9 como porcentagem de inibição da produção de MDA determinada para cada concentração dos infusos empregada, em relação ao grupo que produziu 100 % de peroxidação.

Tabela 9= Efeito inibitório dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*, sobre a peroxidação lipídica induzida em membranas isoladas de fígado de ratas.

Tratamento	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	% de inibição	IC ₅₀ %
"sham"	-	-	
Infuso <i>T. ulmifolia</i>	25.0	80*	7.12 ug/ml r=0,976
	18.7	80*	
	12.5	73.5*	
	6.25	47.8*	
	2.5	10	
	1.25	3.6	
	0.25	1.5	
"sham"	-	-	
Infuso <i>T. diffusa</i>	25.0	69*	16.8 ug/ml r=0,897
	18.7	55*	
	12.5	36*	
	6.25	10	
	2.5	5.5	
	1.25	3	
	0.25	0.5	

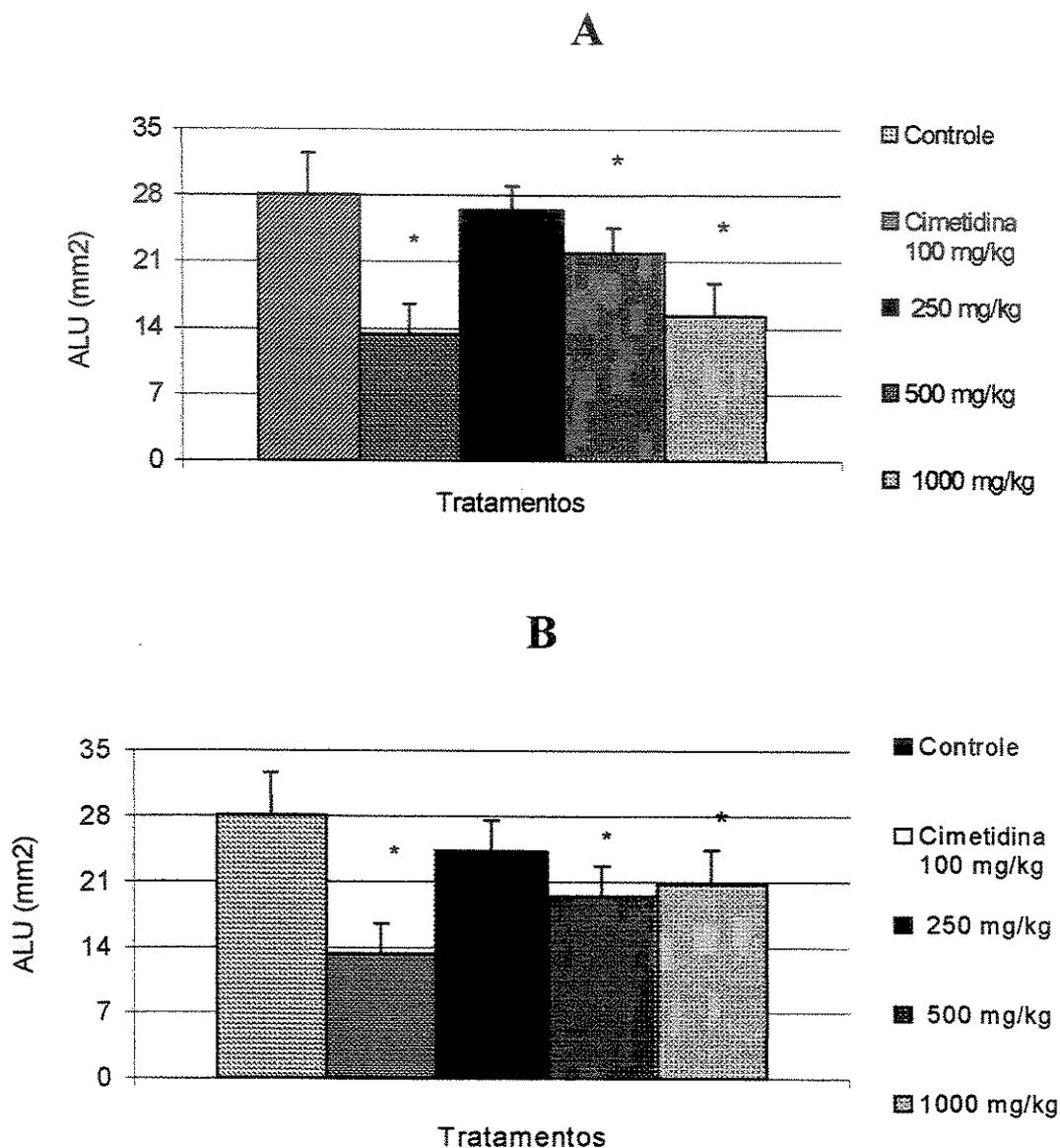
Teste *T de Student* * $P < 0,05$

Os resultados obtidos no ensaio de peroxidação lipídica de membrana de fígado de ratas demonstram que ambos infusos foram eficazes em prevenir a peroxidação da membrana nas maiores concentrações empregadas. O infuso de *T. ulmifolia* inibiu significativamente a produção de MDA em 80, 73,5 e 48 % em concentrações de 25, 12.5 e 6.25 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A IC_{50} % para este infuso foi de 7.12 $\mu\text{g/ml}$. Do mesmo modo, o infuso de *T. diffusa* inibiu significativamente a produção de MDA em 69, 55 e 36 % nas concentrações de 25, 18.7 e 12.5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A IC_{50} % para este infuso foi de 16.8 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.9. Úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos

A atividade curativa dos infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, administrados por via oral, em doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, durante 14 dias consecutivos, foi avaliada na presença de ulceração crônica induzida por ácido acético 30 % na mucosa gástrica de ratos. Os resultados obtidos com os infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* estão expressos na figura 8 (A) e (B), na forma da média \pm d. p. da média, em relação aqueles resultados obtidos para o grupo controle. A lesão gástrica produzida e o efeito curativo promovido pelos tratamentos empregados podem também serem observados na ilustração 1.

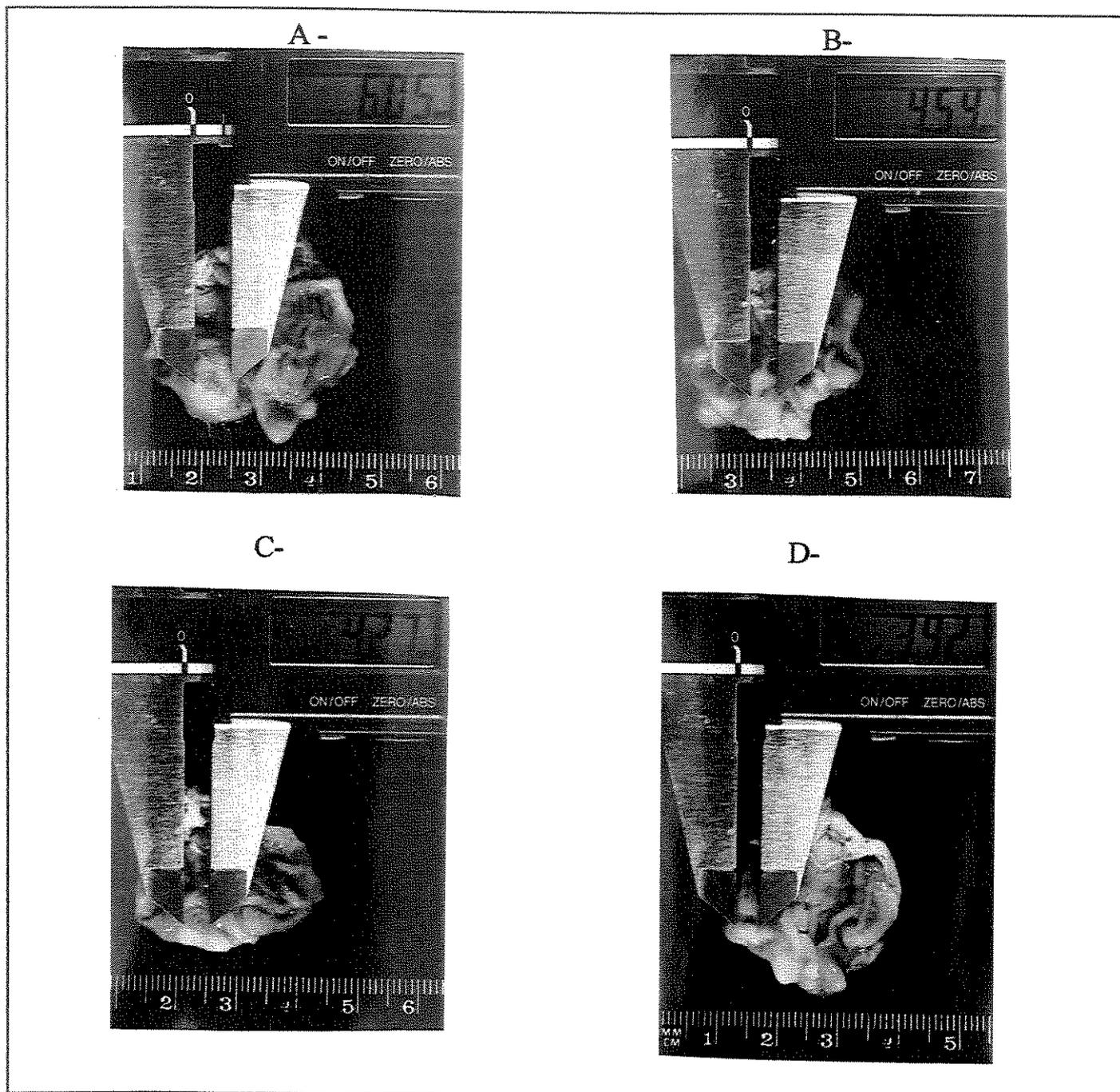
Figure 8: Área da lesão ulcerativa induzida pela administração de ácido acético 30 % na mucosa gástrica de ratos após o tratamento com o infuso de *T. diffusa* (A) e *T. ulmifolia* (B) em doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, por via oral, durante 14 dias consecutivos.



T. diffusa - ANOVA - $F_{(4,35)} = 20.92$, $P < 0,05$; Teste de Dunnett * $p < 0,05$ (n=8).

T. ulmifolia - ANOVA - $F_{(4,35)} = 29.44$, $P < 0,05$; Teste de Dunnett * $p < 0,05$, (n=8).

Ilustração 1: Área da lesão ulcerativa induzida por ácido acético 30 % na mucosa gástrica de ratos. As fotos a, b, c e d representam, respectivamente, estômagos de animais tratados com salina, cimetidina (100 mg/kg), com o infuso de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* em dose de 1000 mg/kg, durante 14 dias consecutivos.



Foi possível observar que a área média de lesão gástrica nos estômagos de animais controle, após 14 dias da injeção do ácido acético foi de 28 mm²; já nos estômagos de ratos tratados com o infuso de *T. diffusa* em doses de 250, 500 e 1000 mg/kg/dia a área média de lesão foi de 26, 21 e 15 mm², respectivamente. Estes valores representaram um percentual de redução da lesão de 6, 22 e 45 %, respectivamente.

Nos estômagos de ratos tratados com o infuso de *T. ulmifolia* nas mesmas doses e via de administração, a área média de lesão obtida foi de 24, 19 e 21 mm², respectivamente, o que representou um percentual de redução da lesão de 13, 30 e 26 %, respectivamente. A droga padrão utilizada, cimetidina (100 mg/kg), administrada pela mesma via e durante o mesmo período, foi eficaz em promover a remissão da lesão em aproximadamente 52 %, o que correspondeu a uma área média de lesão de 13 mm².

4.3.10. Produção de muco livre na mucosa gástrica de camundongos

Neste experimento foi avaliada a capacidade dos infusos em aumentar o muco livre na mucosa gástrica de camundongos submetidos à ligadura de piloro. Os resultados estão expressos na tabela 11 como a porcentagem de aumento do muco livre em relação ao muco produzido pelos animais do grupo controle.

Tabela 10: Efeitos dos infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, administrados por via intraduodenal, na produção de muco livre na mucosa gástrica de camundongos.

Espécie	Tratamento	Dose (mg/kg)	Muco ligado (mg/g)	pH	Volume (mg)	% aumento
<i>Turnera diffusa</i>	Salina	-	1,70 ± 0,23 ^a	2,45 ± 0,44	432 ± 43,9	-
	Salina + indo	20	1,35 ± 0,24	2,1 ± 0,57	411 ± 57,9	-20,58
	Infuso	500	2,22 ± 0,38 ^b	3,0 ± 0,5	446 ± 37,4	30,58
	Infuso + indo	500 - 30	1,11 ± 0,10 ^c	2,21 ± 0,39	400 ± 0,39	-34,7
	Infuso	1000	1,90 ± 0,12	2,64 ± 0,48	422 ± 16,14	11,76
	Infuso + indo	1000 - 30	1,0 ± 0,23 ^d	2,07 ± 0,45	403 ± 21,31	-41,5
<i>Turnera ulmifolia</i>	Salina	-	1,70 ± 0,23 ^a	2,45 ± 0,44	432 ± 43,9	-
	Salina + indo	20	1,35 ± 0,24	2,1 ± 0,57	411 ± 57,9	-20,58
	Infuso	500	2,15 ± 0,23 ^b	2,5 ± 1,0	426 ± 35,74	26,47
	Infuso + indo	500 - 30	1,69 ± 0,17	2,21 ± 0,57	417 ± 31,29	-0,58
	Infuso	1000	2,34 ± 0,21 ^b	2,92 ± 0,61	428 ± 27,36	37,64
	Infuso + indo	1000 - 30	1,72 ± 0,27 ^c	2,21 ± 0,57	403 ± 49,84	1,17

T. diffusa - ANOVA - $p < 0,05$; $F_{(5,47)} = 37,90$; Teste de Tuckey: ^a salina ≠ saline + indometacina; ^b Infuso 500 mg/kg ≠ salina; ^c indometacina + Infuso 500 mg/kg ≠ Infuso 500 mg/kg; ^d indometacina + Infuso 1000 mg/kg ≠ Infuso 1000 mg/kg;

T. ulmifolia - ANOVA - $p < 0,05$; $F_{(5,47)} = 17,31$; Teste de Tuckey: ^a salina ≠ saline + indometacina; ^b Infuso 500 e 1000 mg/kg ≠ salina; ^c Infuso 500 e 1000 mg/kg ≠ salina + indometacina.

Os dados obtidos demonstram que o tratamento prévio dos animais com a droga antiinflamatória não esteroideal reduziu a quantidade de muco na mucosa gástrica em aproximadamente 21 %, em relação ao muco produzido pelos animais do grupo tratado com salina (1,70 – 1,35 mg/g). O tratamento dos animais com o infuso de *T. diffusa* na dose de 500 mg/kg, foi eficaz em aumentar o muco livre na mucosa dos animais em 30 %, (1,70 – 2,22 g/kg), em relação ao muco produzido pelos animais do grupo controle.

O pré-tratamento com indometacina reverteu significativamente o aumento de muco produzido pelo infuso (2,22 para 1,11 mg/g) e também em relação ao muco produzido pelo controle quando esta dose foi empregada; a redução imposta pela indometacina representa um percentual de 34,7 % em relação ao muco produzido pelo controle. O tratamento com este infuso na dose de 1000 mg/kg não foi eficaz em elevar significativamente o parâmetro avaliado em relação ao controle (1,7 - 1,9 mg/g); entretanto, a indometacina reduziu a quantidade de muco produzida com este tratamento (1,9 – 1,0 mg/g), e também quando comparado em relação ao muco produzido pelo controle. Esta redução representou 41,5 %.

O tratamento dos animais com o infuso de *T. ulmifolia*, empregando-se as mesmas doses utilizadas para o infuso de *T. diffusa* foi eficaz em aumentar o muco livre na mucosa dos animais nas doses de 500 (1,7 – 2,1 mg/g) e 1000 (1,7 – 2,34 mg/g).

A porcentagem de aumento foi de 26 e 37 %, respectivamente, em relação a quantidade de muco livre produzida pelos animais do grupo controle. O pré-tratamento com indometacina foi significativamente eficaz em reverter o aumento (2,15 – 1,69 mg/g) e (2,34 para 1,72 mg/g) de muco livre produzido, porém não foi significativamente eficiente em reduzir o níveis de muco produzido abaixo daquele obtido pelo grupo controle (1,70 - 1,69 mg/g) e (1,70 – 1,72 mg/g), nos mesmos tratamentos empregados.

4.3.11. Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos

A propriedade dos infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, em aumentar a síntese de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos, na ausência ou presença de um antiinflamatório não esteroideal foi estudada. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 11 como porcentagem de aumento na síntese de prostaglandina em relação à produção obtida nos animais do grupo controle.

Tabela 11: Efeitos dos infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, administrados por via oral, na síntese de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos.

Espécie	Tratamento	Dose (mg/kg)	pH	PGs (pg/mg)	% aumento
<i>Turnera diffusa</i>	Sham	-	2,58 ± 0,38	133 ± 16,42	-
	Salina	-	2,25 ± 0,42	140,3 ± 29,2 ^a	-
	Salina + indo	20	1,75 ± 0,27	45,3 ± 19,6	-67
	Infuso	500	2,5 ± 0,29	154,8 ± 13,5	10
	Infuso + Indo	500	2,14 ± 0,24	121,1 ± 13,7	-13,5
	Infuso	1000	2,78 ± 0,76	172,7 ± 41,4	22,8
	Infuso + Indo	1000	2,14 ± 0,48	125,85 ± 8,9	-10,7
<i>Turnera ulmifolia</i>	Sham	-	2,58 ± 0,38	133 ± 16,42	-
	Salina	-	2,25 ± 0,42 ^a	140,3 ± 29,2 ^a	-
	Salina + indo	20	1,75 ± 0,27	45,3 ± 19,6	-67
	Infuso	500	2,35 ± 0,38	145,0 ± 14,7	3,5
	Infuso + Indo	500 - 30	2,1 ± 0,38	92,28 ± 16,13 ^b	-34
	Infuso	1000	2,57 ± 0,45	127,42 ± 5,83	9,5
	Infuso + Indo	1000 - 30	2,07 ± 0,53	122,8 ± 8,8	-12

T. diffusa - ANOVA - $p < 0,05$, Prostaglandina $F_{(4,39)} = 14,05$; Teste de Tukey: ^a salina ≠ saline + indometacina; ^b Infuso 500 mg/kg + indometacina ≠ salina; pH $F_{(6,39)} = 65,78$; Teste de Tukey: ^a salina ≠ saline + indometacina;

T. ulmifolia - ANOVA - $p < 0,05$, Prostaglandina $F_{(6,39)} = 23,58$; Teste de Tukey: ^a salina ≠ saline + indometacina.

Os dados obtidos demonstram que o tratamento prévio dos animais com a indometacina reduziu a quantidade de prostaglandina sintetizada na mucosa gástrica em aproximadamente 67 % em relação aos níveis quantificados na mucosa dos animais tratados com salina (140 – 45 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Nenhum dos tratamentos empregados com os infusos nas dose de 500 e 1000 mg/kg foi eficiente em elevar a quantidade de prostaglandina sintetizada na mucosa dos animais.

No entanto, o tratamento dos animais com o infuso de *T. diffusa* nas doses de 500 e 1000 mg/kg foi eficaz em impedir que os níveis de prostaglandina fossem significativamente reduzidos abaixo daqueles quantificados para o grupo controle (140 – 121 ug/g) e (140 – 125 ug/mg), quando previamente tratados com indometacina.

Nenhum dos tratamentos realizados com o infuso de *T. ulmifolia* foi eficaz em elevar significativamente os níveis de prostaglandina. Por outro lado, a dose de 1000 mg/kg deste infuso também foi eficaz em impedir que os níveis de prostaglandina fossem reduzidos significativamente abaixo daqueles quantificados para o grupo controle (140 - 127 ug/mg). Isto não ocorreu com o tratamento dos animais na dose de 500 mg/kg, onde os níveis de prostaglandinas foram significativamente reduzidos (140 – 92 ug/mg) em virtude do tratamento prévio com indometacina.

4.4. Análise fitoquímica dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*

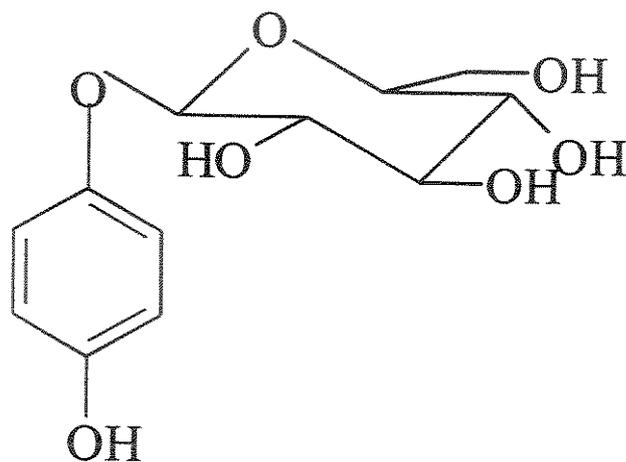
Tabela 12: Resultados da triagem fitoquímica realizada com os infusos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*. Os sinais (+) ou (-) indicam, respectivamente, presença ou ausência das substâncias químicas indicadas.

Infuso de <i>T. diffusa</i>								
Alcalóides	Antraquinonas	Flavonóides	Saponinas, sesquiterpenos, esteróides	Taninos	Compostos fenólicos	p-arbutina	Catequinas, Rutina, Isoquercetina	Ácido clorogênico
-	-	+	-	-	+	+	-	-
Infuso de <i>T. ulmifolia</i>								
Alcalóides	Antraquinonas	Flavonóides	Saponinas, sesquiterpenos, esteróides	Taninos	Compostos fenólicos	Catequinas Rutina Isoquercetina	Ácido clorogênico	
-	-	+	-	-	-	-	-	-

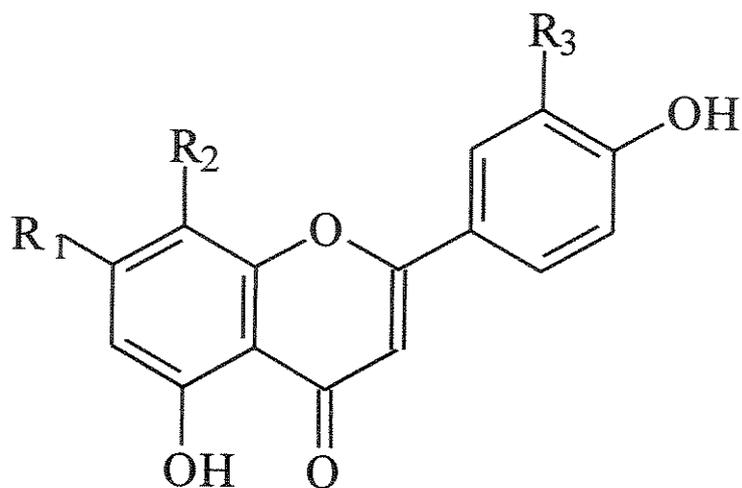
(+) = presença; (-) = ausência

A triagem fitoquímica do infuso de *T. diffusa* revelou que os principais compostos presentes no liofilizado desta espécie são flavonas C-glicosilados derivadas da luteolina e da apigenina. Nesse infuso foi encontrado também o composto fenólico caracterizado como p-arbutina (estrutura química 2). O conjunto de flavonóides identificados no infuso de *T. diffusa* está apresentado na tabela 12; cada um dos flavonóides identificados pode ser visualizado inserindo cada

respectivo radical (R1, R2 e R3) no local correspondente, a partir da estrutura básica (estrutura química 3).



Estrutura química 2: P-arbutina, isolada no infuso de *T. diffusa* (p-arbutina).

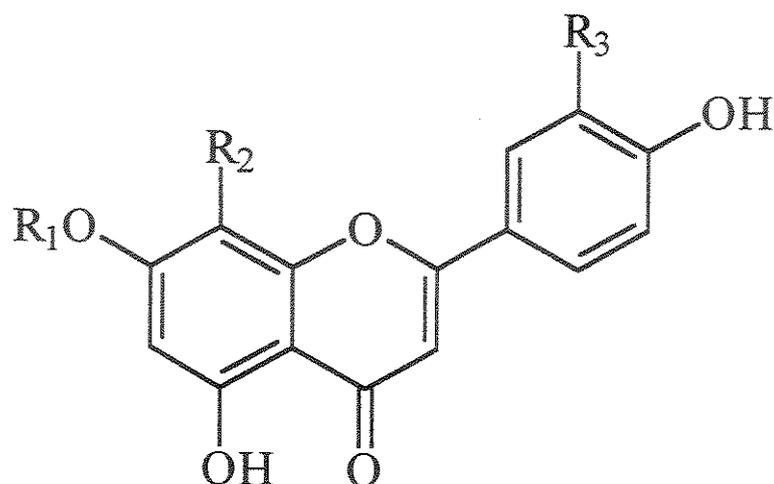


Estrutura química 3: Estrutura básica dos flavonóides encontrados no infuso de *T. diffusa*.

Tabela 13 - Flavonóides encontrados no infuso de *T. diffusa*

Flavonóides	R ₁	R ₂	R ₃
1- Luteolina-8-C- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 2) quinovopiranosídeo	H	qui(1 \rightarrow 2)rha	OH
2- Apigenina-7- β -D-glucopiranosídeo	glc	H	H
3- Apigenina-7-O- β -D(6''-p-coumaroil) glucopiranosídeo	Glc - p-coum	H	H
4- Vitexina-2''-)- α -L-rhamnopiranosídeo	H	glc(1 \rightarrow 2)rha	H
5- Orientina-2''-O- α -L-rhamnopiranosídeo	H	glc(1 \rightarrow 2)rha	OH
6- Orientina-3'-metoxi-6''-O- β -D- glucopiranosídeo	H	glc(1 \rightarrow 6)glc	OCH ₃

A triagem fitoquímica do infuso obtido de *T. ulmifolia* revelou que os principais compostos presentes neste liofilizado são também flavonas C-glicosilados derivadas da luteolina e da apigenina. O conjunto de flavonóides identificados no infuso de *T. ulmifolia* está apresentado na tabela 13; cada um dos flavonóides identificados pode ser visualizado inserindo cada respectivo radical (R1, R2 e R3) no local correspondente, a partir da estrutura básica (estrutura química 4).



Estrutura química 4: Estrutura básica dos flavonóides encontrados no infuso de *T. ulmifolia*.

Tabela 14 - Compostos encontrados no infuso de *T. ulmifolia*.

Flavonóides	R ₁	R ₂	R ₃
1- vitexina-2'''-O-β-D-xylopiranosídeo	H	glc(1→2)xyl	H
2- orientina-2'''-O-β-D-glucopiranosídeo	H	glc(1→2)glc	OH
3- vitexina-2'''-O-β-D-glucopiranosídeo	H	glc(1→2)glc	H
4- orientina-2'''-O-α-L-rhamnopiranosídeo	H	glc(1→2)rha	OH
5- vitexina-2'''-O-α-L-rhamnopiranosídeo	H	glc(1→2)rha	H
6- vitexina	H	glc	OH
7- isoorientina	glc	H	OH

V- DISCUSSÃO

Os solventes escolhidos para preparar os extratos das espécies *T. diffusa* e *T. ulmifolia* foram julgados os mais seletivos, partindo-se das informações químicas preliminares das espécies. Assim, foram preparados extratos apolares, de polaridade intermediária e polares, ou seja, aqueles obtidos com hexano, diclorometano, etanol absoluto e mistura hidroalcoólica 70 %. A matéria vegetal utilizada foi obtida a partir da secagem das partes aéreas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*. Contudo, como não existem muitos estudos abordando identificação e isolamento de substâncias dessas espécies, aparentemente, devido à complexa composição destes vegetais, a utilização dos solventes como meios extratores levou, provavelmente, ao arraste concomitante de várias substâncias.

No ensaio para a determinação da toxicidade aguda em camundongos dos extratos de diferentes polaridades e dos infusos obtidos das espécies selecionadas foi demonstrado que, nas doses empregadas, nenhum sinal de toxicidade significativo pode ser detectado durante todo o período de observação. Nenhuma alteração morfológica foi detectada após a retirada e pesagem dos órgãos dos animais tratados. Também não foram detectadas alterações no consumo de água e de ração, bem como na quantidade de excretas (fezes e urina), durante o mesmo período de observação (dados não demonstrados).

Nenhuma morte foi observada pela administração da amostra vegetal até a dose de 5000 mg/kg, indicando que a DL_{50} destas amostras, administradas por via oral, é superior a 5000 mg/kg, para camundongos (Litchfield e Wilcoxon, 1949). Estes resultados sugerem que, tanto o método de extração empregado, quanto o solventes utilizados, não extraíram compostos químicos com propriedades tóxicas que pudessem ser evidenciadas nas doses e condições experimentais aqui empregadas. No entanto, estudos da toxicidade crônica devem ser realizados antes de uma possível confirmação da ausência de toxicidade das espécies.

Por outro lado, a ausência de efeitos tóxicos agudos permitiu prosseguir com os ensaios farmacológicos utilizando-se os extratos e infusos destas espécies utilizando-se ratos e camundongos na experimentação, sem a preocupação de que uma possível atividade farmacológica pudesse estar ocorrendo como parte de efeitos tóxicos desencadeado pelos compostos presentes nas amostras.

Apesar de, geralmente, um extrato vegetal bruto ser testado na dose de 1000 mg/kg em ensaios farmacológicos preliminares (Souza Brito, 1994), foi estabelecido, baseado em ensaios anteriores, que a dose de 100 mg/kg seria a utilizada nesta primeira etapa onde os extratos foram estudados, administrados sempre por via oral ou intraduodenal, em volume final de 10 ml/kg, nos experimentos de indução de úlceras gástricas em camundongos. Para tanto, utilizou-se como referência, a dose terapêutica da cimetidina (100 mg/kg). O

objetivo de ter sido utilizado uma baixa dose inicial foi avaliar, com maior sensibilidade, a atividade biológica das espécies em estudo.

Assim, foi feito o estudo da possível atividade antiulcerogênica dos extratos de diferentes polaridades obtido de cada planta baseado na utilização popular das espécies, buscando enquadrar estas indicações nos diferentes modelos de úlcera péptica reproduzíveis em laboratório, os quais induzem as lesões ulcerativas por diferentes mecanismos fisiopatológicos, já descritos anteriormente.

Quando iniciaram-se os testes farmacológicos com os diferentes extratos obtidos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* foi possível observar, que para a espécie *T. diffusa* no experimento de úlcera induzida por estresse, o EHd 70 %, EAd 100 %, EDCMd e cimetidina inibiram significativamente o aparecimento das lesões em relação ao controle negativo, mas não foram estatisticamente diferentes entre si, sugerindo que todas têm o mesmo padrão de atividade, neste modelo experimental. Para a espécie *T. ulmifolia*, ensaiada no mesmo modelo, as amostras EAu 100 %, EDCMu, EHXu e cimetidina inibiram significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas em relação ao grupo tratado com Tween. Para esta espécie, também não houve diferença significativa entre os extratos quando comparados entre si ou ainda em relação à cimetidina. Podemos considerar o resultado alcançado pelo EDCMd como o mais satisfatório, igualando-se praticamente à porcentagem de inibição alcançada pela droga padrão utilizada (57 %). Ainda, como não foi estabelecida

diferença significativa entre as amostras vegetais quando comparadas entre si neste modelo experimental, considerou-se não ter havido separação adequada do(s) composto(s) ativo(s) responsáveis pela atividade antiulcerogênica nos diversos extratos, para ambas as espécies. No entanto, é importante lembrar, que mesmo se tratando de extratos brutos, os resultados obtidos foram sempre semelhantes àqueles da droga padrão utilizada.

Em outro experimento, tanto os extratos obtidos de *T. diffusa* quanto aqueles obtidos de *T. ulmifolia*, com a exceção do EHd 70 %, foram eficazes em proteger a mucosa gástrica contra a ação lesiva da solução de um agente irritante moderado da mucosa gástrica (HCl/etanol 60%). Os resultados obtidos para a espécie *T. diffusa* no modelo de HCl/etanol demonstram que houve ainda diferença significativa entre o EDCMd e o EHd 70 %, mas não entre o EDCMd e EAd 100 %, quando comparados entre si. Sugeriu-se assim que, para esta espécie, neste modelo, o(s) composto(s) ativo(s) responsáveis pela atividade antiulcerogênica estariam mais concentrados no EDCMd e EAd 100 %.

Para a espécie *T. ulmifolia*, no mesmo modelo, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras quando comparadas uma em relação a outra ou em relação a cimetidina. Desta forma, considerou-se que para a *T. ulmifolia* não houve separação adequada do(s) composto(s) ativo(s) responsável(eis) pela atividade antiulcerogênica.

Quando um potente inibidor da síntese de prostaglandinas (indometacina) foi utilizado para indução das lesões ulcerativas, ficou claro que os animais tratados com as amostras de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* mantiveram a integridade da mucosa gástrica, pois a maioria dos extratos inibiu significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas induzidas por este tipo de agente agressivo.

Os resultados obtidos para a espécie *T. diffusa* demonstram que as amostras EAd 100 %, EDCMd e cimetidina foram as que alcançaram os maiores índices de inibição das lesões ulcerativas. A amostra EHd 70 % novamente não apresentou resultado significativo, inibindo as lesões em 27 %, sugerindo que o(s) princípio(s) responsável(is) pela atividade está(ão) mais concentrados no EDCMd.

Os resultados obtidos para a espécie *T. ulmifolia* no mesmo modelo, demonstram que as amostras EAU 100 %, EDCMu e a cimetidina inibiram, todas significativamente em relação ao controle negativo, o aparecimento das lesões ulcerativas porém, sem diferença significativa entre elas sugerindo que a atividade obtida por eles tem potência semelhante. De forma geral, considerou-se que para esta espécie a extração realizada não separou adequadamente o(s) princípio(s) responsável(is) pela atividade antiulcerogênica. Quando foi realizado o experimento de ligadura de piloro em camundongos, foi possível observar que a administração intraduodenal das amostras vegetais obtidas de *T. diffusa* não foram eficazes em alterar nenhum dos parâmetros avaliados (pH, concentração de íons H^+

e volume gástrico). Para a espécie *T. ulmifolia* foram observadas alterações significativas no pH, onde as amostras EAU 100 %, EDCMu e a cimetidina elevaram significativamente este parâmetro; não foram observadas, entretanto, diferenças significativas entre elas. Em relação à concentração de íons H^+ ionizáveis, somente o EDCMu e a cimetidina foram eficazes em reduzi-los. Nenhuma das amostras desta espécie foi eficaz em modificar a quantidade do conteúdo gástrico dos animais neste experimento. Aparentemente, o EDCMu concentra as substâncias responsáveis pela alteração na concentração de íons H^+ ionizáveis. Os resultados obtidos pelas outras amostras nos outros parâmetros, não podem ser ainda descartados e necessitam ser melhor avaliados. As substâncias contidas no EDCMu, provavelmente, têm absorção intestinal e certamente possuem ação sistêmica.

De forma geral, os resultados obtidos nos ensaios preliminares com as amostras obtidas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* puderam confirmar que as duas espécies apresentam atividade antiulcerogênica em camundongos, estando a atividade dispersa entre os diferentes extratos dependendo do modelo utilizado. Possivelmente exista mais de um princípio ativo antiulcerogênico em cada espécie ou então, não ocorreu separação do mesmo nos diversos meios extratores utilizados inicialmente. No caso de mais de um princípio ativo, certamente, estas substâncias teriam características de polaridade diferentes estando os de menor

polaridade, mais concentrados nos extratos obtidos com diclorometano ou hexano e os de maior polaridade, presentes no extrato alcoólico ou na mistura hidroalcoólica.

Ainda, em relação a estes ensaios farmacológicos preliminares, mesmo a amostra EHd 70 % não tendo apresentado resultado significativo nos modelos de indometacina e de HCl/etanol (27 e 20 % de inibição, respectivamente em cada modelo), estas porcentagens são consideradas satisfatórias, levando-se em consideração a baixa dose utilizada.

O que levou ao estudo dos extratos mais polares e preparação dos infusos, apesar de aqueles de menor polaridade estarem demonstrando atividade superior, foi o fato de que a população utiliza as plantas na forma de chá e o estudo etnofarmacológico é um dos principais elementos de sustentação deste trabalho. Por isso, insistiu-se no estudo de uma preparação totalmente aquosa, mesmo sabendo que estes princípios poderiam estar presentes nelas em menor quantidade. Desta forma, após a análise e discussão dos resultados obtidos anteriormente, foi decidido que os estudos da atividade antiulcerogênica e antiinflamatória intestinal das espécies selecionadas, bem como os estudos fitoquímicos e de mecanismo de ação, seriam realizados a partir dos infusos obtidos das partes aéreas de cada espécie e não mais dos extratos orgânicos empregados anteriormente. Assim, o estudo da possível atividade farmacológica dos infusos obtidos de cada planta

desenvolveu-se, inicialmente, nos mesmos modelos de indução de úlceras gástrica em camundongos.

Quando o infuso de *T. diffusa*, em doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg e a cimetidina na dose de 100 mg/kg, foram testadas no modelo de úlcera gástrica induzida por estresse, foi possível observar que duas das quatro doses testadas (500 e 1000 mg/kg) e a cimetidina foram eficientes em inibir o aparecimento das lesões gástricas em 39, 54 e 68 %, respectivamente; dentre as doses que promoveram inibição significativa das lesões, observou-se que a dose de 1000 mg/kg foi aquela que apresentou resultados próximos a aqueles alcançados pela cimetidina. No entanto, neste experimento, não foi possível determinar se a dose de 1000 mg/kg foi realmente a mais ativa já que a atividade inibitória obtida não diferiu significativamente daquela alcançada com a dose de 500 mg/kg. Sugeriu-se então que os princípios ativos responsáveis pela atividade preventiva do infuso de *T. diffusa*, em relação à úlcera induzida por estresse, concentraram-se principalmente nas dose de 500 e 1000 mg/kg.

Utilizando-se o mesmo modelo experimental, foi observado que o pré-tratamento dos animais com o infuso de *T. ulmifolia*, nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg e com cimetidina, inibiu significativamente o aparecimento das lesões gástricas em 48, 57, 58 e 68 %, respectivamente. Neste experimento não foi possível determinar qual dose foi a mais ativa, já que as doses de infuso

empregadas não diferiram significativamente quando comparadas entre si. O mesmo ocorreu quando estas amostras foram comparadas com a cimetidina. Estes resultados possibilitaram afirmar que os princípios ativos do infuso de *T. ulmifolia* encontram-se presentes em maior concentração a partir da dose de 250 mg/kg já que não houve aumento da atividade relacionado ao aumento da dose. É importante ressaltar que, mesmo em se tratando de infusos, os resultados obtidos para ambas as espécies foram sempre de eficácia próxima àquela da droga padrão utilizada, porém sempre em doses 2,5 a 10 vezes superiores.

Provavelmente, os compostos ativos presentes no infuso das espécies estudadas poderiam regular a produção de ácido gástrico excessiva causada pelo estresse, interferindo com a ação dos mediadores responsáveis por esta secreção aumentada, inibindo sua liberação ou bloqueando seus receptores específicos. Por outro lado, tanto drogas que inibem a secreção gástrica como aquelas que aumentam os mecanismos de defesa da mucosa gástrica auxiliam na prevenção do aparecimento das lesões ulcerativas induzidas por estresse; estas drogas podem restabelecer as alterações circulatórias na mucosa gástrica e modular ou abolir o estímulo para a secreção ácida (Lewis e Hanson, 1991; Hirschowitz *et al.*, 1995; Bruton, 1996; Evans, 1996; Wolfe e Sachs, 2000).

Como descrito inicialmente por Mizui e Doutechi em 1981, as úlceras induzidas por um agente irritante moderado da mucosa gástrica, como é o caso do

etanol associado ao ácido clorídrico se desenvolvem, principalmente, a debilidade da camada muco protetora e a exacerbação da secreção ácida e péptica. No experimento de lesões gástricas induzidas por HCl/etanol em camundongos, tanto o infuso obtido das partes aéreas de *T. diffusa*, quanto aquele de *T. ulmifolia*, testados nas diferentes doses, foram eficazes em proteger a mucosa gástrica contra a ação lesiva destes agentes.

Os resultados obtidos para o infuso da espécie *T. diffusa* demonstram que as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg inibiram significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas em 63, 72 e 82 %, respectivamente. Nenhuma das doses ativas, no entanto, apresentou-se diferente, do ponto de vista de eficácia, do lansoprazol (30 mg/kg). Como não houve diferenças estatisticamente significativas no perfil de atividade quando as três doses ativas foram comparadas entre si, é possível supor novamente que, o(s) princípio(s) ativo(s) só exibe(m) atividade a partir da dose de 250 mg/kg ou que somente a partir desta dose, seu(s) efeito(s) pode(m) ser detectado(s).

Os resultados obtidos com o pré-tratamento dos animais com o infuso da espécie *T. ulmifolia*, no mesmo modelo, indicaram que somente as doses de 500 e 1000 mg/kg e aquela de lansoprazol inibiram o aparecimento das lesões ulcerativas em 39, 46 e 74 %, respectivamente. Os efeitos obtidos foram similares ao do lansoprazol, mas não foram demonstradas diferenças significativas entre as

inibições alcançadas pelas doses de 500 e 1000 mg/kg, sugerindo que em ambas as amostras, o(s) princípio(s) ativo(s) antiulcerogênico(s) está(ão) igualmente presente(s).

Mais uma vez vale chamar a atenção para o fato de que o infuso destas espécies, dependendo da dose empregada, apresentaram resultados semelhantes àqueles da droga padrão utilizada, lansoprazol. É possível que compostos ativos presentes no infuso de cada espécie atuem auxiliando na manutenção da integridade da mucosa gástrica aumentando o suprimento de muco e bicarbonato para a mucosa e/ou restabelecendo a integridade vascular que mantém o fluxo sanguíneo local. Além disso, como sugerido no experimento de estresse, estes compostos poderiam ainda inibir a secreção do ácido clorídrico, o que, pelo menos em parte, já seria suficiente para reduzir o número de lesões induzidas pelo etanol. (Mizui e Douteuchi, 1983; Oates, 1988; Lewis e Hanson, 1991; Evans, 1996; Pandolfino *et al.*, 2000). Neste caso, tanto drogas que inibem a secreção ácida, como aquelas que aumentam os mecanismos de defesa da mucosa, podem ser utilizadas para a prevenção e tratamento deste tipo de lesão (Lewis e Hanson, 1991; Hirschowitz *et al.*, 1995; Bruton, 1996; Evans, 1996; Wolfe e Sachs, 2000).

Quando a associação de indometacina e betanecol foi novamente utilizada para indução das lesões ulcerativas ficou claro que o pré-tratamento dos animais com o infuso de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* foi efetivo em manter a integridade da

mucosa gástrica. No entanto, os resultados obtidos com o infuso de *T. diffusa* diferiram daqueles obtidos até o momento, onde as maiores doses apresentavam melhor atividade inibitória.

Neste modelo foi demonstrado que as doses de 100, 250 e 500 mg/kg do infuso de *T. diffusa* e aquela da cimetidina, inibiram o aparecimento das lesões ulcerativas em 39, 62, 47 e 46 %, respectivamente, o que não ocorreu com o tratamento na dose de 1000 mg/kg (18 %). Nenhuma das doses ativas apresentou resultados diferentes daquele apresentado pela droga padrão.

Provavelmente, no infuso desta espécie, além das substâncias responsáveis pela atividade antiulcerogênica, existam outras substâncias que se concentraram já a partir da dose de 500 mg/kg. Estas substâncias, poderiam interferir com a habilidade do(s) princípio(s) ativo(s) antiulcerogênico(s) presente(s) no infuso, de exercer(em) seu efeito protetor. No entanto, é sabido que o aumento excessivo na concentração de determinados princípios ativos em uma preparação vegetal bruta pode, ao contrário da atividade farmacológica sugerida, obter-se efeitos tóxicos ou colaterais que sobrepõem aquele esperado. Este tipo de resultado tem sido principalmente relatado durante a utilização de algumas preparações ricas em flavonóides utilizadas para o tratamento de inflamações intestinais, onde, pequenas doses de flavonóides são eficientes e, quando se aumenta a dose, a preparação passa a ser lesiva ao tecido tratado (Gálvez, *et al* 1994; Gálvez, *et al* 2000a;

Gálvez, *et al* 2000b). Este mecanismo parece também estar relacionado a inibição das úlceras induzidas por indometacina, quando se utiliza o infuso de *T. diffusa* para a sua prevenção.

Os resultados obtidos para o infuso da espécie *T. ulmifolia*, no mesmo modelo, demonstram que as dose de 500 e 1000 mg/kg inibiram o aparecimento das lesões ulcerativas em 58 e 72 %, respectivamente. No entanto, não houve diferença entre estes resultados e aqueles obtidos com a cimetidina (46 %) sugerindo, novamente, que os compostos presentes nestas amostras vegetais apresentam potência semelhante a da cimetidina em inibir o aparecimento de lesões, independente do agente indutor de lesão descrito até o momento. Diferenças foram obtidas também entre as dose de 500 e 1000 mg/kg sugerindo que a dose de 1000 mg/kg foi a que apresentou maior concentração do(s) princípio(s) responsável(is) pela atividade antiulcerogênica.

Levando-se em consideração os resultados obtidos com as duas espécies no modelo de indometacina e betanecol, é possível sugerir que haja interferência da(s) substância(s) ativa(s) presente(s) nas amostra vegetais com o mecanismo de ação ulcerativo da indometacina. Desta forma, haveria interferência dos infusos com os metabólitos da ciclooxigenase, em especial prostaglandinas do tipo E₂, impedindo sua degradação e/ou estimulando sua síntese, já que a mucosa dos animais manteve-se íntegra, em grande parte, e estes fatores poderiam ser sugeridos como

base para possíveis mecanismos antiulcerogênicos dos infusos obtidos destas espécies (Lewis e Hanson, 1991; Hirschowitz *et al.*, 1995; Brunton, 1996; Evans, 1996; Wolfe e Sachs, 2000).

Quando o modelo de ligadura de piloro foi empregado, foi possível observar, através da administração intraduodenal do infuso de *T. diffusa*, que na dose de 1000 mg/kg houve uma elevação significativa do pH e também uma diminuição na concentração de íons H^+ , semelhantes àquela obtida com a cimetidina na dose de 100 mg/kg. Estes resultados reforçaram aqueles obtidos anteriormente, pois elevação de pH gástrico e diminuição na concentração de íons H^+ são, sem dúvida nenhuma, parâmetros determinantes para a atividade antiulcerogênica da grande maioria de drogas utilizadas na terapêutica da úlcera gástrica em humanos (Hirschowitz *et al.*, 1995; Brunton, 1996; Wolfe e Sachs, 2000).

Também neste modelo, tal como a cimetidina e o infuso de *T. diffusa*, o infuso de *T. ulmifolia* apresentou alterações significativas no pH e na concentração de íons H^+ , quando administrado em doses de 1000 mg/kg. Esta elevação de pH, juntamente com a diminuição da concentração de H^+ apresentada por ambas as espécies, provavelmente estejam relacionadas à capacidade de constituintes químicos presentes nos infusos, de inibirem a secreção ácida mediada pela acetilcolina, gastrina ou histamina interferindo com sua síntese e/ou liberação, ou ainda bloqueando receptores específicos destes importantes secretagogos (Brunton,

1996; Hirschowitz *et al.*, 1995; Wolfe e Sachs, 2000). No entanto, até o momento, não foi descrito em literatura nenhum flavonóide como sendo capaz de antagonizar receptores histamínicos ou muscarínicos, relacionados a secreção ácida no estômago.

Este(s) constituinte(s) poderia(m) atuar ainda inibindo a atividade da enzima responsável pelo fornecimento de íons H^+ ao lúmen gástrico para a formação do ácido clorídrico, como acontece com o lansoprazol e todas as drogas inibidoras da bomba protônica H^+/K^+ - ATPase da célula parietal (Hirschowitz *et al.*, 1995; Brunton, 1996); alguns flavonóides já se mostraram eficazes também em inibir a bomba protônica H^+/K^+ - ATPase da célula parietal em experimentos *in vitro*. Outro modo de ação possível seria a atividade antioxidante ou de “scavenger” de radicais livres, como já aconteceu com alguns flavonóides isolados de plantas (Di Carlo *et al.*, 1999).

Conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença quando não se dispõe de estudos químicos precisos sobre a mesma é uma das principais áreas de atuação da fitoquímica. Uma análise fitoquímica preliminar pode identificar grupos de metabólitos secundários relevantes na espécie, caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica; esta investigação deverá sempre ser

direcionada para um futuro isolamento e a elucidação estrutural dos compostos (Cordel, 1995).

A triagem fitoquímica dos infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* revelou que os principais compostos presentes no liofilizado desta espécie eram flavonóides derivados da luteolina e da apigenina. A análise fitoquímica do infuso de *T. diffusa* revelou também a presença de compostos fenólicos como componentes deste infuso em especial a p-arbutina. É sabido que uma grande variedade de flavonóides vem sendo estudada e vários deles demonstraram atividade sobre o trato gastrointestinal atuando por diferentes mecanismos (Cook, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999; Harbone e Willians, 2000). Foi possível verificar nos estudos realizados até então, mesmo que preliminarmente, que muitos resultados descritos para flavonóides com atividade anti-úlceras assemelhavam-se, em vários aspectos, aos resultados obtidos com os infusos nas metodologias até aqui empregadas.

A confirmação de que flavonóides eram os principais constituintes dos infusos auxiliaram no direcionamento dos estudos da atividade antiulcerogênica das amostras obtidos das partes aéreas de *Turnera diffusa* e *Turnera ulmifolia* os quais foram prosseguidos, agora, em experimentos para determinação da atividade antiulcerogênica dessas espécies em relação ao desenvolvimento de úlceras duodenais, colite inflamatória e úlcera crônica, em ratos. Tais patologias tem sido

estudadas recentemente utilizando-se amostras vegetais contendo flavonóides como amostras experimentais capazes de impedir seu aparecimento e desenvolvimento.

Em relação ao método de indução de úlceras duodenais as lesões foram obtidas pela administração de cisteamina, um agente altamente lesivo para esta tipo de mucosa. O método de indução de úlcera duodenal por cisteamina oferece uma real contribuição para a investigação de substâncias com possível atividade farmacológica protetora sobre a mucosa duodenal. A patogenia das lesões duodenais (LD) em humanos tem sido extensivamente estudada; sabe-se que vários componentes patológicos, incluindo hipersecreção do ácido gástrico, aumento na liberação de gastrina, esvaziamento gástrico descontrolado e a presença da *H. pylori* contribuem para a formação das LD (Poulsen *et al.*, 1985).

Em contrapartida, a inibição de fatores de proteção da mucosa duodenal, tais como a secreção de bicarbonato e do muco, deixam a mucosa susceptível à ação dos agentes lesivos descritos anteriormente e contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de lesões duodenais (Szabo, 1978; 1987). Assim, mecanismos de citoproteção seriam essenciais à manutenção e renovação do epitélio duodenal durante exposição ao agente indutor da lesão. A inibição da liberação de agentes lesivos, por outros mecanismos, também contribui de forma significativa em impedir o aparecimento deste tipo de lesão; por exemplo, a inibição da liberação descontrolada do ácido clorídrico pode ser modulada, ainda no estômago,

impedindo que o ácido em excesso agrida a mucosa duodenal (Wolfe e Sachs, 2000).

Portanto, a inibição dos elementos de proteção da mucosa duodenal e a exacerbação da secreção ácida e péptica, ambos os efeitos desencadeados pela administração da cisteamina, levariam ao desenvolvimento de lesões ulcerativas no duodeno em diferentes estágios, podendo-se observar desde úlceras superficiais e hemorrágicas, até mesmo úlceras que perfuram o duodeno e causam danos a órgãos adjacentes (Poulsen *et al.*, 1985; Szabo, 1978, 1987).

Os resultados obtidos com o tratamento dos animais com os infusos demonstraram que ambos os infusos foram aparentemente ineficientes em interferir com o mecanismo patológico da cisteamina. O índice de lesões duodenais (ILD) não foi significativamente reduzido com a administração do infuso de *T. diffusa* ou com o infuso de *T. ulmifolia*, em doses de 500 e 1000 mg/kg, por via oral. Apesar de não terem sido significativos, os resultados permitem sugerir que, possivelmente, em utilização prolongada os infusos possam reverter significativamente o aparecimento e desenvolvimento deste tipo de lesão, já que a porcentagem de inibição alcançada expressa resultados satisfatórios em se tratando de amostras vegetais não purificadas, administradas em dose única.

Flavonóides também tem sido descritos como potentes agentes antiinflamatórios. Esta atividade farmacológica estaria principalmente relacionada

à capacidade destes compostos químicos em promover a modulação ou inibição da liberação de uma grande variedade de células do sistema imunológico e de autacóides que participam diretamente da resposta inflamatória. A inibição ou ativação de enzimas envolvidas no processo de amplificação da resposta inflamatória também estaria relacionada ao seu potencial terapêutico (Cruz *et al.*, 1998).

A doença de Crohn e a colite ulcerativa são patologias caracterizadas principalmente por um processo inflamatório crônico no intestino de humanos. As doenças inflamatórias intestinais (DII) tem sido objetivo de extensas pesquisas nos últimos anos (Egan e Sandborn, 1998). Embora estas pesquisas ainda não tenham apresentado dados definitivos sobre a etiologia desta doença ou de um tratamento totalmente eficaz, é possível observar que vários conceitos já foram estabelecidos e, uma relação entre esta patologia e o processo inflamatório crônico do intestino já foi determinada (Gálvez *et al.*, 2000a).

O aparecimento das DII estaria relacionado diretamente à uma resposta anormal e desordenada do sistema imunológico mediante um estímulo inócuo, envolvendo diversos mediadores da inflamação (Nassif *et al.*, 1996). Um intenso desequilíbrio bioquímico relacionado à tentativa de regulação do sistema imunológico também contribuiria para a instalação da DII (Gálvez, 2000a). Por outro lado, radicais livres derivados do oxigênio e também do nitrogênio tem sido

propostos como agentes envolvidos no aparecimento e desenvolvimento da DII, os quais seriam indicativos de estresse oxidativo no tecido intestinal (Harris *et al.*, 1992).

Drogas sintéticas ou de origem natural, que apresentam atividade antiinflamatória e antioxidante, tem sido extensamente testadas experimentalmente para esta patologia; amostras vegetais contendo flavonóides em sua composição ou flavonóides isolados tem se mostrado promissores (Gálvez, *et al* 1994; Gálvez, *et al* 2000a; Gálvez, *et al* 2000b).

A terapia atual das DII consiste de drogas com atividade antiinflamatória e/ou antioxidante como superóxido desmutase, sulfasalazina e o ácido 5-aminosalicílico; porém, até o momento, nenhuma droga foi totalmente eficaz em promover a cura destas lesões ou então capaz de impedir seu aparecimento (Egan e Sandborn, 1998). Amostras vegetais com propriedades antioxidantes, principalmente flavonóides, tem sido também avaliadas em modelos experimentais relacionados a esta patologia e os bons resultados obtidos indicam que esta classe de compostos químicos como futura classe terapêutica para o tratamento das DII (Gálvez, *et al* 1994; Gálvez, *et al* 2000a; Gálvez, *et al* 2000b).

A administração intracolônica de TNBA dissolvido em etanol a 50 %, promove, em animais, uma resposta inflamatória local caracterizada como colite aguda, a qual é semelhante àquela desenvolvida em humanos, inclusive

desencadeando sintomas clássicos como inibição do apetite, perda de peso do animal, diarreia, hiperemia intensa na mucosa intestinal, ulceração na região do cólon e, em muitos casos, rompimento do segmento colônico (Morris *et al.*, 1989).

A administração oral do infuso de *T. ulmifolia*, em doses de 250 e 500 mg/kg durante 6 dias, foi eficiente em reduzir significativamente o desenvolvimento da colite aguda nos animais (20 e 19,5 %, respectivamente). A administração oral do infuso de *T. diffusa*, em dose 500 mg/kg, também reduziu o desenvolvimento da lesão aguda do cólon em 19.5 %. Assim, os resultados obtidos indicam que as substâncias presentes nos componentes dos infusos de *T. ulmifolia* e de *T. diffusa* podem inibir o desenvolvimento da colite aguda induzida pelo TNBA, em ratas. Os compostos encontrados nos infusos poderiam possivelmente estar atuando na redução da inflamação induzida no local pela administração do TNBA; ou então, poderiam estar inibindo a formação de radicais livres que contribuem para o aumento do estresse oxidativo no tecido lesado.

Para confirmar o efeito benéfico dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* em reduzir o desenvolvimento da colite aguda em ratas, foram realizados ensaios específicos para a determinação da atividade da MPO e dos níveis de glutathione total nas amostras de cólon obtidas dos mesmos animais lesados com TNBA, previamente tratados com as amostras vegetais.

A MPO é uma enzima predominantemente encontrada em grânulos de neutrófilos de humanos e também de ratos. A presença desta enzima em tecidos lesados geralmente é relatada como marcador bioquímico para indicar a migração de neutrófilos para este tecido, caracterizando o início de um processo inflamatório. No intestino, a inibição da atividade da MPO indica um possível efeito antiinflamatório local das drogas testadas e, geralmente, a diminuição da atividade da MPO esta diretamente relacionada à redução do aparecimento ou desenvolvimento da lesão colônica (Gálvez, *et al* 1994; Gálvez, *et al* 2000a; Gálvez, *et al* 2000b).

Os resultados obtidos demonstram que o pré-tratamento dos animais com o infuso de *Turnera diffusa*, na dose de 500 mg/kg, foi eficaz em reduzir a atividade da MPO nas amostras de cólon; este resultado indica que os compostos presentes no infuso poderiam inibir a infiltração de neutrófilos para a lesão reduzindo, em parte, o início do processo inflamatório local. A comprovação da inibição da atividade da MPO reflete-se em diminuição do índice de lesão colônica determinada nestes mesmos animais, quando esta dose de infuso foi empregadas. Nenhum dos tratamentos realizados com o infuso de *Turnera ulmifolia* foi eficaz em reduzir a atividade da MPO.

O processo de estresse oxidativo desencadeado pelo TNBA pode ser caracterizado, entre outros fatores, pela peroxidação lipídica da membrana das

células do tecido atingido. O estresse oxidativo pode ser descrito como resultado de um desequilíbrio dos mecanismos de defesa do organismo (moléculas antioxidantes naturais como a glutathione), em relação ao número de substâncias oxidantes produzidas pelo agente indutor da lesão ou ainda por alterações bioquímicas do próprio organismo (Lih-Brody *et al.*, 1996).

A glutathione é considerada um importante mecanismo de defesa encontrado naturalmente em nosso organismo contra moléculas oxidativas; ela atua de maneira direta desempenhando atividade antioxidante diminuindo a formação de radicais livres produzidos durante o processo oxidativo desencadeado pelo TNBA no tecido colônico, onde também pode ser encontrada (Beutler, 1989). A diminuição dos níveis de glutathione no cólon indica a presença de estresse oxidativo neste tecido e este processo tem sido detectado em amostras de tecido ou sangue de humanos com DII e também, em animais de experimentação após a administração do TNBA (Beutler, 1989; Lauterburg *et al.*, 1998). Por outro lado, o aumento da atividade da glutathione representa um aumento da atividade antioxidante do organismo e amostras de origem natural, contendo flavonóides em sua composição ou flavonóides isolados, tem se mostrado úteis em aumentar os níveis de glutathione em animais lesados com o TNBA ou em inibir sua depleção por este agente, promovendo a inibição do surgimento ou desenvolvimento da lesão colônica (Lauterburg *et al.*, 1998).

O pré-tratamento dos animais com o infuso de *Turnera ulmifolia*, nas doses de 250 e 500 mg/kg, foi significativamente eficaz em aumentar a atividade da glutatona no tecido colônico. Este resultado está diretamente relacionado à inibição do índice de lesão colônica determinada nestes mesmos animais.

Finalmente, ambos os infusos foram eficazes em reduzir o processo de peroxidação lipídica de membranas isoladas de fígado de ratas em experimentos *in vitro*. O produto de peroxidação destas membranas pode ser determinado através da quantificação dos níveis de MDA produzido, após encerrado o processo de peroxidação da membrana, na presença ou não de um agente antioxidante. Os resultados obtidos após a quantificação da MDA são expressos como a capacidade das amostras teste em inibir sua formação (De La Cruz *et al.*, 1992). Os resultados obtidos nestes ensaios permitem então sugerir que as amostras que inibiram a produção de MDA possuem atividade antioxidante e, portanto, são capazes de exercer atividade protetora sobre a membrana lipídica das células teciduais (Gálvez *et al.*, 1994).

O infuso de *T. ulmifolia* inibiu significativamente a peroxidação lipídica das membranas nos ensaios realizados reduzindo os níveis de MDA nas diferentes concentrações utilizadas. A IC₅₀ % para o infuso de *T. ulmifolia* foi de 7.12 ug/ml. O efeito inibitório demonstrado pelo infuso de *T. diffusa* foi também significativo. A IC₅₀ % para este efeito do infuso foi de 16.8 ug/ml.

Provavelmente, os flavonóides que compõem os infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* exercem atividade antioxidante inibindo o processo de peroxidação da membrana. É possível supor que em experimentação *in vivo* estes infusos apresentem o mesmo perfil de atividade antioxidante apresentado como já foi relatado por alguns grupos de pesquisadores (Gálvez, *et al* 1994; Gálvez, *et al* 2000a; Gálvez, *et al* 2000b); novos experimentos, porém, precisam ser realizados para comprovar esta hipótese em relação às amostras obtidas de Turneras. Vale lembrar que o infuso de *T. ulmifolia* apresentou importante atividade antioxidante ao produzir aumento nos níveis de glutathiona total no tecido colônico lesado.

Assim, a análise do conjunto de resultados obtidos relacionados à inibição da colite aguda, permite concluir que os infusos apresentam atividade farmacológica relacionada ao desenvolvimento da colite aguda induzida pelo TNBA em ratas. O possível mecanismo de ação dos compostos presentes no infuso de *T. diffusa* poderia estar relacionado à inibição do processo inflamatório local, como demonstrado pela inibição da atividade da MPO. Já, o aumento ou a manutenção da integridade dos mecanismos antioxidantes do tecido (glutathiona total) frente às moléculas oxidantes (radicais livres) produzidas pela lesão com o TNBA, poderia ser sugerido como um dos mecanismos relacionados à inibição do desenvolvimento da lesão colônica obtido com a administração do infuso de *T. ulmifolia*.

No entanto, a inibição da peroxidação lipídica demonstrada *in vitro* por ambos infusos, nas diferentes concentrações, permite concluir adicionalmente, que os compostos que compõem estas amostras apresentam efeito antioxidante. Certamente, os resultados significativos obtidos no modelo de indução de colite aguda em ratas podem estar relacionados, em grande parte, à esta atividade antioxidante demonstrada provavelmente pelos flavonóides que compõem os infusos testados.

Os resultados obtidos durante a realização dos experimentos relacionados à colite aguda, além de comprovar a eficácia dos infusos em relação a prevenção desta patologia, permitem também concluir que o potencial antioxidante apresentado pelos infusos será de grande valia para a elucidação do possível mecanismo de ação antiulcerogênico destas amostras. Atividade antioxidante tem sido recentemente proposta como sendo um dos principais mecanismos de ação antiulcerogênico relacionado a presença de flavonóides em amostras vegetais, com este perfil farmacológico (Di Carlo *et al.*, 1999).

A partir dos resultados obtidos com a utilização dos infusos durante 6 dias consecutivos para a prevenção do desenvolvimento de colite aguda foi levantada uma hipótese de que os compostos presentes em cada infuso poderiam apresentar atividade curativa também na úlcera crônica estabelecida, após tratamento contínuo. Desta forma, foi realizado um experimento específico para avaliar esta

possível atividade curativa dos infusos mediante uma ulceração crônica previamente instalada na mucosa gástrica de ratos.

A grande maioria das drogas disponíveis atualmente no mercado para tratamento de úlceras, em geral, visa, aumentar os fatores de proteção da mucosa ou inibir aqueles agentes lesivos que, por ventura, levem ao desenvolvimento de lesões ulcerativas (Wolfe e Sachs, 2000). Sabe-se que um dos principais problemas das úlceras gástricas e duodenais é seu alto índice de reincidência. Este fato deve-se, principalmente, à uma cicatrização falha e irregular da mucosa durante um tratamento inadequado, deixando-a frágil e susceptível à uma futura exposição aos agentes lesivos (Szabo e Vincze, 2000).

Pouca ou quase que nenhuma atenção vinha sendo dada a processos que pudessem estar relacionados à cura destas lesões ou que, pelo menos em parte, auxiliassem sua cicatrização. A pesquisa com fármacos sintéticos e aquela que utiliza substâncias de origem vegetal que possam apresentar atividade curativa ou cicatrizante nestas mucosas dificilmente se estende até esta etapa final de avaliação. No entanto, a comprovação deste tipo de atividade farmacológica é de fundamental importância em etnofarmacologia, já que na maioria das vezes, as plantas testadas são utilizadas de forma continuada pela população para tratar lesões já estabelecidas e não somente para sua prevenção agudamente, como geralmente é reproduzido em laboratório.

Durante a realização do experimento de indução de úlcera crônica em estômagos de ratos, o qual permite avaliar uma possível atividade curativa sobre uma lesão já estabelecida (Takagi *et al.*, 1969) foi possível observar que os Infusos administrados durante 14 dias, por via oral, em doses de 500 e 1000 mg/kg, reduziram a lesão na mucosa destes animais. As amostras vegetais foram eficazes em reduzir, praticamente à metade, a área de lesão nos estômagos dos animais tratados.

Estudos recentes demonstram que determinadas substâncias, com atividade antiulcerogênica comprovada, apresentam também atividade cicatrizante em úlceras crônicas em animais; estas propriedades estariam relacionadas a efeitos citoprotetores destes compostos (Ito *et al.*, 1994; Motilva *et al.*, 1996; Konturek *et al.*, 1997; Slomiany *et al.*, 1997; Souza-Brito *et al.*, 1997; Sulffredine *et al.*, 1999; Hiruma-Lima *et al.*, 1999). Porém, a presença de fatores de crescimento de endotélio na mucosa lesada, os quais são responsáveis em grande parte pelos processos de cicatrização deste tecido, poderia estar diretamente relacionada às propriedades curativas destas substâncias, já que vários compostos com atividade antiulcerogênica tem sido propostos como indutores do aumento da síntese destas proteínas na área de lesão (Szabo e Vincze, 2000).

Assim, os resultados obtidos com os infusos permitem sugerir que, além da possível atividade antissecretora e/ou citoprotetora na mucosa gástrica, as quais já

seriam suficientes para uma redução da área de lesão, uma possível atividade indutora da síntese de fatores de crescimento de endotélio (ainda não estudada) também poderia estar relacionada às propriedades curativas demonstrada para os infusos de ambas as espécies.

A inibição da produção de radicais livres no local lesado tem sido também proposto como auxiliar nos processos de manutenção da integridade da mucosa gástrica e de cicatrização desta mucosa constituindo-se em um dos principais fatores de citoproteção da mucosa gástrica, em caso de lesão (Motilva *et al* 1996; Ito *et al.*, 1998; La Casa *et al.*, 2000).

Conforme descrito anteriormente, é sabido que uma grande variedade de flavonóides vem sendo estudada por diversos grupos, que demonstraram a atividade benéfica destes compostos sobre o trato gastrointestinal, atuando por diferentes mecanismos (Cook, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999; Harbone e Willians, 2000).

Como já vimos, a análise cromatográfica dos infusos confirmou que flavonóides são os principais componentes nos infusos em estudo e os experimentos realizados com cólon demonstraram que os mesmos possuem atividade antioxidante *in vitro*. Flavonóides e citoproteção vem sendo constantemente relacionados no intuito de explicar a atividade antiulcerogênica destes compostos (Di Carlo *et al.*, 1999). Assim, extratos e frações ricas em

flavonóides ou flavonóides isolados com atividade antiulcerogênica confirmada, demonstraram exercer esta atividade aumentando os mecanismos citoprotetores da mucosa gástrica frente aos agentes lesivos (Lewis, 1992; Martin *et al.*, 1998; Di Carlo *et al.*, 1999; Borrelli e Izzo, 2000). Desta forma, a relação dos infusos e os mecanismos citoprotetores da mucosa gástrica foram propostos como sendo os possíveis responsáveis pela atividade antiulcerogênica apresentada até o momento e por isso foram avaliados antes da finalização deste trabalho.

Citoproteção (gástrica e intestinal) é definida como a propriedade que muitas prostaglandinas apresentam em inibir, nas mucosas do estômago e intestino, os processos inflamatórios e necrotizantes, quando estas mucosas são expostas a agentes nocivos. É sugerido que o aumento na síntese de prostaglandinas endógenas seja um fator importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica, devido à manutenção do fluxo sanguíneo na parede gástrica e também à uma atividade anti-secretora, inclusive aquela basal; além disso, é relatado que o aumento de diferentes formas de PG's, principalmente a PGE₂ leva ao aumento na produção de muco e bicarbonato pela mucosa gástrica formando uma barreira 'citoprotetora'. Ao contrário, a redução na quantidade de muco da parede gástrica contribui acentuadamente para o desenvolvimento de lesões relacionadas ao aumento da secreção ácida (estresse) e ao etanol (Robert *et al.*, 1979; Lewis e Hanson, 1991; Tabata *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 1997).

Vários estudos tem demonstrado uma severa diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica além de uma diminuição significativa na quantidade de muco e prostaglandinas citoprotetoras após um tratamento prévio com indometacina (Beck *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2000). Para determinação da hipótese de que as amostras vegetais, especificamente os flavonóides que compõem os infusos, alterariam a fisiologia gástrica na presença de agentes irritantes da mucosa, provavelmente elevando os mecanismos de defesa do estômago, como o aumento da síntese de PG's endógenas e o aumento na produção de muco e bicarbonato pelas células da parede gástrica, realizaram-se experimentos relacionados a estas atividades.

É sabido que o muco encontrado na parede gástrica consiste de glicoproteínas semelhantes às mucinas, as quais podem ser detectadas pela ligação ao corante "alcian blue". Apesar de ter a mesma origem, o muco pode ser encontrado em duas formas distintas; uma aderida à mucosa gástrica e outra desprendida no lúmen gástrico, denominado muco solúvel ou muco livre. O muco livre é mais frequentemente determinado experimentalmente e seu aumento, mesmo sem ter um papel fisiológico importante, indica que o muco da barreira mucosa também está aumentado (Bolton *et al.*, 1978).

Os resultados obtidos no experimento que determina o aumento da produção de muco na mucosa gástrica demonstraram que o tratamento prévio dos animais

com a droga antiinflamatória não esteroideal reduziu o muco livre em relação à quantidade produzida pelos animais que receberam somente salina. Este resultado comprova a atividade lesiva da indometacina, que é um potente inibidor da síntese de prostaglandinas (Bruton, 1996).

Em relação ao infuso de *T. diffusa*, os dados obtidos demonstraram que o tratamento dos animais na dose de 500 mg/kg foi eficaz em aumentar o muco livre na mucosa em 30 % em relação ao grupo controle (salina 0,9%). Neste caso, o pré-tratamento com indometacina foi significativamente eficaz em reverter o aumento de muco produzido pelo tratamento até níveis abaixo daqueles obtidos no grupo controle.

O tratamento dos animais com o infuso de *T. ulmifolia*, em doses de 500 e 1000 mg/kg, foi eficaz em aumentar significativamente o muco livre na mucosa dos animais em 26 e 37 %, respectivamente, em relação ao grupo controle. O pré-tratamento destes grupos com a indometacina fez com que a produção de muco em aumento fosse suprimida, porém, a indometacina não foi efetiva em reduzir a quantidade de muco abaixo daquela quantidade produzida pelo grupo controle nestes mesmos animais.

Estes resultados indicam que os compostos presentes nos infusos de cada espécie podem aumentar o muco protetor na mucosa gástrica. Especificamente para os compostos presentes no infuso de *T. ulmifolia*, pode-se observar, que os mesmos

são eficientes em manter o muco basal da mucosa, mesmo quando um potente agente lesivo é administrado concomitante a este infuso.

De forma geral, os compostos presentes nos infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* poderiam induzir a formação de muco por um mecanismo relacionado ou não, ao aumento da síntese de prostaglandinas. Este mecanismo tem sido relatado, porém não completamente explicado, para amostras vegetais ricas em flavonóides (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999). Por outro lado, os compostos do infuso de *T. ulmifolia* poderiam estar neutralizando o efeito lesivo da indometacina na mucosa gástrica, impedindo que a mesma degrada-se as prostaglandinas responsáveis pela manutenção da integridade desta mucosa (Wallace *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2000). Os efeitos de manutenção da integridade vascular conferido à flavonóides poderia também contribuir para o aumento do muco, já que a vascularização íntegra da mucosa é essencial para a manutenção e produção das glicoproteínas e do bicarbonato que constituem a camada mucosa produtora no estômago (Di Carlo *et al.*, 1999).

Adicionalmente, outros fatores relatados como capazes de contribuir para o efeito protetor de diversas drogas, inclusive aquelas provenientes de plantas medicinais sobre a mucosa gástrica, podendo-se destacar o efeito citoprotetor conferido pelas prostaglandinas, em especial as prostaglandinas E, F e I (Tabata *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 1997), as quais são importantes para a camada

mucoprotetora da mucosa gástrica em relação à ação lesiva do ácido clorídrico e da pepsina (Tabata *et al.*, 1996). Atualmente sabe-se que esta camada protetora também é efetiva em proteger a mucosa contra a ação lesiva de diversos radicais livres, os quais, contribuiriam para a instalação e proliferação de uma lesão ulcerativa previamente instalada (Motilva *et al.*, 1996).

Na busca ainda de mecanismos de ação anti-ulcerogênicos dos compostos presentes nos infusos, foi avaliado a possível atividade destes compostos em aumentar ou manter a síntese de prostaglandina E₂ na mucosa gástrica de ratos, na ausência e na presença de indometacina, como descrito anteriormente, uma potente droga inibidora da síntese das prostaglandinas, responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica destes animais.

Recentemente, algumas amostras vegetais com atividade antiulcerogênica, ricas em flavonóides, tem se mostrado ativas em relação a esta patologia por induzirem o aumento de muco e também pelo o aumento da síntese de prostaglandinas na mucosa gástrica. Porém, outros autores descrevem que amostras vegetais com estas mesmas características, seriam sim capazes de induzir a produção de muco porém, através de um mecanismo não dependente de prostaglandinas, mas sim, através de um mecanismo dependente da atividade antioxidante destas amostras. No entanto, até o momento, este mecanismo não foi totalmente esclarecido (Cook e Samman, 1996; Di Carlo *et al.*, 1999).

Os dados obtidos nos experimentos de imunoenzimáticos demonstraram que o tratamento prévio dos animais com a droga antiinflamatória não esteroideal reduziu a quantidade de prostaglandina sintetizada na mucosa gástrica em aproximadamente 67 %, em relação aos níveis de prostaglandina quantificados na mucosa dos animais tratados com salina. Nenhum dos tratamentos empregados foi eficiente em elevar a quantidade de prostaglandina sintetizada na mucosa dos animais.

Por outro lado, o tratamento com o infuso de *T. diffusa*, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, foi eficaz em impedir que os níveis de prostaglandina fossem reduzidos muito abaixo daqueles quantificados para o grupo controle (121 e 127 - 140 ug/mg), quando foi realizado o tratamento prévio com indometacina. O tratamento com o infuso na dose de 1000 mg/kg também foi eficaz em impedir que os níveis de prostaglandina fossem reduzidos abaixo daqueles quantificados para o grupo controle (127 - 140 ug/mg), quando foi realizado o mesmo tratamento prévio dos animais com indometacina. Tal fato não aconteceu com o tratamento dos animais na dose de 500 mg/kg, quando este infuso foi empregado.

Novamente os compostos presentes nos infusos foram eficazes em proteger a mucosa contra a ação lesiva da indometacina. Provavelmente, estes compostos poderiam estar interferindo com as vias metabólicas da ciclooxigenase, as quais seriam degradadas por ação da indometacina.

Recentemente, drogas antiinflamatórias não esteroidais tem sido desenvolvidas para manter sua atividade antiinflamatória porém, sem os efeitos colaterais sobre a mucosa gástrica (Brunton, 1996). Estes efeitos estariam relacionados à capacidade destas drogas em inibir somente a enzima ciclooxigenase induzida (COX-2) durante um processo inflamatório, preservando a integridade daquela ciclooxigenase constitutiva (COX-1), responsável pela produção do muco e das prostaglandinas citoprotetoras na mucosa gástrica (Brunton, 1996; Wallace *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2000).

É possível sugerir que os compostos presentes nos infusos poderiam auxiliar na manutenção da integridade da COX-1, impedindo que a indometacina reverta por completo a produção de muco e prostaglandina E₂ na mucosa dos animais. A atividade antioxidante dos compostos presentes nos infusos poderia também auxiliar na manutenção da integridade das prostaglandinas e garantindo a produção de muco e impedindo a formação de radicais livres (Motilva, 1996).

Nos últimos anos, tem sido relatado, que vários flavonóides apresentam ótima atividade antiinflamatória mas ao contrário dos antiinflamatórios tradicionais, tem também sido capazes de auxiliar na manutenção da integridade da mucosa gástrica (Di Carlo *et al.*, 1999). Os dados até aqui obtidos corroboram com os da literatura que descrevem atividade citoprotetora e antiinflamatória para uma mesma classe de composto químico, em particular os flavonóides. Estes resultados

poderiam ser de grande importância na terapêutica já que a utilização de uma droga inibidora da secreção do ácido gástrico geralmente é prescrita quando um paciente utiliza drogas antiinflamatórias não esteroideal por tempo prolongado, no intuito de prevenir o aparecimento de lesões gástricas (Brunton, 1996, Kataoka *et al.*, 2000). Neste caso, a associação dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* seria uma alternativa eficaz tanto para a remissão do processo ulcerativo, como para a manutenção da integridade da mucosa na utilização associada com DAINES.

Finalmente, ensaios fitoquímicos específicos identificaram uma série de flavonóides previamente encontrados nos ensaios cromatográficos realizados com os infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*: luteolina-8-C- α -L-rhamnopyranosídeo (1 \rightarrow 2) quinovopyranosídeo, apigenina-7- β -D-glucopyranosídeo, apigenina-7-O- β -D(6''-p-cumaroil) glucopyranosídeo, vitexina-2''-)- α -L-rhamnopyranosídeo, orientina-2''-O- α -L-rhamnopyranosídeo, orientina-3'-metoxi-6''-O- β -D-glucopyranosídeo no infuso de *T. diffusa* e; vitexina-2'''-O- β -D-xilopyranosídeo, orientina-2'''-O- β -D-glucopyranosídeo, vitexina-2'''-O- β -D-glucopyranosídeo, orientina-2'''-O- α -L-rhamnopyranosídeo, vitexina-2'''-O- α -L-rhamnopyranosídeo, vitexina e isoorientina no infuso de *T. ulmifolia*.

Entre os compostos identificados vale chamar a atenção para os compostos vitexina-2'''-O- α -L-rhamnopyranosídeo e orientina-3'-metoxi-6''-O- β -D-glucopyranosídeo, os quais, são inéditos na literatura. Desta forma, é possível

atribuir as atividades farmacológicas obtidas à presença do conjunto destes flavonóides nos infusos de cada espécie, já que são majoritários e, também são relatados por Lewis e Hanson (1991); Lewis (1992) e por Borrelli e Izzo (2000), como classe de compostos com atividade antiinflamatória e antiulcerogênica comprovada. Estudos detalhados em relação à atividade farmacológica, antioxidante e toxicológica de cada um destes compostos, após isolamento dos mesmos em quantidades suficientes, devem ainda ser realizados. No entanto, é sabido que muitas vezes, o processo de separação e/ou fracionamento de extratos ou infusos ricos em uma classe de substância definida leva à perda parcial ou total da atividade farmacológica demonstrada, tornando-se assim, esta hipótese, o princípio para um novo estudo com estas espécies.

VI- CONCLUSÕES

Como última análise, é possível concluir que as espécies *T. diffusa* e *T. ulmifolia* apresentam atividade antiulcerogênica e antiinflamatória intestinal, além de atividade antioxidante, especialmente os infusos a 10 % obtidos das partes aéreas de cada uma delas, nos diferentes modelos biológicos experimentais empregados.

Em conjunto, a análise dos resultados permite sugerir o gênero *Turnera* como uma nova fonte de flavonóides com potencial farmacológico, especialmente para o tratamento e prevenção de colite ulcerativa e úlceras pépticas em geral.

De forma geral, os resultados obtidos validam a utilização popular das espécies *T. diffusa* e *T. ulmifolia* para as patologias aqui estudadas, ficando agora, nas mãos dos laboratórios a opção de transformar estes dados em medicamento fitoterápico eficaz, com menor custo e de fácil acesso à população.

VII- REFERÊNCIAS

- Agrawal, P. K.. Editor. Carbon-13 NMR of flavonoids. New York: Elsevier, 1989: 564 pp.
- Akamatsu, H., Komura, J., Asada, Y., Niwa, Y.. Mechanism of antiinflammatory action of Glycyrrhizin: effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Medica*, 57:119-121, 1991.
- Alper, J.. Ulcers as an infectious disease. *Science*, 260(9):159-160, 1993.
- Andersen, M.E.. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth. Enzymol.* 113, 548-555, 1985.
- Antonio, M. A., Souza Brito A.R. M.. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 61: 215-228, 1998.
- Asprey, G. F.. Thornton, P. Medicinal plants of Jamaica, *West Indian Medicine Journal*, 4: 145-65, 1945.
- Auterhoff, H. and Haeufel, H.P.. Contents of Damiana drugs. *Arch. Pharm.* 301: 537, 1968a.

Auterhoff, H. and Haufel, H.P.. Constituents of the drug Damiana. *Arch. Pharm.* 301: 537, 1968b.

Ayensu, E.S.. Medicinal plants of the west indies. Manuscript. 110p., 1978.

Barrowman, J.A. and Pfeiffer, C.J. Carbenoxolone: A critical analysis of its clinical value in peptic ulcer. In: __ Drugs and Peptic Ulcer, Vol 1. ed. by C.J. Pfeiffer. CRC Press, Boca Raton, Fla., 1982. pp. 123-132.

Beck, P. L., Xavier, R., Lu, N., Nanda, N. N., Dinauer, M., Podolsky, K. D. and Seed, B.. Mechanisms of NSAID-Induced Gastrointestinal Injury defined using mutant mice. *Gastroenterology*, 119:699-705, 2000.

Beutler, E.. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annu Ver. Nutr.* 9:287-302, 1989.

Bianchi Porro, G.; Parente, F.; Lazzaroni, M. and Pace, F.. Colloidal bismuth subcitrate and two different dosages of cimetidine in the treatment of resistant duodenal ulcer. *Scand. J. Gastroenterol.* 21(122):39-41, 1986.

Black, J. W.; Duncan, W.A.M.; Durant, C.J.; Ganellin, C.R.; Parsons, E.M.
Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. *Nature*, 236:385-390,
1972.

Bolton, J.P., Palmer, D. and Cohen, M.. Stimulation of Mucus and Nonparietal Cell
Secretion By the E2 Prostaglandins. *Dig. Dis. Science*, 23:359-364, 1978.

Borrelli, F. and Izzo, A.A.. Review article: The plant Kingdom as a source of anti-
ulcer remedies. *Phytotherapy research*, 14: 581-591, 2000.

Brown, D. J. and Dattner, A. M.. Phytotherapeutic Approaches to common
dermatologic condition. *Archives of Dermatology*, 134:1401-1404, 1998.

Brunton, L.L.. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers.
In __: *Goodman and Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics*.
Ed. by J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon and A. G.
Gilman, 9th edition, Int. Edition, McGraw-Hill, New York, p. 663-691, 1996.

- Caspary, W. F.. Measurement of intragastric potential difference. In__ : Antacids in the eighties. Ed. by F. Halter, Urban and Schwarzenberg, Munich. 1982, p. 64-69.
- Cody, V., Middleton E., Harbone J.B. (eds.), "Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships," Alan Liss, New York, 1986.
- Cook, N. C., Samman, S.. Review article: Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutrition and Biochemistry*,7: 66-76, 1996.
- Cordell, G. A.. Changing Strategies in natural products chemistry, *Phytochemistry*, 40:6, 1585-1612, 1995.
- Cruz, T., Gálvez, J., Ocete, M.E., Crespo, M.E., Sanchez de Medina, L.H. and Zarzuelo, A.Z.. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Science*, 62(7) 687-695, 1998.
- Curtis, G.H.; MacNaughton, W.K.; Gall, D.G. and Wallace, J.L.. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73, 130-134, 1995.

- De La Cruz, J.P., Carrasco, T., Ortega, G., and Sanchez De La Cuesta, F..
Inhibition of ferrous-induced lipid peroxidation by pyrimido-pyrimidine
derivatives in human liver membranes. *Lipids*. 27: 192-194, 1992.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A. and Capasso, F.. Review article: Flavonoids
– Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*,
65:4, 337-353, 1999.
- Ding M., Kinoshita Y., Kishi K., Nakata H., Hassan S., Kawanami C., Sugimoto
Y., Katsuyama M., Negishi M., Narumiya S., Ichikawa A., Chiba T.,
Prostaglandins., 53: 199-216 (1997).
- Dominguez, X. A., Hinojosa, M.. Mexican medicinal plants XXVIII. Isolation of 5-
hydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavone from *Turnera diffusa*. *Planta Medica* 30:
68-70, 1976.
- Dweck, A. C.. Botanicals – research of activities. *Cosmetics & Toiletries*, v. 111, p.
45-57, 1996.
- Egan, L.J. and Sandborn, W.J.. Drug therapy of inflammatory bowell disease.
Drugs of Today, 34: 431-446, 1998.
- Evans, F.. The Gastro-intestinal Tract. In: Selection, Preparation and
Pharmacological Evaluation of Plant Material. Ed. E. M. Williamson, D. T.

Okpako and F. J. Evans. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, p. 25-45.
1996.

Freise, F. W.. The occurrence of caffeine in Brazil medicinal plants. *Pharm. Zentralhalle Deutschl.* 76: 704-706, 1935.

Fryer, F.A.. A chemical investigation of Damiana (*Turnera diffusa*). *Specialites*, 112: 21-30, 1965.

Gálvez, J., De La Cruz, J.P., Zarzuelo, A.Z., Sanchez de Medina, F. and De La Cuesta, F. S.. Oral administration of Quercitrin Modifies Intestinal Oxidative Status in Rats. *Gen. Pharm.* 25(6), 1237-1243, 1994.

Gálvez, J., Garrido, M., Merlos, M., Torres, M.I. and Zarzuelo, A.Z.. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-1246, a novel %-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 130:1949-1959, 2000(a).

Gálvez, J., Sánchez de Medina, F., Romero, J.A., and Zarzuelo, A.Z.. Effect of *Polypodium leucotomos* on acute, chronic and reactivated trinitrobenzene sulphonic acid colitis rats. *Inflammatory*, 8(1), 89-101, 2000(b).

Garcia-Barriga, H.. Flora medicinal de Colombia. Vol. 2/3. Universidad Nacional. Bogota, 1975.

- Harbone, J. F. and Williams, C. A.. Review - Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55:481-504, 2000.
- Harris, M.L., Schiller, H.J., Reilly, P.M., Donowitz, M., Grisham, M.B. and Buckley, G.B.. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: Cause, consequence or epiphenomenon? *Pharm. Ther.*, 53, 375-408, 1992.
- Hirschowitz, B. I., Keeling, D., Lewin, M., Okabe, S., Parsons, M., Sewing, K., Wallmark, B. and Sachs, G.. Pharmacological aspects of acid secretion. *Digestive and Sciences*, 40:2-3s-23s, 1995.
- Hiruma-Lima, C. A., Spadari-Bratfisch, R. C., Grassi-Kassisse, D. M. and Souza-Brito, A. R. M.. Antiulcerogenic mechanism of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 65:325-330, 1999.
- Ishikura, N.. Flavonol glycosides in the flowers of *Hibiscus mutabilis* v. *versicolor*. *Agr. Biol. Chem.* 46: 1705-1706, 1982.
- Ito, M., Segami, T., Inaguma, K. and Suzuki, Y.. Cimetidine and Omeprazole accelerate gastric ulcer healing by an increase in gastrin secretion. *European Journal of Pharmacology*. (263):253-259, 1994.

Jensen, D. M.. Health and aspects of peptic ulcer disease. *Am. J. of Med.* 77(Suppl 5B): 8-14, 1984.

Kataoka, H., Horie, Y., Koyama, R., Seiichi, N. and Furukawa, M.. Interaction between NSAIDs and steroid in rat stomach: Safety of nimesulide as a preferential COX 2 inhibitor in the stomach. *Digestive Disease and Science.* 45(7), 1366-1375, 2000.

Konturek, S. J., Radecki, T., Brzozowsky, T., Drozdowicz, D., Piastuchi, I., Muramatsu, M., Tanaka, M., Aihara, H.. Antiulcer and gastroprotective effects of solon, a synthetic flavonoid derivative of sophoradin - Role of endogenous prostaglandins. *European Journal of Pharmacology*, 125: 185-192, 1986.

Krag, K.J.. Plants used as contraceptives by the North American Indians. An ethnobotanical study. Thesis-BS-Harvard University. 117p., 1976.

Krawisz, J.E., Sharon, P. and Stenson, W.F.. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, 87: 1344-1350, 1984.

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. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 45-53, 2000.

Lauterburg, B. H., Bilzer, M., Rowedder, E., Inauen, W.. Decreased glutathione in inflamed colonic mucosa in man. A possible role of hypochlorous acid and prevention by 5-aminosalicylic acid; in MacDermott (ed): *Inflammatory Bowel Disease: Status and Future approach*. Amsterdam, *Elsevier Science*, 1998, pp 273-277.

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

Lewis, D. A.. Antiulcer drugs from plants. *Chemistry in Britain*, 28:(2), 141-144, 1992.

Lewis, D.A. and Hanson, P. J.. Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin In___: *Progress in Medicinal Chemistry*. Vol 28. Ed. G.P. Ellis and G.B. West. *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, p.201-231, 1991.

Lih-Brody, L., Powell, S.R., Collier, K.P., Reddy, G.M., Cerchia, R., Kahn, E. and Mullin, G.E.. Increase of oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowell disease. *Dig. Dis. Sci.* 41:2078-2086, 1996.

- Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F.. A simple method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exper. Therap.*, 95:99-113, 1949.
- Makino, M.; Koga, T.; Ito, K.; Kawada, H.; Tabata, K. Delayed healing of chronic gastric ulcer after *Helicobacter pylori* infection in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 50:943-948, 1998.
- Martin, M.J., La-Casa, C., Alarcon-de-La-Lastra, C., Cabeza, J., Villegas, I. and Motilva, V. *Z. Naturforsch. C.*, 53(1-2), 82-88, 1998.
- Mcchesney, J.D.. Biological diversity, chemical diversity, and the search for new pharmaceuticals. In__ : *Medicinal Resources of the Tropical Forest - Biodiversity and its importance to human health*. Ed. by M.J. Balick, E. Elisabetsky and S.A. Laird. Columbia University Press, New York, 1996, 11-17.
- Mizui, T. and Doteuchi, M.. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Jap. J. Pharmacol.* 33: 939-945, 1993.

- Monk, J.P. and Clissold, S.P. Misoprostol: A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. *Drugs*. 33:1-30, 1987.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, W., Depew, W., Ssewczuk, M.R. and Wallace, J.L.. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96: 795-803, 1989.
- Motilva, V., Martín, M. J. L. and De La Lastra, A. C.. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in chronic gastric lesion induced by acetic acid in rat. *Gen. Pharm.* 27(3), 545-550, 1996.
- Nakanishi, K., Sasaki, S.I., Kiang, G.O.H., Kakisawa, H., Ohashi, M., Goto, M., Watanabe, J.M., Yokotani, H., Matsumura, C. and Togashi, M.. Phytochemical survey of Malaysian plants. Preliminary chemical and pharmacological screening. *Chem. Pharm. Bull.* 13: 882-890, 1965.
- Nassif, A., Longo, W.E., Mazushi, J.E., Vernava, A.M., and Kaminski, D.L.. Role of cytokines and platelet-activating factor in inflammatory bowel disease. *Dis. Colon. Rectum*. 39: 217-223, 1996.
- Oates, P. J. and Hakkinen, J. P.. Studies on the mechanism of Ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology*, 94:10-21, 1988.

- Pandolfino, J. E., Howden, C. W. and Kahrilas, J. P.. Motility-modifying agents and management of disorders of gastrointestinal motility, *Gastroenterology*, 118:s32-s47, 2000.
- Perez, R.M., Ocegueda, G.A., Munoz, J.L., Avila, J.G. and Morrow, W.W.. A study of the hypoglucemic effect of some Mexican plants. *J. Ethnopharmacol.* 123: 253-262, 1984.
- Pio Correa M., "Dicionário da Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas," Vol. IV, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984.
- Powell, J. R. and Donn, K. H.. Histamine H₂-antagonist drug interactions in perspective: mechanistic concepts and clinical implications. *Am. J. Med.* 7(5B):57-84, 1984.
- 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*, 29:25-34, 1990.
- Raffatullah, S., Tariq, M., Mossa, J. S., Al-Yahya, M. A., Al-Said, M. S., Ageel, A. M.. Anti-secretagogue, anti-ulcer and cytoprotective properties of *Acorus calamus* in rats. *Fitoterapia*, 65:19-23, 1994.

- Rainsford, K. D.. Gastric ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 669-672, 1978.
- Robert, A., Nezamis, J. E., Lancaster, C., Hanchar, A. J. - Cytoprotection by Prostaglandins in Rats. *Gastroenterology*, 77: 433-443, 1979.
- Roig, J.T. In: *Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba*. Ministerio de Cultura Editorial Científico-Técnica. El Vedado. Havana. Volume 2, 633-635, 1988.
- Roig, Y. and Mesa, J.T. In: *Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba*. Ministerio de Agricultura. Republica de Cuba. Havana. 872p., 1945.
- Schultz, A.R. In: *Botânica sistemática*. Ed. 3ª, Editora Globo, pag. 212, 1973.
- Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M., Siplet, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5:43-61, 1945.
- Sheldon, J.W., Balick, M.J., Laird, S.A ed., New York Botanical Garden, New York pp. 87-92, 1997.
- Shibata, S., Inoue, H., Iwata, S., Ma, R., Yu, L., Ueyama, H., Takayasu, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Nishino, A., Nishino, H., Iwashima, A.. Inhibitory

effects of licochalcone. A flavon isolated from *Glycyrrhiza inflata* Root on inflammatory ear edema and tumor promotion in mice. *Planta Medica*, 57:221-224, 1991.

Slomiany, B. L., Piotrowski, J. and Slomiany, A.. Cell cycle progression during gastric ulcer healing by ebrotidine and sulcralfate. *Gen. Pharm.* 29(3), 367-370, 1997.

Souza Brito A. R. M., "Manual de Ensaio Toxicológicos in Vivo," Campinas, Editora UNICAMP, 1994, p122..

Souza Brito, A.R.M. and Nunes, D.S.. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. *Ciência e Cultura*. 49(5-6), 402-408, 1997.

Souza Brito, A.R.M.. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. *J. Ethnopharmacol.* 54, 131-138, 1996.

Souza-Brito, A. R. M., Rodriguez J. A., Hiruma-Lima, C. A., Nunes, D. S.. Antiulcerogenic Activity of trans-Dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 64: 126-129, 1997.

Spencer, K.C. and Seigler, D.S.. Deidaclin from *Turnera ulmifolia*. *Phytochem.* 19: 1863-1864, 1980.

- Sulffredine, I. B., Bacchi, E. M., Sertié, J. A. A. A.. Antiulcer action of *Microgramma squamulosa* (Kaulf) Sota. *Journal of Ethnopharm.* 65:217-223, 1999.
- Szabo S.. Animal models of human disease: Cysteamine induced acute and chronic duodenal ulcers in the rat. *Am. J. Pathol.*, 93:273-276, 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.*, 22 (Supp. 127): 21-28, 1987.
- Szabo, S and Vincze, A.. Growth factors in ulcer healing: Lessons from recent studies. *J. Physiol Paris*, 94:77-81, 2000.
- Szabo, S. and Kusstatscher, S.; Sakoulas, G.; Sandor, Z.; Vincze, A.; Jadus, M. Growth Factors: new endogenous drugs for ulcer healing. *Scand. J. Gastroenterol.* 30 (Suppl. 210):15-18, 1995.
- Szelenyi, I. and Thiemer, K.. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Arch. Toxicol.* 41: 99-105, 1978.
- Tabata, M., Tomomasa, T., Itoh, K., Morikawa, A.. Effect of 10 % ethanol and sofalcone on prostaglandin E₂ content, mucus gel thickness, and experimental ulcers in the stomach of developing rats. *Digestion*, 57:47-53, 1996.

- Takagi, K.; Okabe, S. and Saziki, R.. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *J. Pharmac.* 19: 418-426, 1969.
- Tantisewie, B., Ruijgrok, H.W.L. and Hegnauer, R.. The distribution of hydrocyanic acid in the cormophytes v. on cyanogenic compounds in the some others families. *Pharm. Weekbl.* 104: 1341, 1969.
- Tarab, J. L., Patil, K. J.. Qualitative and quantitative estimation of caffeine in *Turnera ulmifolia*. *Indian Journal of Botany*, 21: 118-9, 1979.
- Texter, E.C; and Reylly, P.A.. The efficacy and selectivity of pirenzepine: review and commentary. *Scand. J. Gastroenterol.* 17(72):237-246, 1982.
- Tober, I. and Conn, E.E.. Cyclopentenylglycine. A precursor of deidaclin in *Turnera ulmifolia*. *Phytochem.* 246: 1215-1218, 1985. Hosamani KM. Fatty acids in seed oil from *Turnera ulmifolia*. *Phytochemistry*, 345:1363-5, 1993.
- Vieira, J.E.V.; Barros, G.S.G., Medeiros, M.C., Matos, F.J.A., Souza, M.P. and Medeiros, M.J.. Pharmacologic screening of plant from northeast Brazil. *Rev. Brasil. Farm.* 49: 67-75, 1968.

- Villar, A., Gasco, M. A., Alcaraz, M. J.. Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36: 820-823, 1984.
- Volhardt, J.. Natural extracts for baby care. *Cosmetics & Toiletries*, 115: 63-73, 2000.
- Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainsky, E. M. *Plant Drug Analysis*; Springer: Berlin, 1984, pp 163-193.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Hughes, T.J. and Taylor, H. Plant antimutagenic agents. 1. General bioassay and isolation procedures. *J. Nat. Prod.* 515: 866-873, 1988.
- Wallace, J. L., Mcknight, W., Reuter, B. K. and Vergnole, N.. NSAID-induced gastric damage in rats: Requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, 119:706-714, 2000.
- Weniger, B., Rouzier, M., Daguilh, R., Henrys, D., Henrys, J.H. and Anton, T. Popular medicine of the Central Plateau of Haiti. 2. Ethnopharmacological inventory. *J. Ethnopharm.* 171: 13-30, 1986.
- Wolfe, M. M. and Sachs, G.. Acid suppression: Optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. *Gastroenterology*, 118:s9-s31, 2000.

Wolfe, M.M. And Soll, A.H.. The physiology of gastric acid secretion. *N. Engl. J. of Med.* 319 (26): 1707-15, 1988.

Yano, S., Akahane, M., Harada M.. Role of gastric motility in development of stress-induced gastric lesions of rats. *Japan. J. Pharmacol.* 28:607-615, 1978.

Zuanazzi, J. A. S.. Flavonóides. In__ : Farmacognosia. Da planta ao medicamento. Editora da Universidade do Rio Grande do Sul, 1ª edição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 1999, p. 489-516.