

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

PATRÍCIA DE ARAÚJO RODRIGUES

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS E CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *BYRSONIMA SERICEA*
DC. E *PLECTRANTHUS GRANDIS* CRAMER (WILLENSEM)**

**FORTALEZA-CE
2008**

PATRÍCIA DE ARAÚJO RODRIGUES

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS E CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *BYRSONIMA SERICEA*
DC. E *PLECTRANTHUS GRANDIS* CRAMER (WILLENSEM)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra. Selene Maia de Moraes

Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos

FORTALEZA-CE

2008

PATRÍCIA DE ARAÚJO RODRIGUES

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS E CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *BYRSONIMA SERICEA*
DC. E *PLECTRANTHUS GRANDIS* CRAMER (WILLENSEM)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Selene Maia de Moraes, Profa. Dra.

Orientadora (UECE)

Flávia Almeida Santos, Profa. Dra.

Examinadora (UFC)

Sônia M^a Oliveira da Costa, Profa. Dra.

Examinadora (UECE)

Cláudio Cabral Campello, Prof. Dr.

Examinador (UECE)

Ednardo Rodrigues Freitas, Prof. Dr.

Examinador (UFC)

Ao Criador, pela força dada nas horas mais difíceis da minha da vida.

À minha filha Carolina, razão maior dos meus esforços e da minha vontade de vencer, minha melhor inspiração.

Aos meus pais, Luiz Rodrigues Feijão e Ledir de Araújo Rodrigues pela ajuda e incentivo constantes aos meus estudos.

Dedico.

“O grande obstáculo ao conhecimento não é a ignorância, mas a ilusão do conhecimento”.

(Daniel Boorstein).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, força e coragem a mim concedida durante toda esta caminhada árdua.

À Profa. Dra. Selene Maia de Moraes, pela orientação, apoio e sensibilidade de compreender minhas dificuldades, e também como exemplo de sabedoria e competência que me incentivou e estimulou ao longo desta difícil jornada. Meu carinho e reconhecimento.

À Maria José Siqueira Prado, minha querida amiga (quase mãe) dos momentos bons e ruins, nos quais nesses agradecimentos eu não teria como expressar minha gratidão e amor que sinto por ela.

À Maria Tereza Batista de Araújo Feijão, pelo imenso carinho dispensado a minha filha, e pelo espírito de solidariedade que teve comigo nessa longa e dura jornada.

À Profa. Dra. Flávia Almeida Santos, pela co-orientação valiosa, disponibilidade e acolhimento no Laboratório de Produtos naturais (LPN) que foram essenciais para finalização deste trabalho. Minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao, pelo apoio e valiosas sugestões. Meu muito obrigado.

À Profa. Dra. Geanne Matos Andrade, que gentilmente cedeu seu laboratório para realização dos experimentos.

À Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Quedes do Lab. de Bioquímica Humana da UECE, que sempre muito gentil, me disponibilizou seu laboratório para que pudesse dar continuidade aos experimentos.

Aos amigos que fiz durante o curso, Cícero Temístocles, Michelline Maciel, Suzana, Nadja e Davi. Especialmente, as minhas grandes amigas, Márcia Maria Mendes Marques (Márcinha) e Ana Raquel de Araújo Silva (Aninha) companheiras nos momentos de alegria e

descontração, bem como na parceria durante os experimentos e por terem sido pessoas companheiras fiéis, me apoiando e dando força para seguir em frente.

Em especial à Carolina Sousa Melo, do Dep. de farmacologia da UFC pela sua valiosa ajuda e dedicação aos meus experimentos, parceira fundamental para execução e finalização desse trabalho.

A Liza de Araújo Aguiar pela inestimável ajuda no início do curso e nos muitos experimentos que fizemos juntas. Meu carinho.

Ao Dr. Roberto Lima de Albuquerque e Maria Gorette Vasconcelos Silva da UFC, pelo fornecimento dos dois compostos isolados, uma das bases para realização deste trabalho.

A todas as professoras e aos bolsistas Lyeghyna, Vanessa, Karine, Denis, Edson, Harleys e Leonardo do Laboratório de Química de Produtos Naturais pela ajuda e amizade demonstrados nestes anos de convívio saudáveis e proveitosos.

A coordenação do PPGCV, e Adriana, secretária, sempre muito paciente comigo bem como aos professores do curso.

À Universidade Estadual do Ceará, através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para que a realização desse estudo saísse de maneira ordeira e com êxito.

RESUMO

Neste estudo o extrato etanólico das folhas de *Byrsonima sericea* DC. (BSLE), conhecida como murici da praia, e dois diterpenos, barbatusina (BB) e 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina (OHBB), isolados de *Plectranthus grandis*, popularmente chamado de boldo grande, foram avaliados em modelos experimentais de lesão gástrica induzida por etanol. Doses de 500 e 1000 mg/kg, v.o. não foram tóxicas para BSLE. A dose de 1000 mg/kg de BSLE reduziu o trânsito intestinal quando comparado com o controle (atropina 1 mg/kg). BSLE nas doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/kg, v.o. atenuou significativamente as lesões gástricas induzidas por etanol em 58, 86, 80 e 90% respectivamente. No modelo de indometacina, as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, v.o. atenuaram as lesões, inibindo em 53, 51 e 53 % respectivamente. BSLE (250 mg/kg) teve efeito significativo sobre fatores protetores da mucosa gástrica aumentando as concentrações de muco gástrico, de grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) e da enzima superóxido desmutase (SOD), diminuiu os níveis de malonaldeído não alterando os níveis de catalase. O pré-tratamento com o antagonista dos receptores TRPV1 capsazepina, L-NAME e glibenclamida foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor de BSLE. Os resultados do presente estudo indicam uma ação citoprotetora conferindo efeito gastroprotetor contra injúria gástrica induzida por etanol e indometacina, demonstrando uma possível participação desse extrato, na ativação dos receptores vanilóides TRPV1, liberação de óxido nítrico, abertura de canais de potássio sensíveis a ATP e ação antioxidante. A análise do BSLE por cromatografia líquida de alta eficiência revelou a presença dos flavonóides rutina, isoquercitrina, camferol-3-*O*-rutinosideo e quercetina. Estes compostos apresentam atividade antioxidante relatada na literatura. A ação gastroprotetora dos diterpenos de *P. grandis* OHBB e BB foi avaliada nas doses de 2,5; 5,0 e 10 mg/kg, v.o., OHBB em todas as doses reduziu significativamente as lesões gástricas (53, 55, e 96% respectivamente) e a BB apenas nas doses de 5,0 e 10 mg/kg (31 e 76 % respectivamente). OHBB (5mg/kg) e BB (10 mg/kg) causaram aumento de forma significativa os níveis de GSH e diminuíram os níveis de malonaldeído. O pré-tratamento com capsazepina e L-NAME não foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor da OHBB enquanto que o pré-tratamento com glibenclamida reverteu o efeito gastroprotetor da OHBB. Adicionalmente, o efeito da BB foi significativamente reduzido em camundongos pré-tratados com capsazepina e L-NAME. OHBB foi capaz de causar depleção da catalase, enquanto que a administração de BB não alterou a quantidade desta enzima no tecido gástrico. OHBB

preservou a quantidade da enzima superóxido desmutase e a BB foi capaz de aumentar a quantidade da mesma no tecido. Os resultados do presente estudo indicam uma ação citoprotetora e antioxidante da OHBB e BB que devem contribuir para o efeito gastroprotetor contra injúria gástrica induzida por etanol. Os diterpenos agem por mecanismos distintos, conforme foi demonstrado nos resultados.

Palavras chaves: *Byrsonima sericea*. *Plectranthus grandis*. Barbatusina. 3- β hidroxí-3-deoxibarbatusina. Gastroproteção. Flavonóides.

ABSTRACT

In this study the leaf ethanol extract of *Byrsonima sericea* DC. (BSLE), known as murici of the beach, and two diterpenes, barbatusin (BB) and 3 β -hydroxy-3-deoxobarbatusin, (OHBB), isolated from *Plectranthus grandis*, popularly called big boldo, were evaluated in experimental models of gastric lesions induced by ethanol. Dose of 500 and 1000 mg / kg, p.o. were not toxic. Dose of 1000 mg / kg of BSLE reduced the intestinal transit compared with the control (atropine 1 mg / kg), showing an anti effect. BSLE at doses of 125, 250, 500 and 1000 mg / kg, po significantly attenuated the gastric lesions induced by ethanol in 58, 86, 80 and 90% respectively. In the model of indomethacin, dose of 250, 500 and 1000 mg / kg, p.o. significantly attenuated the gastric damage, inhibiting in 53, 51 and 53% respectively. BSLE (250 mg / kg) had a significant effect on gastric mucosal protective factors, the concentration of the gastric mucous concentration of non-protein sulfhydryl groups (GSH), and the levels of malonaldehyde, as well as the activity of enzymes, superoxide dismutase and catalase. The characterization of the mechanism of action was taken through biological tests in order to assess the action via the activation of nerve endings sensitive to capsaicin, the role of nitric oxide and also the participation of potassium channels. The pre-treatment with the TRPV1 receptor antagonist capsazepina, L-NAME and glibenclamide was able to reverse the effect gastroprotector of BSLE. The results of this study indicate an action cytoprotectant gastroprotector giving effect against gastric injury induced by ethanol and indomethacin, demonstrating a possible participation of this statement, the activation of TRPV1 receptor vanilloid, release of nitric oxide, opening of potassium channels and sensitive to ATP action antioxidant. The analysis of BSLE by high performance liquid chromatography revealed the presence of flavonoids rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside and quercetin. Dose of 2.5, 5.0 and 10 mg / kg, po, were used to assess OHBB and BB. OHBB (2.5, 5.0 and 10 mg / kg, po) significantly attenuated the gastric lesions induced by ethanol (53, 55, and 96% reduction) and BB only at doses of 5.0 and 10 mg / kg, (31, and 76% reduction), respectively. OHBB (5 mg / kg) and BB (10 mg / kg) were able to significantly reduce the depletion of GSH and increased levels of malonaldehyde. The pre-treatment capsazepine, and L-NAME were not able to reverse the effect gastroprotective of OHBB while the pre-treatment with glibenclamide gastroprotective reversed the effect of OHBB front of lesions induced by ethanol. Additionally, the effect of BB was significantly reduced in mice pre-treated with capsazepine and L-NAME. OHBB was capable of causing depletion of catalase, while the administration of BB did not

alter the amount of this enzyme in stomach tissue. OHBB preserved the amount of the enzyme superoxide dismutase and BB was able to increase the amount of the same fabric. The results of this study indicate an action cytoprotectant of OHBB and BB gastroprotective giving effect against gastric injury induced by ethanol. The diterpenes act by different mechanisms, as shown in the results.

Keywords: *Byrsonima sericea*. *Plectranthus grandis*. Barbatusin. 3- β -hydroxy-3-deoxibarbatusina. Gastroprotection. Flavonoids

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
FIGURA 1.	Galho com folhas, flores e frutos de <i>B. sericea</i>	17
FIGURA 2.	3-O-galoil-(-)-epicatequina-[4 β →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina-4 α -benzil-tio-éter isolado em <i>B. verbascifolia</i>	18
FIGURA 3.	Flavonóides presentes em <i>B. crassifolia</i>	18
FIGURA 4.	Núcleo dos flavonóides	19
FIGURA 5.	Estruturas químicas: Quercetina; Quercitrina; Rutina	21
FIGURA 6.	Foto exsicata de <i>Plectranthus grandis</i> Cramer (Willense)	22
FIGURA 7.	Estrutura química da barbatusina	23
FIGURA 8.	Estrutura química da 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina	24
FIGURA 9.	Ciclo GSH-GSSG	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
AMPC	Adenosina Monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
CG	Guanilato ciclase
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CGRP	Peptídio Relacionado ao Gene da Calcitonina
DMSO	Dimetilfulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
E.P.M.	Erro padrão da média
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
H ⁺ , K ⁺ -ATPase	Bomba de prótons
HCl	Ácido clorídrico
i.p.	Intraperitoneal
K _{ATP}	Canais de potássio sensíveis a ATP
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metilester
MDA	Malonaldeído
NAC	N-acetilcisteína
NO	Óxido nítrico
P	Nível de significância
s.c.	Sub-cutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido desmutase
SNE	Sistema Nervoso Entérico

TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TRPV1	Canal de potencial transiente tipo vanilóide subtipo 1
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Plantas medicinais	16
2.2 Potenciais medicinais e constituintes químicos caracterizados das plantas do gênero <i>Byrsonima</i>	16
2.2.1 Flavonóides	18
2.3 Considerações botânicas sobre a espécie <i>Byrsonima sericea</i> DC. e suas atividade biológicas.	20
2.4 Potenciais medicinais e constituintes químicos caracterizados das plantas do gênero <i>Plectranthus</i>	21
2.4.1 Terpenóides	22
2.5 Considerações botânicas sobre a espécie <i>Plectranthus grandis</i> (Cramer) Willense e suas atividade biológicas.	23
2.6 Fisiologia gástrica	24
2.7 Mecanismos de proteção do Estômago	25
2.7.1 Muco / bicarbonato	25
2.7.2 Fluxo sanguíneo	26
2.7.3 Prostaglandina	26
2.7.4 Óxido Nítrico (NO)	27
2.8 Lesão gástrica	28
2.9 Noções Gerais Sobre os Parâmetros Envolvidos nos Processos Oxidativos	29
2.9.1 Radicais livres e estresse Oxidativo	29
2.9.2 Defesa antioxidante	31
2.10 Dados epidemiológicos de úlceras gástricas em animais domésticos	34
3. JUSTIFICATIVA	37

4. HIPÓTESE	
5. OBJETIVOS	39
5.1 Objetivo geral	39
5.2 Objetivos específicos	39
6. CAPÍTULO I	41
Atividade Antioxidante e Gastro-Protetora de Produtos Naturais em Animais Experimentais	
7. CAPÍTULO II	57
Gastroprotective effect of <i>Byrsonima sericea</i> DC. leaf extract against ethanol-induced gastric injury: potential mechanisms	
8. CAPÍTULO III	78
Efeito do extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i> DC. no sistema gastro-intestinal e avaliação da toxicidade em camundongos	
9. CAPÍTULO IV	96
Pre-clinical studies of the gastroprotective effect of Barbatusin and 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusin, diterpenes isolated from <i>Plectranthus grandis</i> , in experimental models of acute gastric injury and the possible mechanisms	
10. CONCLUSÕES	125
11. PERSPECTIVAS	127
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
13. ANEXOS	138
1 INTRODUÇÃO	

A utilização popular de plantas no combate as doenças é milenar. A comprovação científica dos efeitos benéficos das plantas tem despertado interesse junto aos pesquisadores, pois um grande número permanece desconhecido, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico.

O uso de plantas medicinais como fonte de medicamentos é uma tradição e uma tendência generalizada na medicina popular brasileira. Esta tendência tem contribuído significativamente não só para o consumo de plantas medicinais, mas também para o uso de medicamentos fitoterápicos. Os conhecimentos acumulados ao longo do tempo demonstram que tais produtos podem causar sérios danos se usados de forma inadequada, e comprovam que a história do que é “natural” não faz mal, é um mito, e precisa ser olhado de modo diferente.

O Brasil apresenta uma flora bastante rica e diversificada, constituindo uma fonte potencial de novas substâncias com inúmeras ações farmacológicas. A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal como a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (DIAS, 1996).

A medicina tradicional ainda é o suporte principal de cerca da 75-80% da população mundial, principalmente, em países subdesenvolvidos. A Índia, que mantém uma antiga tradição em medicina popular tem produzido remédios simples e eficientes usando plantas e seus compostos derivados. Desta forma, necessita-se de validação por meio de pesquisas científicas que utilizem modelos adequados de experimentação, para comprovação dos efeitos farmacológicos através do isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos, para que se possa obter a formulação de fitoterápicos seguros para uso humano e/ou animal. Sendo assim, o estudo da dose, concentração e via de administração são essenciais (ZHAN;ZHOU, 2003).

Nos últimos anos, a utilização de plantas no tratamento de doenças, está sendo revalidada por extensas pesquisas em diferentes espécies de plantas sobre a descoberta de seus princípios terapêuticos. Nesse contexto, MARINHO et al. (2007), numa pesquisa desenvolvida no município de Patos-Paraíba, investigaram o conhecimento popular e a utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças nos animais domésticos, e concluíram que o uso das plantas medicinais na terapêutica veterinária foi ressaltado como uma alternativa de tratamento viável, segura, de fácil obtenção e baixo custo.

Estudos científicos mostram os potenciais curativos de plantas medicinais no tratamento de várias doenças acometidas por animais.

No Ceará alguns trabalhos tem demonstrado a atividade anti-helmíntica de plantas em caprinos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007).

Óleos essenciais foram utilizados para tratamentos de gengivites em cães (GIRÃO et al., 2003).

O uso das plantas medicinais e fitoterápicos ainda é pouco explorado na medicina veterinária, estes poderiam agir de forma preventiva contra uma série de doenças que afetam tanto animais de produção, quanto animais utilizados na prática de esportes, principalmente aqueles submetidos ao estresse provocado pelo confinamento ou práticas de manejos intensivos, e que apresentam doenças associadas a essa condição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais se destacam como grandes fontes de novos recursos terapêuticos, e é a partir destas que a indústria farmacêutica desenvolve os medicamentos (SCHENKEL et al., 2001).

O interesse em todo o mundo em torno dos “produtos naturais” vem aumentando consideravelmente, muito embora os centros menos desenvolvidos sempre apresentassem uma forte dependência aos medicamentos fitoterápicos. Esta dependência não é somente justificada pelo fator econômico, mas geralmente à transmissão secular das tradições culturais de cada comunidade. O Brasil está entre os países com maior biodiversidade vegetal, esta característica tem colaborado de uma forma expressiva para o consumo não só de plantas medicinais, como também de medicamentos fitoterápicos.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (DIAS, 1996). Mais da metade dessas espécies se encontra nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra (SOEJARTO, 1996). Muitas dessas espécies de plantas ainda permanecem pouco conhecidas sob qualquer ponto de vista.

Nestas condições, seria de se esperar que o Brasil fosse um país privilegiado, no entanto, nosso país não tem um desempenho destacado como deveria no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES et al., 2001).

Os grandes centros de pesquisa passaram a isolar e sintetizar as substâncias responsáveis pelos princípios ativos das plantas medicinais de uso popular, para produzir novos fármacos. No entanto, é necessário observar que cada planta é constituída de inúmeros princípios ativos que podem agir em sinergia, ou seja, o resultado do conjunto é muitas vezes mais potente e com menos efeitos colaterais que cada princípio ativo isolado. Assim, os tratamentos à base de fitoterápicos têm demonstrado cada vez mais a sua eficácia, mas como qualquer outro tipo de tratamento, requer antes uma análise correta da doença para que a planta utilizada tenha realmente a eficiência que se espera (ARCOLINE, 2003).

2.2 Potenciais medicinais e constituintes químicos caracterizados das plantas do gênero *Byrsonima*

O gênero *Byrsonima* está distribuído pela América Tropical, apresentando cerca de 150 espécies e encontrada freqüentemente na zona da mata, em florestas úmidas, no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil (MABBERLEY, 1993).

No Nordeste brasileiro, ocorrem várias espécies do gênero *Byrsonima* que são principalmente conhecidas pela utilização dos seus frutos na alimentação e pelo emprego com fins medicinais. Espécies deste gênero são comumente empregadas como antiasmáticas, contra febre e infecção de pele. Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonoídicos e triterpenos classes de substâncias naturais de ocorrência no gênero (MENDES et al., 1999).

Byrsonima verbascifolia é utilizada na medicina popular para problemas de estômago e já foi relatado o isolamento de substâncias como quercetina e 3-O-galoil(-)-epicatequina-[4 β →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina-4 α -benzil-tio-éter (Fig1), isoquercetina, 3-arabinosil-quercetina, taninos gálicos compostos com conhecidas atividades antioxidantes (BÉJAR; MALONE, 1993).

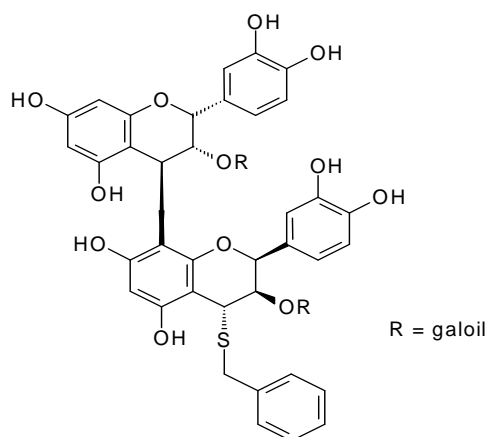


Figura 1. 3-O-galoil(-)-epicatequina-[4 β →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina-4 α -benzil-tio-éter isolado em *B. verbascifolia*

Outra planta do gênero, *Byrsonima coccolobifolia*, têm comprovada a sua atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, e bactericida para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Byrsonima crassa é utilizada no tratamento de infecções cutâneas e disfunções gastrintestinais. Estudos comprovam a presença de taninos e flavonóides como 3-O- β -D-arabinopiranosídeo quercetina (VÁZQUEZ et al., 1998; SANNORNIYA et al., 2005).

Há relatos na literatura sobre efeitos antifúngicos, bactericidas e convulsivos de *Byrsonima crassifolia*, sendo caracterizada a presença de compostos isolados quercetina, 3-O- α -D-glicopiranosídeo quercetina, 3-O- β -D-arabinopiranosídeo quercetina, (-)-epicatequina e (+)-catequina (Fig.2) (RASTRELLI et al., 1997).

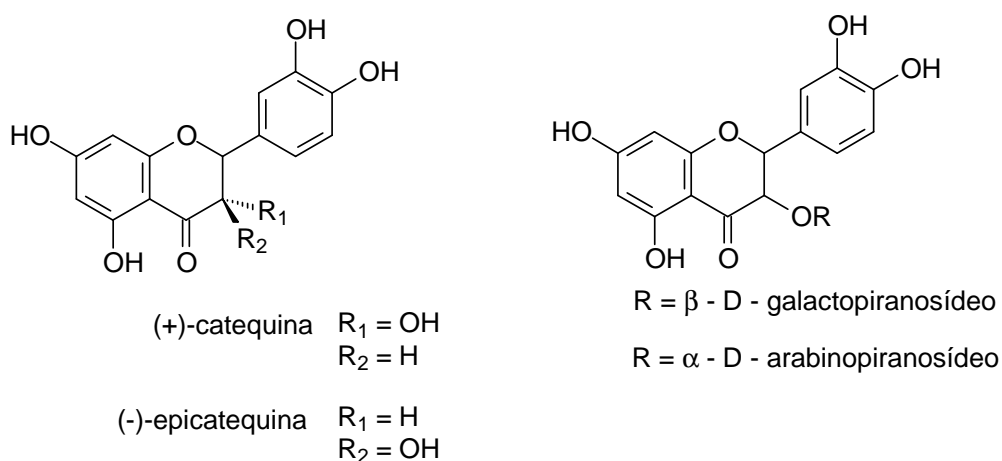


Figura 2. Flavonóides presentes em *B. crassifolia*

2.2.1 Flavonóides

Compostos fitoquímicos que apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas recebem a denominação de compostos fenólicos e, geralmente apresentam propriedade antioxidante. Dentre eles desatacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e o tocoferol como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (MELO;GUERRA, 2002).

Flavonóides são compostos formados pela condensação dos ácidos cinâmicos com 3 unidades de malonil-CoA.

A estrutura química de um flavonóide apresenta as unidades C₆-C₃-C₆, sendo dois anéis benzênicos (C₆) ligados pela unidade C₃ que pode formar um ciclo ou não (**Fig.3**).

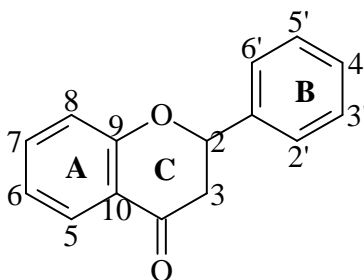


Figura 3. Núcleo dos flavonóides

Trabalhos recentes têm demonstrado que flavonóides encontrados em frutos e vegetais são importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Encontra-se em abundância nas angiospermas, tais compostos podem também agir como antioxidantes (MELO; GUERRA, 2002).

Os flavonóides atuam como antioxidantes primários reagindo com os radicais livres, e também como quelantes de metais. Flavonas e flavonóis são as duas principais classes de flavonóides encontradas universalmente na natureza. Os mais comuns flavonóis antioxidantes são canferol, quercetina e miricetina (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os flavonóides são utilizados por botânicos para classificação taxonômica. Eles regulam o crescimento da planta pela inibição da exocitose da auxina (ácido indol acético), assim como pela indução da expressão gênica e influenciam outras células em numerosas vias. Flavonóides inibem o crescimento ou matam muitas cepas bacterianas, inibem importantes enzimas virais como transcriptase reversa e proteases, bem como destroem alguns protozoários patogênicos. Todas essas atividades são exercidas com baixa toxicidade em células animais (HAVSTEEN, 2002).

A análise qualitativa e quantitativa de flavonóides comuns em extratos polares de plantas como, por exemplo, rutina, isoquercitrina, quercetina, catequinas e canferol podem ser

realizadas através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se de padrões destas substâncias. Nesta técnica utiliza-se em geral um detector de ultravioleta.

A rutina, (C) 3-O-rutinosídeo da quercetina, é largamente utilizada em fitoterápicos para fragilidade capilar prevenindo varizes e derrames de retina. Quercitrina, (B) (3-O-glicosídeo de quercetina) apresenta atividade antiinflamatória em colite experimental, associada com ação antioxidante e melhoramento da absorção de água in vivo (SÁNCHEZ et al., 2002). Quercetina, (A) o principal flavonóide presente em vegetais e frutas, exerce potenciais efeitos anticarcinogênicos em modelos de animais e culturas de células (SALUCCI, 2002).

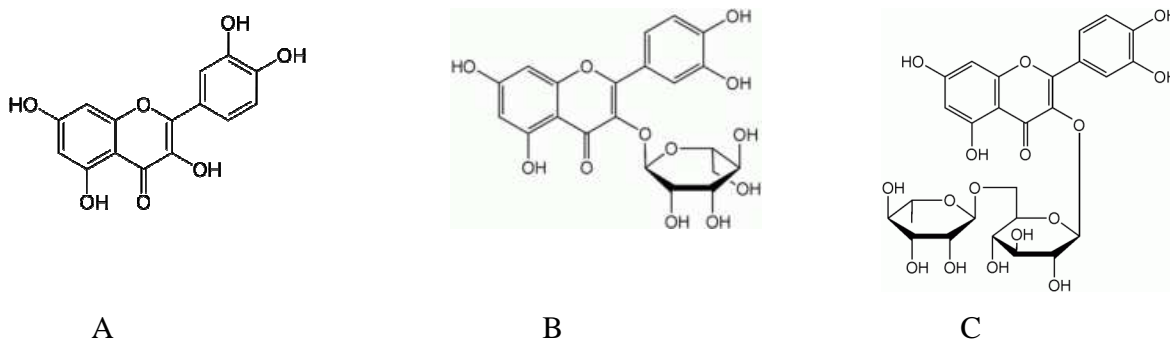


Figura 4: Estruturas químicas de: Quercetina (A); Quercitrina (B); Rutina (C).

Vegetais ricos em compostos fenólicos por serem tradicionalmente consumidos como alimentos, são considerados seguros, tanto pelos consumidores como pela indústria de alimentos. Constatação que, no entanto não garante a sua inocuidade, requerendo, portanto estudos toxicológicos sobre estes compostos fitoquímicos (MELO; GUERRA, 2002).

Atualmente profissionais da área de saúde prescrevem o uso de flavonóides puros para tratar diversas doenças, devido à sua capacidade, já comprovadas de inibirem enzimas específicas, estimularem alguns hormônios e neurotransmissores e seqüestrarem radicais livres (HAVSTEEN, 2002).

Flavonóides também tem resultados positivos no tratamento de doenças gastrícas, mas esses compostos são pouco estudados em humanos. No entanto estudos mostraram que eles são

capazes de proteger a mucosa gástrica de substâncias necrotizantes e podem ser úteis no tratamento de úlceras gástricas agudas e crônicas (ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

2.3 Considerações botânicas sobre a espécie *Byrsonima sericea* DC. e suas atividades biológicas.

Byrsonima sericea da família Malpighiaceae, conhecida popularmente como murici da praia ou murici do brejo, é uma espécie de ampla distribuição geográfica e que ocorre em ambientes de matas, sendo predominante nas áreas mais ensolaradas. Sua altura média é de 6 a 10 metros. Suas flores são amareladas formando cachos de 1 a 15 centímetros. Seus pequenos frutos têm gosto ácido, são bacáceos e comestíveis, sendo bastante consumido principalmente entre as populações de baixa renda. É geralmente encontrada no litoral em uma faixa que se inicia no Ceará e se estende até o Acre.

Esta planta é utilizada popularmente no tratamento de diabetes e disfunções gastrointestinais e revelou o melhor poder antioxidante do extrato metanólico das folhas, frente ao radical livre DPPH entre várias plantas medicinais analisadas por BOSCOLO et al., (2007).

A espécie *Byrsonima sericea* estudada nesse trabalho apresenta poucos relatos científicos sobre sua composição química e atividades biológicas (**Fig.5**).



Figura 5: Galho com folhas, flores e frutos de *B. sericea*.

2.4 Potenciais medicinais e constituintes químicos caracterizados das plantas do gênero *Plectranthus*

As plantas do gênero *Plectranthus* têm sido utilizadas pela população principalmente no tratamento dos distúrbios gástricos. Entretanto outras ações farmacológicas já foram testadas e comprovadas para a espécie *P. barbatus* envolvendo compostos isolados de suas folhas, caule e raízes.

O gênero *Plectranthus* pertence à família Lamiaceae, e abrange 350 espécies distribuídas nas regiões subtropical e tropical (PASSINHO et al., 2000). Espécies de *Plectranthus* têm importância econômica por ser fonte de óleos essenciais e usadas em ornamentação, sendo que estas espécies são citadas mais frequentemente para o emprego das suas propriedades medicinais, nas quais, representa mais de 85% de todas as utilizações (LUKHOBBA et al., 2006).

No Ceará a medicina popular faz uso de 4 espécies de *Plectranthus*: *P. amboinicus* Andr., *P. barbatus* (Lour) Spreng, *P. ornatus* e *P. grandis*. Informações etnofarmacológicas incluem o uso das folhas de *P. barbatus* (malva santa, boldo brasileiro), *P. grandis* (boldo grande) e *P. ornatus* (Boldo) para tratamento dos males do fígado e de problemas da digestão. *P. amboinicus* (malvarisco) é usado em xaropes caseiros para tratamento da tosse, dor na garganta e bronquite (MATOS, 2002).

Entre os aspectos farmacológicos estudados e comprovados de *P. barbatus* (Lour) Spreng destacam-se: ação hipotensiva, inotrópica positiva, cardiovascular, bronco-dilatadora, ativação da adenosina ciclase, inibição da agregação de plaquetas, antitumoral, antinociceptivo e antiinflamatório (COSTA, 2006).

2.4.1 Terpenóides

Os terpenóides formam uma larga família com estruturas bastantes diversas derivadas das unidades isoprênicas C₅. Na sua biossíntese, 3 moléculas de Acetil-CoA formam o ácido mevalônico

O ácido mevalônico sofre descarboxilação e desidratação para formar isopentenil pirofosfato que se condensa com dimetilalil pirofosfato para dar origem aos monoterpenos

(C₁₀), sesquiterpenos (15), diterpenos (20) e triterpenos (30) e assim por diante são formados os outros terpenos.

Os diterpenos são formados pela união de quatro unidades de isopreno e são encontrados principalmente nas resinas de plantas. Eles se apresentam com estruturas acíclicas como o fitol, monocíclicas como a vitamina A, bicíclica, esclareol, tricíclica como ácido abiético que está presente em grandes quantidades na resina de Coníferas e tetracíclico como a barbatusina (**Fig.6**).

Estudos mostraram que alguns diterpenos possuem propriedades biológicas importantes como: atividades espasmolítica e hipotensiva (TANDON et al., 1977), propriedades cardioativas (BHAT *et al.*, 1977, p. 1669) e atividade antihipertensiva (KELECOM,1983), dentre outros.

Entre os estudos químicos, merecem destaque aqueles realizados por ZELNIK et al., (1977), que analisaram a composição química através do estudo cromatográfico do extrato de acetona das folhas das folhas de *P. barbatus* e estabeleceram a estrutura química de três diterpenos isolados: barbatusina, presente em maior quantidade o 3-β-hidroxi-3-deoxobarbatusina (**Fig.7**) e o ciclobutatusina, em menor quantidade.

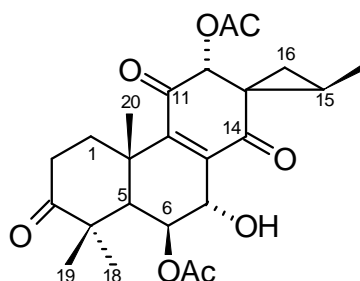


Figura 6: Estrutura da barbatusina

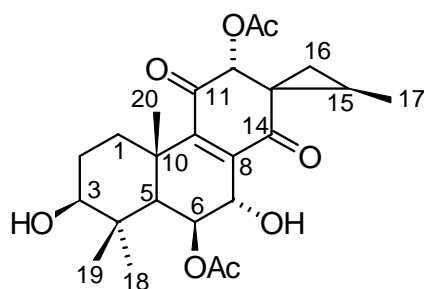


Figura 7: Estrutura da 3β-hidroxi-3-deoxobarbatusina

2.5 Considerações botânicas sobre a espécie *Plectranthus grandis* (Cramer) Willense e suas atividades biológicas.

Plectranthus grandis (Cramer) Willense é popularmente conhecida no Brasil pelas denominações de boldo-grande ou boldo-da-folha-grande, falsa malva-santa e boldo mexicano.

Dados da literatura *P. grandis* é um arbusto com até 3 m de altura com folhas maiores do que 4,7 cm, caule subquadrangular, espesso com pêlos, inflorescência racemosa, racemo simples, erétil, 26 - 56 cm, pedúnculo rígido, flores com corola maior do que 2,0 cm de comprimento de coloração azul (**Fig.8**). Esta espécie é capaz de florescer no Nordeste nas regiões serranas, litorâneas ou sertão central, no que diferem das outras espécies que necessitam de clima mais ameno ou temperado como ocorre nas chamadas serras frescas (MATOS, 2002).

Plectranthus grandis, é utilizado largamente pela população no combate a dispepsia. Embora se utilize popularmente a planta para combater problemas gastrintestinais não existem dados na literatura científica sobre efeitos farmacológicos de *P. grandis*. No entanto, essa espécie possui características morfológicas semelhantes as da *Plectranthus barbatus*, cujos extratos são extensivamente estudados no sistema gastrintestinal. As diferenças morfológicas são pequenas, diferindo principalmente no “amargor” dos talos e folhas da espécie *P. grandis* em relação a *P. barbatus* (MATOS, 2002).

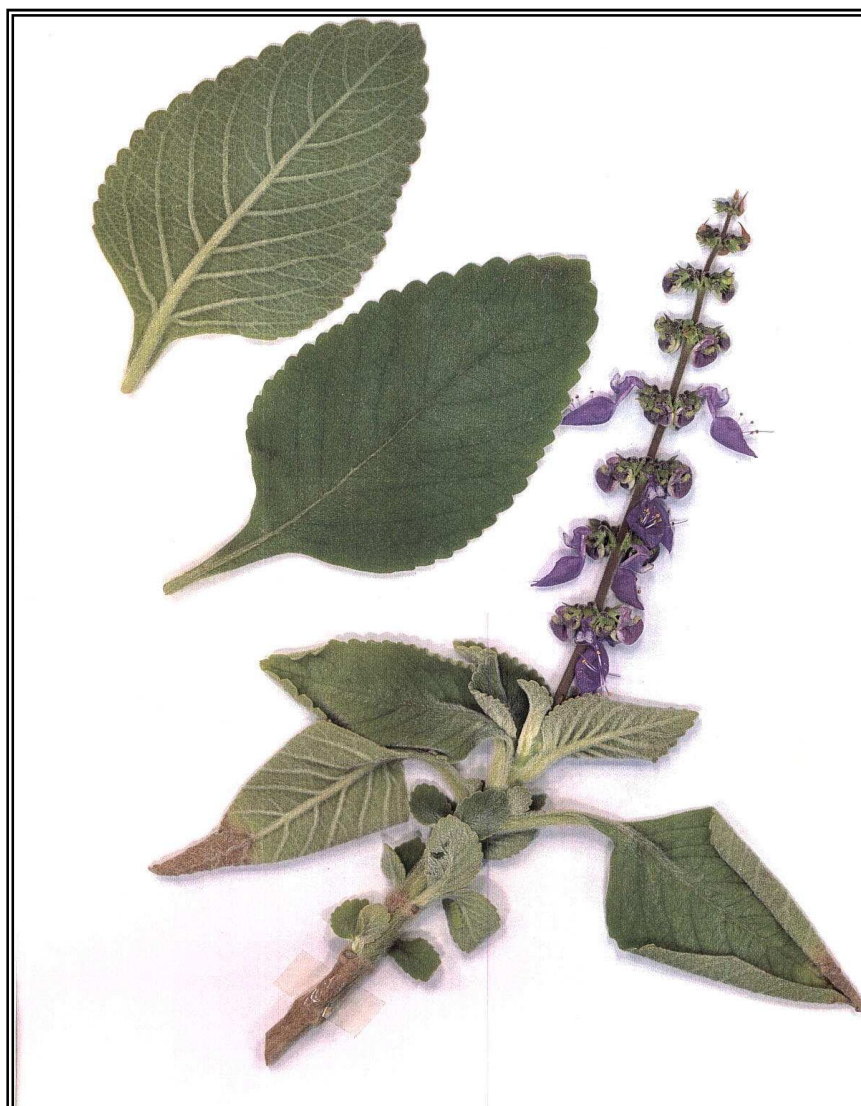


Figura 8: Foto exsicata de *Plectranthus grandis* Cramer (Willense). Foto gentilmente fornecida pelo Prof. Francisco José de Abreu Matos

2.6 Fisiologia Gástrica

Anatomicamente, o estômago divide-se em 3 porções: fundo, corpo e antro pilórico; sendo limitado por 2 sistemas esfínterianos: o esfíncter esofágico inferior, na parte superior

ou proximal do estômago; e o esfíncter pilórico ou piloro, na parte inferior ou distal do estômago (HOGBEN et al., 1974).

Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em duas regiões glandulares: a mucosa oxíntica e a mucosa antral. A mucosa oxíntica é mais extensa, ocupando o corpo e o fundo, e é o sítio da secreção de ácido clorídrico. A mucosa oxíntica é formada por glândulas oxínticas, que são constituídas por células parietais (ou oxínticas), células principais, células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL). No colo glandular, predominam as células produtoras de muco, que protegem a mucosa gástrica da ação corrosiva das secreções originadas pela glândula (LUCEY;YAMADA, 1989; CHUANG et al., 1991; SUNDLER et al., 1991). As glândulas da mucosa antral apresentam os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, exceto as células parietais (HOGBEN et al., 1974).

A inervação do estômago compreende fibras extrínsecas e intrínsecas. A inervação intrínseca é constituída por dois plexos principais, o plexo mioentérico que inerva as camadas musculares e regula a função motora, e o plexo submucoso que inerva a mucosa e regula a absorção e as secreções gastrointestinais (SCHUBERT; SHAMBUREK, 1990,). Neurônios de ambos os plexos recebem aferências do sistema nervoso central através de fibras do sistema nervoso parassimpático e simpático (inervação extrínseca) e de outros neurônios entéricos, incluindo neurônios sensoriais e interneurônios. Estes circuitos neuronais regulam as funções motoras e secretoras do tubo digestivo (COSTA; BROOKES, 1994). A inervação simpática do trato gastrointestinal é realizada principalmente por fibras pós-ganglionares que inervam diretamente os vasos sangüíneos e o músculo liso, inibindo a motilidade e a atividade secretora do sistema gastrointestinal, porém estimula a contração da *muscularis mucosae* e de alguns esfíncteres (LONGHURST et al., 1984-a; LONGHURST et al., 1984-b). Em geral, as fibras do parassimpático terminam nos gânglios do plexo mioentérico. As fibras aferentes do vago inervam diretamente a célula parietal e realizam sinapses com as células ganglionares do sistema nervoso entérico (SNE), estimulando a atividade motora e secretora do intestino (LONGHURST et al., 1984-a; LONGHURST et al., 1984-b).

2.7 Mecanismos de proteção do Estômago

O mecanismo de defesa da mucosa gastrointestinal contra fatores agressores, como o ácido clorídrico e drogas antiinflamatórias não-esteroidais, consiste principalmente de fatores

funcionais, humorais e neurais. A secreção do muco alcalino, microcirculação da mucosa e motilidade agem como fatores funcionais, enquanto que prostaglandina e óxido nítrico agem como fatores humorais e os neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina agem como fatores neurais (TSUKIMI; OKABE, 2001; REPETTO; LLESUY, 2002).

2.7.1 Muco / bicarbonato

Fator de proteção da mucosa sendo secretado pelas células mucosas do estômago, atua como a primeira linha de defesa da mucosa gástrica e a protege de fatores agressores endógenos e exógenos apresenta-se de forma viscosa, elástica, aderente, como um gel transparente, que contém 95% de água e 5% de glicoproteínas, recobrando toda a superfície da mucosa gastrointestinal. O muco é capaz de agir como antioxidante e reduzir danos na mucosa promovidos por radicais livres (REPETTO; LLESUY, 2002). O muco também tem um papel importante na cicatrização das úlceras, acelerando a recuperação da mucosa lesada (MAITY et al., 2003). Estudo em ratos foi observado uma relação inversa na espessura da camada de muco e na acidificação intracelular do epitélio gástrico (PHILLIPSON et al., 2002).

O muco gástrico ocorre em 3 formas: a mucina solúvel presente no sucogástrico; o muco (aderente) insolúvel cobrindo as células da mucosa; e o muco presente nas células secretoras de muco (MOJZIS et al., 2000).

O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago. A proteção da mucosa do estomago não depende somente do controle da secreção ácida gástrica; precisa juntamente de uma secreção apropriada de muco e bicarbonato (WALLACE, 2001). A secreção de muco, como a de bicarbonato, é estimulada por diversos fatores e constituem uma barreira mucoprotetora (SANIOTO, 1991; KUTCHAI, 1996), que funciona como uma poderosa proteção da mucosa contra danos induzidos por ácido, pepsina e etanol (WALLACE, 2001).

2.7.2 Fluxo sangüíneo

O suprimento de sangue na mucosa gástrica é um fator importante, determinante para a integridade da mucosa gástrica. É regulado e modificado por sistemas e fatores metabólicos locais como prostaglandina, leucotrieno e outros mediadores químicos endógenos na mucosa (KAWANO; TSUJI, 2000). Um dos papéis do fluxo sangüíneo na mucosa é suprir a mucosa

gástrica com oxigênio, nutrientes e hormônios, além de participar da regulação da saída do ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato, remoção dos produtos e retrodifusão de íons hidrogênio. Esses eventos contribuem substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa (KAWANO; TSUJI, 2000).

2.7.3 Prostaglandina

A prostaglandina produzida pela mucosa gástrica, aumenta na presença de agentes irritantes, e apresenta um papel citoprotetor importante, inibindo a secreção ácida por reduzir a produção celular do monofosfato de adenosina (AMP) (BEEJAY; WOLFE, 2000). A enzima ciclooxigenase (COX) converte o ácido araquidônico em prostaglandina G₂ reduzindo este intermediário a prostaglandina H₂ (PGH₂). A PGH₂ é um metabólito instável que é convertido em outras espécies de prostaglandinas, incluindo prostaglandina E₂, prostaciclina e tromboxanos (ATAY et al., 2000). Existem pelo menos duas isoformas distintas da COX, denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos (PESKAR, 2001) e esta isoforma provavelmente promove a produção de PG protetora da mucosa gástrica e que possui um papel importante na manutenção da homeostase (RODRÍGUEZ; TÉLLEZ et al., 2001). Ao contrário, a expressão da COX-2 geralmente é baixa sob condições basais. O aumento da expressão da COX-2 ocorre em certas condições patofisiológicas como a inflamação, dano tecidual e transformação maligna (PESKAR, 2001).

A ação protetora das prostaglandinas envolve fluxo sanguíneo, estimulação de muco, secreção de bicarbonato (HAWKEY, 2000) e aumento da resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (HAWKEY; RAMPTON, 1985). As funções de vasodilatação e proteção da mucosa gástrica das prostaglandinas têm sido extensivamente documentadas e analisadas (GISLASON et al., 1995; WHITTLE; VANE, 1987).

2.7.4 Óxido Nítrico (NO)

Uma variedade de isoformas de óxido nítrico sintase (NOS) tem sido purificada em diferentes tecidos, e muitas já tiveram seus genes distintos. As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, as NOS constitutivas: nNOS (neuronal), e a eNOS (endotelial), dependente de íons cálcio (Ca⁺⁺) e calmodulina, que estão envolvidas na sinalização celular, e a

NOS induzível (iNOS), gerada por macrófagos e outras células ativadas por citocinas, cada uma com capacidade de gerar NO através de mecanismos regulatórios complementares e distintos. Através dessa via o NO se liga ao grupo heme da guanilato ciclase (GC) que estimula a enzima a gerar guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG), que gera uma corrente de fosforilações conduzindo a funções efetoras (SHAH et al., 2004). O NO também pode mediar sinalizações independentemente da ativação da GC, por exemplo, regulando diretamente as funções dos canais iônicos, de enzimas e de várias outras proteínas (STAMLER et al., 2001).

O óxido nítrico (NO) tem um papel fundamental na perfusão e na regulação vascular por promover a vasodilatação pela sinalização da célula muscular lisa via GMPc (SHAH et al., 2004). O principal fluxo sanguíneo para o trato gastrointestinal chega através da veia mesentérica, e a regulação do fluxo até as arteríolas mesentéricas é um passo importante para a regulação do fluxo sanguíneo intestinal geral e local (SHAH et al., 2002 p.1688).

A produção constitutiva de NO é importante para manter a barreira protetora da mucosa gastrointestinal. Esse mecanismo protetor do NO pode ser devido a sua capacidade em aumentar do fluxo sanguíneo da mucosa e estabilizar a influência dos mastócitos (ALICAN; KUBES, 1996). Entretanto, o excesso na produção de NO associado com estados inflamatórios é caracterizado pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função da barreira de muco. Assim, os níveis de produção de NO, a isoforma geradora de NO e o estado redox das células epiteliais podem determinar os efeitos do NO na permeabilidade da mucosa e proteção. (SHAH et al., 2004).

2.8 Lesão gástrica

As lesões gástricas ocorrem devido a um desequilíbrio entre fatores ofensivos e fatores defensivos (SAIRAM et al., 2002). O dano é provocado quando a mucosa perde a habilidade de proteger-se através das secreções de bicarbonato e muco, bem como, de promover uma nova epitelização (BOOTHE, 1999). A ação tóxica de muitos agentes endógenos e exógenos pode alterar os mecanismos de defesa, aumentando deste modo a permeabilidade da mucosa ao ácido (TWEDT; MAGNE, 1992). Com o aumento da entrada de ácido, ocorre uma cadeia de eventos, começando com lesão direta da mucosa e seguindo por destruição da submucosa (LIPTAK et al., 2001). Os mastócitos na submucosa e lâmina própria degranulam e liberam histamina

quando em contato com o ácido. A histamina liberada estimula a secreção celular parietal de ácido clorídrico, assim como inflamação local e edema agudo. O ácido pode ainda lesionar vasos sanguíneos e estimular nervos da parede gástrica, provocando contrações musculares exacerbadas (TWEDT; MAGNE, 1992).

A reconstituição epitelial é extremamente importante na manutenção da estrutura e funcionamento da barreira mucosa. A formação dos radicais livres, citocinas inflamatórias e o estresse fisiopatológico reduzem a taxa de proliferação celular dificultando o processo de reconstituição das células gástricas. Por outro lado, o epitélio gástrico é recoberto por um espesso muco que impede a retrodifusão dos íons H^+ . O rompimento da barreira mucosa pelo refluxo de bile, uremia, aspirina e outros antiinflamatórios não hormonais aumentam a permeabilidade da mucosa e permitem a retrodifusão do íon H^+ , aumentando a acidose tecidual (BEEJAY; WOLFE, 2000). Alteração no fluxo sanguíneo da mucosa é outro fator de grande importância na gênese das injúrias gástricas. O fluxo sanguíneo pode ser severamente alterado por ação de drogas, como o ácido acetil salicílico, etanol e pela entrada de agentes luminiais, como ácido e pepsina (ROBBINS et al., 1998). A cicatrização das lesões fica comprometida devido à redução do fluxo sanguíneo na mucosa causada por estes agentes (BOOTHE, 1999).

Estudos experimentais têm demonstrado que a geração de radicais livres está associada à patogênese de lesões gástricas agudas induzidas por etanol que medeia à injúria no tecido estimulando a peroxidação dos lipídios, danos na membrana celular através da coagulação de proteínas, lipídios e ácidos nucléicos. As lesões histopatológicas mais evidenciadas são congestões, edema, hemorragia, erosão e necrose (AL-SHABANAH et al., 2000; LA CASA et al., 2000).

2.9 Noções Gerais Sobre os Parâmetros Envolvidos nos Processos Oxidativos

2.9.1 Radicais livres e estresse Oxidativo

Na atmosfera terrestre as moléculas de oxigênio são as maiores promotoras de rações nas células vivas. Exceto os organismos que são adaptados para viverem na ausência de oxigênio, todos os animais e vegetais necessitam de oxigênio para obtenção de energia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

Na classificação periódica dos elementos químicos, o oxigênio pertence à família dos calcogênios (6A), cujo número atômico é 8 e amassa atômica é 16, possuindo 8 elétrons distribuídos nas suas camadas eletrônicas.

Grande parte do O_2 absorvido (95%) pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando-se água na cadeia respiratória, através do transporte de elétrons na membrana das mitocôndrias, também no retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do O_2 , pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo 4 elétrons e $4H^+$ para o oxigênio, que diretamente se reduz formando água. Como uma pequena parte do oxigênio é reduzido univalentemente, ou seja, a molécula recebe somente 1 elétron, que ocupará um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua desemparelhado, produzindo intermediários altamente reativos, que conhecidos como Espécies Reativas de oxigênio (EROs) formando a primeira espécie tóxica reativa de oxigênio, o superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Radicais livres são definidos íons como moléculas que têm elétrons desemparelhados. Eles são geralmente instáveis e muito reativos (FANG et al., 2002). Um elétron desemparelhado pode se associar com átomos isolados, como íons metálicos e hidrogênio, ou ainda com moléculas de açúcar, proteínas, lipídeos e também DNA, resultando em um processo de relevância biológica (SLATER, 1984; HALLIWELL, 1987).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em animais, inclusive humanos, sob condições fisiológicas e patológicas. Exemplos de radicais livres oxigenados são superóxido, hidroxila, radicais peroxil (RO_2), alcóxil (RO) e hidroperoxil (HO_2) (GULÇIN *et al.*, 2003, p. 371). Esses radicais livres oxigenados podem ser convertidos a outras espécies reativas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipoclorídrico (HOCL), ácido hipobrômico (HOBr) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Assim as EROs incluem espécies radicais e não radicais (FANG et al., 2002). Por sua larga influência nos sistemas biológicos, as EROs têm despertado significativo interesse por pesquisadores.

O peróxido de hidrogênio, que embora não seja não muito reativa, é capaz de inativar enzimas, principalmente por oxidação de grupamento tióis essenciais. Seu maior poder oxidante é como gerador do radical hidroxila ($HO\bullet$) e pela interação com o radical superóxido ($O_2\bullet$), sendo este um potente oxidante, podendo levar a morte qualquer célula, sendo fortemente potencializada sua toxicidade na presença do ferro (EATON, 1991).

Radicais livres oxigenados são constantemente gerados *in vivo* para propósitos fisiológicos como, por exemplo, defesa contra microorganismos patogênicos. Em alguns casos são produzidos em excesso, quando isso acontece ocorre o estresse oxidativo (GUO et al., 2003). Algumas situações geradoras de estresse oxidativo incluem: ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por microorganismos, hiperóxia, alguns xenobióticos, radiação ionizante, isquemia e exercício físico extenuante (YU, 1994; PEREIRA et al., 1994). Esses radicais também estão envolvidos em diversas doenças: tumores, diabetes, infertilidade, gastrite e causam danos oxidativos no DNA, lipídeos e proteínas (CHEN et al., 2006).

As EROs como já foi mencionado, são formadas a partir do oxigênio, que ao mesmo tempo que gera e sustenta a vida, pode por outro lado causar danos irreversíveis. Quando produzidas em excesso são extremamente tóxicas e quando o organismo encontra dificuldades em neutralizá-las elas se tornam potencialmente perigosas, podendo causar diversas doenças, evidenciando o dano oxidativo causado por elas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Uma das principais conseqüências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica (MCBRIDE et al., 1988). Ela ocorre em ácidos graxos polinsaturados e é iniciada por um radical OH° que captura um átomo de hidrogênio de um carbono metileno de cadeia polialquil do ácido graxo. O oxigênio é mais solúvel em um meio apolar que em meio polar, permitindo que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração de O_2 na região hidrofóbica medial, onde este tem potencial para realizar o maior dano aos ácidos graxos polinsaturados existentes na membrana. Desta forma a membrana plasmática se torna a estrutura mais susceptível a desestruturação provocada pela peroxidação lipídica, fazendo com que ela perca a forma de mosaico fluido, como a flexibilidade e por fim sua função biológica. Assim, um ácido graxo com um elétron desemparelhado reage com o O_2 gerando um radical peroxil, produto altamente reativo e pode se combinar com outros radicais semelhantes, alterando as proteínas das membranas. O malonaldeído é um dos produtos da peroxidação lipídica que é extremamente reativo, que pode reagir de forma eventual com o grupo amino das proteínas, fosfolipídeos ou ácidos nucleicos, provocando alterações estruturais nos constituintes celulares (MCBRIDE et al., 1988).

Os peróxidos de lipídeos atingem alvos mais distantes de maneira mais fácil por possuírem poder ação antioxidante maior do que outras espécies primárias de O_2 .

2.9.2 Defesa antioxidante

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, comparadas com aqueles substratos oxidáveis, significativamente retardam ou inibem a oxidação deste substrato e podem agir em diferentes níveis da seqüência oxidativa (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1985).

O oxigênio é um elemento indispensável à vida, e que ao mesmo tempo pode causar danos ao organismo (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1985). Os agentes que atuam como antioxidantes não possuem a capacidade de diferenciar as espécies reativas de oxigênio que tem um papel fisiológico benéfico, daquelas que causam injúrias no organismo. Por esse motivo, sua ação em alguns casos, pode provocar danos ao invés de ser vantajosa. Sendo assim a manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de espécies reativas de oxigênio é de extrema importância para sobrevivência dos organismos, sendo que, um distúrbio poderá ocasionar uma série de processos patológicos (BAST et al., 1991).

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que todas as biomoléculas são susceptíveis á oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Para vencer o desafio dos radicais livres, os seres aeróbicos desenvolveram uma bateria de mecanismos de proteção conhecida como defesas antioxidantes.

Os antioxidantes que representam a defesa dos organismos contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) ,e são divididos os dois tipos principais: os enzimáticos e os não enzimáticos (YU, 1994).

Alguns nutrientes essenciais podem atacar diretamente as EROs diminuindo a ação tóxica, produzidas intra e extracelularmente. Dentre muitos antioxidantes naturais existe a vitamina E, conhecida também com α tocoferol, que é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares, varre os radicais livres formados no citocromo P-450. Os carotenóides, principalmente o β caroteno, podem funcionar como precursores da vitamina A, atuam diminuindo a formação de oxigênio singleto *in vivo*, e remove os já formados, vitamina C com comprovada ação imunoestimulante e o selênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Ainda existem uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as EROs nos sistemas biológicos como, a ubiquinona, a ceruloplasmina, o ácido úrico, a taurina, os flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal (SIES,1991).

As enzimas superóxido dismutase, (SOD) glutaciona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) representam a principal defesa endógena do organismo quando são expostos as EROs .

É possível que a enzima superóxido dismutase (SOD) tenha efeitos anti-envelhecimento podendo atuar sobre todos os processos degenerativos, tendo um papel fundamental na defesa do organismo contra as EROs, atuando na remoção do radical superóxido. Existem diferentes tipos de SOD, dependendo do metal que atua como cofator em seu sítio catalítico (HENDLER, 1990).

A enzima glutaciona peroxidase (GPx) foi descoberta por Mills em 1959, em tecidos de mamíferos, não existindo em plantas ou bactérias, embora possa ser encontrada em algumas espécies de algas e fungos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

O substrato para o GPx é o tripeptídeo glutaciona, encontrada na maioria dos animais, plantas, e até em algumas bactérias. A enzima cataliza a oxidação da glutaciona reduzida (GSH) a glutadiona oxidada (GSSG), usando o peróxido de hidrogênio. A manutenção de níveis de GSH ocorre pela ação da enzima da glutadiona redutase (GSSG-R), (Fig.9) novamente na sua forma reduzida (COHEN; HOCHSTEIN, 1963; PAGLIA; VALENTINE, 1967).

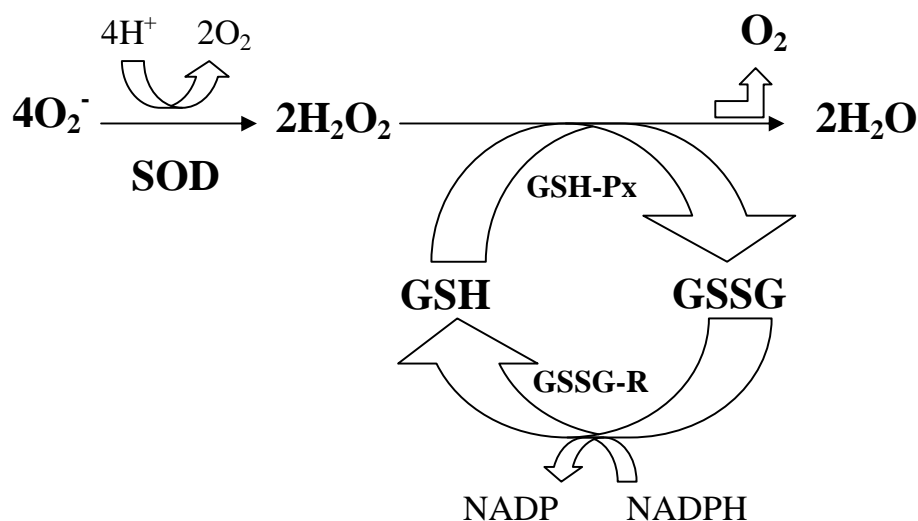


Figura: 9 Reações enzimáticas: Ciclo GSH-GSSG

A GPx tem alta atividade no fígado e eritrócitos, enquanto no cérebro, coração, pulmão sua atividade é moderada e no músculo bastante reduzida (COHEN; HOCHSTEIN, 1963).

A catalase está presente na maioria das células aeróbicas, sendo que em animais se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Essa enzima deve proteger as células de grandes quantidades de H₂O₂. A atividade da catalase pode ser inibida por superóxido, azida e ácido cianídrico (HCN) (EATON, 1991).

A manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de espécies reativas de oxigênio é de extrema importância para sobrevivência dos organismos. Assim, os antioxidantes artificiais como os naturais têm um papel importante por atuar na inibição de radicais livres. A busca por antioxidantes naturais tem sido intensificada nos últimos anos, devido a danos hepáticos ocasionados pelos antioxidantes sintéticos, utilizados para preservar alimentos. Vários óleos essenciais e componentes naturais não voláteis presentes em diferentes espécies vegetais foram identificados como importantes agentes antioxidantes (LOLINGER, 1991; WENG; WANG, 2000).

2.10 Dados epidemiológicos de úlceras gástricas em animais

Animais de produção estão sujeitos ao estresse, devido ao sistema de confinamento ao qual são submetidos como também a outros fatores aliados a esse tipo de criação como: manejo, sazonalidade, disputa por alimento, alta densidade por m², além de permanecerem em condições climáticas desconfortáveis, estando sujeitos a doenças de diversas origens.

Um problema crescente nos sistemas intensivos é a ocorrência de úlceras gástricas, ocorridas principalmente em suínos, sendo relatada em diversas partes do mundo (LIPTAK et al., 2002). O estudo desse problema se intensificou nos anos 60, já que está associado ao crescimento crescente da suinocultura intensivo (BLACHSHAW; KELLY, 1980).

A úlcera gástrica é uma doença comum em suínos criados intensivamente e se caracteriza, inicialmente por erosão seguida de ulceração da mucosa gástrica e hemorrágica, podendo haver ruptura da parede estomacal. Acredita-se que fatores ambientais, nutricionais e de manejo que causam estresse aos animais estejam envolvidos na sua etiologia (MARQUES et al., 1998). Dentre os fatores que tendem a aumentar sua ocorrência em uma granja destacam-se o confinamento, a superlotação e o fornecimento de rações com granulometria muito fina (MARQUES et al., 1998).

Úlcera em ruminantes, principalmente de abomaso ocorre em animais de alta produção e a impactação em animais que recebem forragem muito seca, principalmente capineiras com alto teor de lignina. A úlcera de abomaso não é freqüente em animais criados semi-intensivamente ou extensivamente sendo mais freqüente em animais sujeitos ao estresse (WHITLOCK, 1999b). BORGES et al., (1996) somente observaram úlcera de abomaso em bovinos criados intensivamente, concluindo que nesse caso possivelmente o estresse induzido pela escassez de alimento de boa qualidade possa interferir no processo.

As ulcerações gástricas são muito comuns na espécie eqüina. A domesticação desses animais pode possivelmente ter provocado substanciais efeitos na sua saúde. Inúmeros fatores justificam o aparecimento de tais alterações digestivas como parte integrante do processo de domesticação do cavalo. Considerando que o padrão de secreção ácida no cavalo é contínua durante 24 horas do dia, o confinamento em baias aliado à dieta alimentar, na maior parte dos centros hípicas, fazendo com que os animais permaneça boa parte do dia em jejum, permitindo que o ácido gástrico literalmente “corroa” a mucosa do estômago. Além do mais, diversas outras circunstâncias promovem a elevação dos níveis de secreção ácida, tornando-se fatores potencialmente ulcerogênicos. Dentre eles podemos citar o exercício físico, estresse em suas mais diferentes formas, uso abusivo e indiscriminado de antiinflamatórios não esteroidais face as constantes lesões e contusões inerentes as suas atividades esportivas.

Na espécie eqüina a úlcera assintomática está presente em cerca de metade da população, tanto em potros como em animais adultos. Essa porcentagem pode chegar até 93% na raça Puro Sangue Inglês em treinamento de corrida (MURRAY et al., 1996; MURRAY, 1997).

Os fatores acima mencionados, relacionados tanto aos animais de produção intensiva, quanto aos animais destinados a práticas esportivas, fazem com que estes diminuam a sua eficiência na produção e a perda do desenvolvimento atlético, respectivamente. Sendo assim, pesquisas na busca de aditivos que visam melhorar a sanidade animal, são cada vez mais intensificadas.

Os aditivos são ferramentas utilizadas para o controle dos prejuízos dos estresses causados pelo manejo e são adicionados intencionalmente às rações com o objetivo de conservar, intensificar, ou modificar as suas propriedades químicas sem prejuízo ao seu valor nutritivo.

Os antioxidantes utilizados nas rações podem atuar no organismo do animal como um todo, protegendo as mucosas da ação de radicais livres, inclusive o epitélio gástrico e intestinal, promovendo uma melhoria na absorção dos nutrientes e conseqüentemente um maior ganho de peso. A descoberta de constituintes oriundos de plantas que possam ser utilizados como aditivos para rações, agindo como subterapêuticos ou fitoterápicos, é de grande importância para o crescimento da indústria pecuária tanto no sentido econômico como no sentido da saúde das pessoas que se alimentam da carne desses animais, evitando assim o uso de medicamentos sintéticos.

Nesse contexto as plantas medicinais têm surgido como uma alternativa tanto para o tratamento terapêutico de patologias e/ou aditivos (na forma de subterapêuticos) que acrescentados às rações tem por objetivo modificar o estado de saúde animal, prevenindo-o contra uma série de doenças que provocam perdas econômicas ao produtor como também uma melhora na qualidade de vida animal.

3-JUSTIFICATIVA

A utilização de plantas medicinais no combate a doenças vem desde o início da civilização, e cresce substancialmente nos últimos anos no Brasil, devido ao baixo custo, facilidade de acesso e sua compatibilidade cultural, principalmente na região Nordeste (Nogueira *et al.*, 1996).

O uso de espécies vegetais nas pesquisas envolve investigações da medicina tradicional e popular, o isolamento, a purificação e a caracterização de princípios ativos, relação estrutura/atividade, bem como a investigação dos efeitos farmacológicos de extratos de plantas e de seus compostos químicos se faz necessário quando se deseja a produção de um fitoterápico seguro para uso em humanos ou animais.

Algumas espécies dos gêneros citados têm sido usadas na medicina popular para tratamento de diversas doenças, entre elas úlceras gástricas. No entanto, existem poucas pesquisas científicas que comprovem esta atividade nessas espécies. Evidências clínicas e experimentais sugerem que o estresse oxidativo apresenta um papel fundamental na etiologia da úlcera gástrica e compostos antioxidantes podem oferecer citoproteção gástrica (Repetto *et al.*, 2002).

Investigações químicas de outras espécies de *Byrsonima* mostram a presença de flavonóides e proantocianidinas, compostos com atividades antioxidantes comprovadas (Béjar & Malone, 1993). Um grande número de ações farmacológicas envolvendo compostos isolados de folhas, caule e raízes de *Plectranthus barbatus* Andr. já foram testados e cientificamente comprovados. Alguns dos compostos de *Plectranthus barbatus* também foram isolados das folhas e caules de *Plectranthus grandis*, espécie muito utilizada pela população, e até mesmo confundida com a *P. barbatus*, por ser muito parecida morfológicamente.

As duas plantas alvos estudadas nesta tese *B. sericea* e *P. grandis*, são usadas popularmente para desordens gástricas. *B. sericea* teve sua atividade antioxidante comprovada, e os constituintes químicos de *P. barbatus*, que são similares aos da *P. grandis*, também revelaram atividades biológicas como antiinflamatória e antitumorais.

Sendo assim, tornam-se necessários maiores estudos das plantas para comprovar a eficiência de seus extratos e compostos puros na gastroproteção, como em modelos experimentais de indução de úlceras e mecanismos de ação de seus compostos, que permitam

determinar a dose adequada destes produtos para seu uso seguro. Verificando-se também a inter-relação entre a atividade antioxidante e gastroprotetora.

4-HIPÓTESE CIENTÍFICA

O extrato etanólico de *B. sericea* e os compostos barbatusina e 3 β -hidroxi-3-deoxibarbatusina isolados de *P. grandis* apresentam propriedades antioxidantes e gastroprotetoras.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar a ação gastroprotetora e as possíveis vias envolvidas no mecanismo de ação dos compostos barbatusina (BB) e 3 β -hidroxi-3-deoxibarbatusina (OHBB) isolados de *P. grandis* e do extrato etanólico das folhas de *B. sericeae*, em modelos experimentais de lesão gástrica em camundongos bem como, a caracterização dos constituintes químicos responsáveis pelas ações do extrato em estudo.

5.2 Objetivos específicos

1- Preparar o extrato etanólico das folhas da planta *Byrsonima sericeae* (BSLE); e fracionar o extrato bruto em coluna filtrante com solventes em ordem crescente de polaridade;

2- Identificar classes de compostos químicos a partir dos extratos da planta;

3- Avaliar as atividades antioxidantes *in vitro* das frações, usando o método do radical livre 1,1-Difenil-dipicril-hidrazil (DPPH), selecionando as que possuem melhor atividade antioxidante para o estudo;

4- Avaliar a toxicidade aguda do BSLE;

5- Estudar a atividade gastroprotetora do BSLE e das OHBB e BB em modelos de lesões gástricas por etanol ou indometacina em camundongos;

6- Avaliar a participação do receptor da capsaicina (TRPV1), óxido nítrico, e canais de potássio ATP-dependentes no mecanismo gastroprotetor das OHBB e BB e do BSLE no modelo de úlcera induzida por etanol;

7- Verificar a ação do BSLE, e das OHBB e BB sobre a produção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) gástricos em camundongos;

8- Avaliar a ação do BSLE e das OHBB e BB no nível de peroxidação lipídica, através da dosagem de malonilaldeído na mucosa gástrica no modelo de lesão gástrica induzida por etanol;

9- Avaliar a atividade das enzimas catalase, superóxido desmutase, nos estômagos dos animais tratados com o BSLE e a OHBB e BB no modelo de lesão gástrica induzida por etanol;

10- Avaliar a influência do BSLE das OHBB e BB através da produção de muco gástrico em estômagos de camundongos no modelo de lesão gástrica induzida por etanol;

11- Avaliar a influência e do BSLE e as OHBB e BB sobre o trânsito intestinal em camundongos;

CAPÍTULO 1

Atividade Antioxidante e Gastro-Protetora de Produtos Naturais em Animais Experimentais

Evaluation of antioxidant activity and gastric protection of natural products in experimental animals

Periódico: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - Aceito para publicação em
20/03/2008.

Atividade Antioxidante e Gastro-Protetora de Produtos Naturais em Animais Experimentais

Rodrigues, P.A.^{1*}; Moraes, S.M.¹; Marques, M.M.M.¹; Aguiar, L.A.¹; Nunes-Pinheiro, D.C.S.²

¹Universidade Estadual do Ceará - Laboratório de Produtos Naturais, Av. Paranjana 1700, CEP 60.740-903, Itaperi, Fortaleza-Ce; ² Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Bioquímica e Imunologia Animal, Faculdade de Veterinária.

*Correspondência: patriciaraujoro@yahoo.com.br

RESUMO: Nas condições fisiológicas, durante a redução do oxigênio molecular, espécies reativas de oxigênio são formadas, para a própria defesa do organismo, no entanto quando em excesso estes radicais livres devem ser eliminados, pois podem afetar muitas moléculas biológicas, implicando em várias doenças, tanto no homem como em animais. Assim, o uso de produtos naturais como antioxidantes e protetores gástricos, sobretudo aqueles de baixa toxicidade e baixo preço, vem sendo pesquisados e utilizados de forma alternativa com bons resultados em tratamentos curativos e como aditivos de ração. Dentre várias espécies vegetais brasileiras com efeitos gastroprotetores comprovados estão a *Byrsonima crassa*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus amboinicus* e *Campomasia xanthocarpa*. Um importante uso das plantas medicinais ainda pouco explorado é na medicina preventiva veterinária contra uma série de doenças que afetam tanto animais de produção, devido ao estresse do confinamento e manejo como animais de uma forma geral. Tendo em vista vários estudos que demonstram os produtos naturais agindo como antioxidantes e gastroprotetores não tóxicos, esta revisão tem como objetivo mostrar o papel dos radicais livres relacionados com formação das lesões gástricas bem como os principais modelos experimentais de avaliação de úlceras e a importância dos antioxidantes naturais na prevenção dessas lesões, discutindo sobre as estratégias de defesas do organismo contra a formação de radicais livres.

Palavras-chave: produtos naturais, antioxidantes, gastroprotetor

ABSTRACT: Evaluation of Antioxidant Activity and Gastric Protection of Natural Products in Experimental Animals. In the physiological conditions, during the reduction of the molecular oxygen, reactive oxygen species are formed to be used in organism defense, nevertheless in excess these free radicals must be eliminated because can cause damages in many biological molecules, related to some diseases, either in man as in animals. Thus, the use of natural products which present antioxidant and gastric protection, mainly those with low toxicity and low price, have been studied and used as alternative forms with good results in healing treatment and as additive in the ration. *Byrsonima crassa*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus amboinicus* and *Campomasia xanthocarpa* are examples of Brazilian medicinal plants with gastroprotective action. The use of medicinal plants in preventive medicine veterinary is important nevertheless there are few studies for improving the animal health preventing against a series of diseases that affect animal of production, submitted to stress caused by confinement and handling, as well as common animals. In view of several studies about natural products, acting as antiradical and in gastric protection without toxicity, the objective of this revision is to show the role of free radicals in the formation of gastric lesions as well as the main experimental models of ulcer evaluation and the importance of natural antioxidants in the prevention of these injuries, and discussing the strategies of organism defenses against the formation of free radicals.

Keywords: natural products, antioxidants, gastric protection

INTRODUÇÃO

A grandeza da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (Dias, 1996).

As plantas medicinais usadas tradicionalmente constituem fontes potenciais de novas substâncias ativas, no entanto, existe uma necessidade de validação através de pesquisas científicas que utilizem modelos adequados de experimentação para comprovação dos efeitos farmacológicos e, em seguida, proceder ao isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos e mecanismo de ação para a formulação de fitoterápicos seguros para uso

humano e/ou animal. O estudo da dose, concentração e via de administração também são essenciais.

Animais que são mantidos em cativeiros, bem como animais de produção, sofrem um estresse considerável devido às condições artificializadas a que são submetidos. Outros fatores como sazonalidade, manejo, localização geográfica e período de abate são fatores geradores de estresse, sendo assim fonte de influência na prevalência de úlceras gastroesofágicas.

A fitoterapia poderia ser mais amplamente aplicada na medicina veterinária preventiva ou em conjunto com a medicina convencional. Dentro deste contexto, esta revisão focaliza o uso de plantas ou compostos químicos derivados de plantas, que possuam comprovada atividade antioxidante e/ou gastroprotetora com potencial uso veterinário, mostrando sua viabilidade e reforçando suas vantagens sob o aspecto de cura, e até mesmo financeiras.

1. *Radicais Livres - Estresse Oxidativo- Defesa Antioxidante*

Radicais livres são definidos como moléculas que têm elétrons desemparelhados na órbita externa. Eles são geralmente instáveis e muito reativos (Fang *et al.*, 2002). Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em animais inclusive humanos, sob condições fisiológicas e patológicas. Radicais livres oxigenados podem ser convertidos a outras espécies reativas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipoclorídrico (HOCL), ácido hipobromico (HOBr) e peroxinitrito (ONOO⁻/ONOOH). Assim as EROs incluem espécies radicais e não radicais (Fang *et al.*, 2002). Por sua larga influência nos sistemas biológicos, as EROs têm despertado o interesse dos pesquisadores, que buscam evitar sua formação.

Radicais livres oxigenados são constantemente gerados *in vivo* para propósitos fisiológicos como, por exemplo, defesa contra microorganismos patogênicos. Em alguns casos são produzidos em excesso, quando isso acontece ocorre o estresse oxidativo. Algumas situações geradoras de estresse oxidativo incluem: ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por microorganismos, hiperóxia, alguns xenobióticos, radiação ionizante, isquemia e exercício físico extenuante (Yu, 1994; Pereira *et al.*, 1994). Esses radicais também estão envolvidos em diversas doenças: tumores, diabetes, infertilidade, gastrite e causam danos oxidativos no DNA, lipídeos e proteínas (Chen *et al.*, 2006).

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que todas as biomoléculas são susceptíveis a oxidação (Halliwell & Gutteridge, 1984). Para vencer o desafio dos radicais livres, os seres

aeróbicos desenvolveram mecanismos de proteção conhecidos como defesas antioxidantes, que podem ser compostos químicos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas intra e extracelularmente. No segundo caso, quando são expostos as EROs os organismos sintetizam proteínas (enzimas) antioxidantes como as superóxido dismutases, catalase e glutathiona peroxidase (Yu, 1994).

A manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de espécies reativas de oxigênio é de extrema importância para sobrevivência dos organismos. Assim os antioxidantes artificiais como os naturais têm um papel importante por atuarem na inibição dos radicais livres formados. A busca por antioxidantes naturais nos produtos vegetais tem sido intensificada nos últimos anos, por constituírem fontes naturais destas substâncias como a vitamina C, E, β -caroteno, fenóis e flavonóides. Vários óleos essenciais e componentes não voláteis presentes em diferentes espécies vegetais foram identificados como importantes agentes antioxidantes (Loliger, 1991; Weng & Wang, 2000).

2. *Plantas e compostos químicos naturais com atividade antioxidante*

O interesse pelos antioxidantes naturais teve início nos anos 80 mediante a comprovação de danos causados por doses elevadas de antioxidantes sintéticos usados nos alimentos como BHT (butil-hidroxitolueno), BHA (butil-hidroxianisol) e (t-butil-hidroquinona) sobre o fígado (Duran & Padilha, 1993).

Phyllanthus niruri, uma planta tipicamente nordestina, comumente conhecida como quebra-pedra é usada popularmente para eliminação de cálculos nos rins. Estudos demonstraram que extratos metanólicos e aquosos de folhas e frutos dessa espécie mostraram inibição da peroxidação lipídica da membrana celular, seqüestrando radicais livres frente ao DPPH e inibindo espécies reativas de oxigênio *in vitro*. A atividade antioxidante *in vivo* dos extratos foi verificada pela inibição da peroxidação lipídica, induzida pelo tetracloreto de carbono no fígado dos ratos (Harish & Shivanandappa, 2006).

Alcalóides da planta *Aconitum laeve* Royle foram isolados e estudados. Tais compostos demonstraram atividade antioxidante que foi verificada, calculando-se o percentual da atividade sequestrante de radicais livres frente ao DPPH (Shaheen *et al.*, 2005).

O extrato da casca de *Uncaria tomentosa* Willd. ex Roem. & Schult. DC. conhecida como unha-de-gato, planta medicinal muito popular no Peru evidenciou a capacidade de capturar radicais peróxido e superóxido e quantificação do total de taninos e compostos fenólicos totais. De acordo com os pesquisadores resultados sugerem que o extrato alcoólico tem alto potencial medicinal (Pilarski *et al.*, 2005).

A análise da atividade antioxidante do fruto de *Schinus terebenthifolius* Raddi foi calculada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico dos extratos alcoólicos e aquosos. A planta conhecida popularmente com aroeira do sertão é originária da América do Sul, especialmente do Brasil, possui um bom poder antioxidante em ambos os extratos, quando comparada aos poderes antioxidantes do BHT e BHA, antioxidantes sintéticos comumente usados. Esta planta é conhecida como tendo elevado teor de taninos (Degáspari *et al.*, 2004).

Diferentes componentes químicos são encontrados nas plantas *G. inodorum*, *P. sarmentosum* e *M. arvenses* como vitamina C, vitamina E, carotenos, xantofilas, taninos e outros compostos fenólicos, sendo estes relacionados com elevados índices antioxidantes. Os resultados sugerem que a atividade antioxidante dessas espécies pode ser atribuída à presença desses compostos químicos, principalmente vitamina E e xantofilas. Essas plantas são consideradas boas fontes de antioxidantes naturais (Chanwitheesuk *et al.*, 2005).

Compostos fitoquímicos que apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas recebem a denominação de compostos fenólicos e, geralmente apresentam propriedade antioxidante. Dentre eles desatacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e o tocoferol como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (Melo & Guerra, 2002).

Os flavonóides atuam como antioxidantes primários reagindo com os radicais livres, e também como quelantes de metais. Flavonas e flavonóis são as duas principais classes de flavonóides encontradas universalmente na natureza. Os mais comuns flavonóis antioxidantes são canferol, quercetina e miricetina (Harborne & Williams, 2000). A figura abaixo mostra as estruturas de flavonóides antioxidantes.

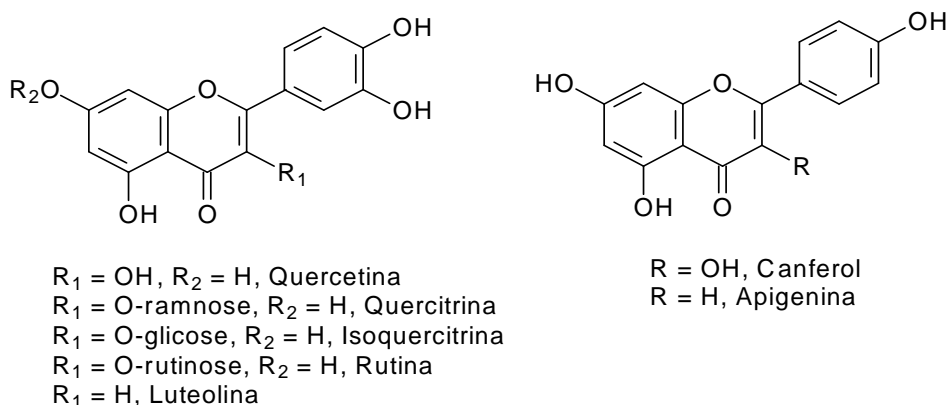


FIGURA 1. Flavonóides com atividade antioxidante

Os principais componentes químicos presentes nas folhas da alcachofra, *Cynara scolymus*, são os ácidos fenólicos, flavonóides e sesquiterpenos. A cinarina (ácido monocafeoilquínico) é relatada como princípio ativo antioxidante da planta (Noldin *et al.*, 2003). Vários estudos biológicos com extratos brutos e purificados de alcachofra, realizados tanto em animais quanto em humanos, demonstraram atividades antioxidantes.

O extrato etanólico das folhas de *Nectandra grandiflora*, planta existente na mata Atlântica do Brasil, mostrou atividade antioxidante no teste com o β -caroteno. O fracionamento do extrato resultou no isolamento de dois flavonóides glicosilados 3-O- β -ramnosilcanferol e 3-O- β -ramnosilquercetina os quais exibiram atividade seqüestradora de radicais livres frente ao DDPH, maiores quando comparados aos antioxidantes conhecidos como a rutina e o BHT (Ribeiro *et al.*, 2005).

Os ácidos fenólicos são importantes agentes antioxidantes encontrados freqüentemente nas plantas na forma de ésteres, como também podem existir na forma de glicídios livres ou ligados a proteínas e raramente como ácidos livres. No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos (compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático) destacam-se protocateuúico, vanílico, sirínico, gentísico, salisílico, elágico e gálico (Harborne & Williams, 2000).

Vegetais ricos em compostos fenólicos por serem tradicionalmente consumidos como alimentos, são considerados seguros, tanto pelos consumidores como pela indústria de alimentos. Constatação que, no entanto não garante a sua inocuidade, requerendo, portanto estudos toxicológicos sobre estes compostos fitoquímicos (Melo & Guerra, 2002).

3. Lesão gástrica x Gastroproteção

As lesões gástricas ocorrem devido a um desequilíbrio entre fatores ofensivos e fatores defensivos (Sairam *et al.*, 2002). O dano é provocado quando a mucosa perde a habilidade de proteger-se através das secreções de bicarbonato e muco, bem como, de promover uma nova epitelização (Boothe, 1999). A difusão de retorno do ácido luminal para a mucosa é crucial na patogênese da lesão. A ação tóxica de muitos agentes endógenos e exógenos pode alterar os mecanismos de defesa, aumentando deste modo a permeabilidade da mucosa ao ácido (Twedt & Magne, 1992). Com o aumento da entrada de ácido, ocorre uma cadeia de eventos, começando com lesão direta da mucosa e seguindo por destruição da submucosa (Liptak *et al.*, 2002). Os mastócitos na submucosa e lâmina própria desgranulam e liberam histamina quando em contato com o ácido. A histamina liberada estimula a secreção celular parietal de ácido clorídrico, assim como inflamação local e edema agudo. O ácido pode ainda lesionar vasos sanguíneos e estimular nervos da parede gástrica, provocando contrações musculares exacerbadas (Twedt & Magne, 1992).

A reconstrução epitelial é extremamente importante na manutenção da estrutura e funcionamento da barreira mucosa. A formação dos radicais livres, as citocinas inflamatórias e o estresse fisiopatológico reduzem a taxa de proliferação celular dificultando o processo de reconstrução das células gástricas. Por outro lado, o epitélio gástrico é recoberto por um espesso muco que impede a retrodifusão dos íons H^+ . O rompimento da barreira mucosa pelo refluxo de bile, uremia, aspirina e outros antiinflamatórios não esteroidais aumentam a permeabilidade da mucosa e permitem a retrodifusão do íon H^+ , aumentando a acidose tecidual (Beejay & Wolfe, 2000). Alteração no fluxo sanguíneo da mucosa é outro fator de grande importância na gênese das injúrias gástricas. O fluxo sanguíneo pode ser severamente alterado por ação de drogas, como o ácido acetil salicílico, etanol e pela entrada de agentes luminiais, como ácido e pepsina (Robbins, 1998). A cicatrização das lesões fica comprometida devido à redução do fluxo sanguíneo na mucosa causada por estes agentes (Boothe, 1999).

Outro fator envolvido na lesão gástrica é o refluxo do conteúdo duodenal que ocorre levando a exposição da mucosa à pepsina e aos ácidos biliares, destruindo a barreira mucosa e provocando a formação dos radicais livres que levam a lesão oxidativa da mucosa e rompimento microvascular pela ativação do fator anti-plaquetário, do fator de necrose tumoral (α -TNF) e das interleucinas (Beejay & Wolfe, 2000).

Úlceras provocadas por estresse são devido a fatores psicológicos e fisiológicos (Miller, 1987). O estresse induz a peroxidação lipídica a partir do aumento dos níveis de peroxidase lipídica. A consequência desse processo é o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio ocasionando, conseqüentemente, dano oxidativo que é o fator comum na patogenia clínica de úlcera (Goel, 1991; Sairam *et al.*, 2002).

Espécies reativas de oxigênio EROs têm mostrado exercer um papel crítico no processo ulcerogênico (Das *et al.*, 1997). O papel das EROs no desenvolvimento da patogênese da lesão experimental gástrica aguda induzida por estresse, etanol e drogas anti-inflamatórias não esteroidais é bem documentada (Das *et al.*, 1997; Isenberg *et al.*, 1995).

Estudos experimentais têm demonstrado que a geração de radicais livres está associada à patogênese de lesões gástricas agudas induzidas por etanol. Os radicais livres medeiam à injúria no tecido estimulando a peroxidação dos lipídios, provocando danos na membrana celular através da coagulação de proteínas, lipídios e ácidos nucléicos. As lesões histopatológicas mais evidenciadas são congestões, edema, hemorragia, erosão e necrose (Al-Shabanah *et al.*, 2000; La Casa *et al.*, 2000). Em condições fisiológicas de equilíbrio, a concentração do íon (H^+) no lúmen é muitas vezes maior do que na lâmina própria, e ocorrem alguns mecanismos que evitam a difusão da volta do íon para os tecidos ao redor. Um deles é a resistência elétrica da membrana celular apical e os complexos juncionais da área glandular gástrica própria que são extremamente altos. A resistência mais o potencial elétrico negativo do lúmen restringem o movimento passivo do íon H^+ .

Outro mecanismo utilizado pelo organismo é secreção de muco pelas células superficiais e colo gástrico em resposta a Ach (acetilcolina) e estimulação mecânica para formação de uma camada adjacente á mucosa. Outra maneira são os íons bicarbonato que são secretados pela superfície epitelial e se tornam retidos no gel mucoso. A barreira epitelial gástrica composta por fosfolipídeos ativos, lipoproteínas, da membrana celular também previnem o retorno por difusão do íon H^+ (Boothe, 1999).

Outros mecanismos de defesas que previnem e reparam os danos da mucosa gástrica são os fluxos sanguíneos da mucosa que promovem o fornecimento de nutrientes e oxigênio para as células, removendo os íons H^+ que penetram na barreira, por replicação das células epiteliais da mucosa e a produção de citoprotetores (Boothe, 1999).

A prostaglandina um produto do metabolismo do ácido araquidônico é produzida pela mucosa gástrica, aumenta na presença de agentes irritantes, e apresenta um papel citoprotetor

importante, inibindo a secreção ácida por reduzir a produção celular do monofosfato de adenosina (AMP) (Beejay & Wolfe, 2000).

4. Plantas medicinais e compostos químicos com atividade gastroprotetora

Muitas espécies vegetais são utilizadas na medicina popular, principalmente no Nordeste brasileiro, por apresentar ação antiácida e antiulcerogênica. Porém, o uso e a comercialização dessas espécies vegetais têm precedido à avaliação farmacológica e toxicológica (Alkofahi & Atta, 1999).

As atividades antiulcerogênicas de várias plantas vêm sendo estudadas. A espécie *Maytenus truncata* Reiss é uma planta nativa da Bahia, conhecida como “espinheira santa”. Suas folhas são usadas popularmente na forma de chá para tratamento de úlcera gástrica. Experimentalmente a administração de extratos brutos reduziu a severidade de úlcera gástrica induzida pelo estresse ao frio em ratos, com resultados mais significativos para o extrato metanólico (Silva *et al.*, 2005).

Segundo Markman *et al.*, (2004) a *Campomasia xanthocarpa*, conhecida no Brasil por “gabirola”, é usada no tratamento preventivo de doenças gástricas. A administração oral do extrato hidroalcoólico das folhas (400mg/kg) mostrou ser efetiva na prevenção de úlcera gástrica, em ratos, não produzindo efeito tóxico em doses superiores a 5 mg/kg.

Resultados experimentais de extrato clorofórmico de *Tanacetum larvatum* administrado em ratos na dose de 50mg/kg, mostraram ter um efeito promissor no tratamento de doenças inflamatórias e também efeito gastroprotetor (Petrovic *et al.*, 2003).

Os efeitos adversos de drogas sintéticas usadas nos tratamentos de úlceras têm estimulado pesquisas que visam ao isolamento de princípios ativos diferentes, obtidos a partir de plantas medicinais (Alkofahi & Atta, 1999; Gonzalez *et al.*, 2000). A atividade gastroprotetora das plantas medicinais pode ser atribuída a diversos compostos químicos isolados de muitas espécies vegetais como flavonóides, esteróides, terpenóides e as saponinas sendo alguns exemplos de substâncias químicas que apresentam atividade protetora da mucosa gástrica (Souccar, 2002).

Estudos demonstraram que os alcalóides pirrolizidínicos senecionina, integerrimina, retrorsina, usaramina e sencifilina extraídos de folhas e de inflorescências de *Senecio brasiliensis*, conhecida popularmente no Sul e Sudeste do Brasil por “Flor das almas”, “Margaridinha” ou Maria-Mole, tiveram efeito significativo no tratamento de doenças

ulcerogênicas em modelo selecionado de úlcera, confirmando assim sua utilização popular no tratamento de dores no estômago (Toma *et al.*, 2004).

A *Byrsonima crassa* Niedenzu (Malpigheaceae), planta utilizada na medicina popular no Brasil para tratar a maior parte de doenças relacionadas ao aparelho digestivo, teve seu efeito gastrotrotetor comprovado em modelo experimental de úlcera induzida pela associação de ácido clorídrico e etanol a partir de extratos hidrometanólico, metanólico e clorofórmico de suas folhas. Essa planta contém compostos fenólicos como quercetina e catequina, que podem explicar o efeito ulceratogênico nestes extratos (Sannorniya *et al.*, 2005).

Solução hidro-alcoólica de aroeira do sertão (*Astronium urundeuva* (Allemão) Engl.) vem sendo usada pela população nordestina no tratamento de problemas gástricos como úlcera e gastrite. Estudos de Rao *et al.* (1987) demonstraram sua ação anti-ulcerogênica.

Desordens do sistema digestivo são tratadas usando várias espécies de *Plectranthus*. Algumas espécies são usadas para tratar dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia, infecções da boca e de garganta e também como purgantes, carminativos e como anti-helmínticos. As espécies mais frequentemente usadas são *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus amboinicus* para tratar uma larga variedade de problemas digestivos. Por exemplo, *Plectranthus barbatus* é usado para o tratamento de dor de estômago e como um purgante (Lukhoba *et al.*, 2006). Recentemente foi descrita a inibição da enzima gástrica H^+,K^+ -ATPase pela plectrinona A, um diterpenóide isolado de *Plectranthus barbatus* Andrews (Schultz *et al.*, 2006).

Muitas plantas têm demonstrado atividade de proteção gastrointestinal, mas o mecanismo gastrotrotetor envolvido até hoje continua, na maioria das espécies estudadas, uma incógnita.

5. Modelos de lesão gástrica para a avaliação da atividade gastrotrotetora de plantas

Os modelos experimentais de indução de lesões gástricas atuam por diferentes mecanismos ulceratogênicos e representam o primeiro passo para determinar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastrotrotetora de substâncias ou plantas medicinais (Hiruma-Lima *et al.*, 2000).

A atividade anti-úlcera de uma substância desconhecida pode ser determinada em animais experimentais frente a três modelos agudos: indução de lesões gástricas por medicamentos (ácido acetilsalicílico ou indometacina), indução de lesões gástricas por estresse, ou indução de lesões gástricas por etanol. Tais modelos são os mais utilizados porque

representam os agentes etiológicos mais comuns envolvidos na patologia das úlceras gástricas. No entanto a importância das lesões agudas na espécie humana é pequena comparada às lesões crônicas rescidivantes. É importante verificar, portanto, a atividade da droga em um modelo crônico como das lesões gástricas induzidas por ácido acético (Lapa *et al.*, 1999).

6. *Produtos naturais com atividade antioxidante x atividade gastroprotetora*

Na medicina tradicional, várias plantas e ervas têm sido usadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais incluindo gastrites e úlceras pépticas (Singh & Majumbar, 1999). *Usnea longíssima* empregada no tratamento de úlceras na medicina popular de várias cidades do mundo é conhecida devido a sua atividade antiulcerogênica e antioxidante. O efeito antiulcerogênico do extrato aquoso obtido da espécie *Usnea longíssima* foi investigado usando-se o modelo de úlcera induzido por indometacina, em ratos, onde se observou efeito protetor contra úlceras, ao quais seus autores atribuíram ao potencial antioxidante da mesma (Halici *et al.*, 2005).

Rhizophora mangle é amplamente utilizada na medicina popular do Caribe, devido a mesma possuir atividades antisépticas, antifúngicas dentre outras. Estudos evidenciaram efeito gastroprotetor em úlceras experimentais induzida por diclofenaco quando comparado com inibidor da bomba de prótons (omeprasol). O extrato da planta foi administrado por via oral (gavage) e depois utilizado o diclofenaco. O pré-tratamento com o extrato resultou numa significativa diminuição nas áreas ulceradas. O estudo sugere que *Rhizophora mangle* induz a recuperação dos níveis da prostaglandina, na qual é depletado pelo diclofenaco. Esses resultados sugerem que o efeito gastroprotetor da planta nesse modelo de úlcera experimental, aparece através da dose dependente de prostaglandina e a atividade antioxidante (Berenguer *et al.*, 2005).

Bafna & Balaraman (2005) atribuíram à substância pepticare, originada de plantas tais como *Glycyrrhiza glabra*, *Emblica officinalis* e *Tinospora cordifolia* o efeito cicatrizante de úlceras e as relacionam possivelmente a sua atividade antioxidante.

Segundo Hodek *et al.*, (2002) as propriedades antioxidantes de flavonóides e taninos são relacionados com suas atividades antiulcerogênicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os animais que são mantidos em áreas de altas concentrações demográficas por m² acarretando competição por espaço, alimento e água, além de permanecerem em condições climáticas desconfortáveis, estão sujeitos a doenças de diversas origens. O uso de plantas como fitoterápicos em animais de produção sujeitos ao estresse, devido ao sistema intensivo de criação, poderia acarretar benefícios ainda não explorados.

Os usos de aditivos antioxidantes podem atuar no organismo como um todo, protegendo as mucosas da ação de radicais livres, inclusive o epitélio gástrico e intestinal protegendo assim as mucosas, promovendo uma melhoria na absorção dos nutrientes e conseqüentemente um maior ganho de peso. A descoberta de constituintes oriundas de plantas que possam ser utilizados como aditivos para rações ou fitoterápicos, é de grande importância para o crescimento da indústria pecuária tanto no sentido econômico como no sentido de saúde das pessoas que se alimentam da carne desses animais, evitando assim o uso de medicamentos sintéticos. Nesse contexto as plantas medicinais têm surgido como uma alternativa tanto para o tratamento de patologias e/ou aditivos que são adicionados às rações com o objetivo de modificar o estado de saúde animal, prevenindo-os contra uma série de doenças que provocam perdas econômicas ao produtor como também uma melhora na qualidade de vida animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKOFAHI, A.; ATTA, A.H. Pharmacological Screening of the Anti-ulcer Effects of some Jordanian Medicinal Plants in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.67, n.2, p. 341-5, 1999.
- Al-SHABANAH, O.A. et al. Effect of ninhydrin on biochemical and histopathological changes induced by ethanol in gastric mucosa of rats. **Life Sciences**, v.67, n.5, p. 559-66, 2000.
- BAFNA. P.A.; BALARAMAN, R. Anti-ulcer and antioxidant activity of Pepticare herbomineral formulation. **Phytomedicine**, v.12, n.4, p.264-70, 2005.
- BEEJAY, U.; WOLFE, M.M. Acute gastrointestinal bleeding in the intensive care unit. The gastroenterologist's perspective. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.29, n.2, p.309-36, 2000.
- BERENGUER, B. et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, n.2, p.194-200, 2006.
- BOOTHE, D.M. Gastrointestinal Pharmacology. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.29, n.2, p.343-76, 1999.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v.92, n.3, p.491-7, 2005.
- CHEN, F.A. et al. Evaluation of the activity of *Ruellia tuberosa*. **Food Chemistry**, v.94, n.1, p.14-8, 2006.
- DAS, D. et al. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. **Free radical Biology and Medicine**, v.23 p.8-18, 1997.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R.J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Visão acadêmica**, v.5, n.2, p.83-90, 2004.
- DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. 1.ed. Campinas: André Tosello, 1996. 10p.
- DURAN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y aceites**, v.44, n.2, p.101-6, 1993.
- FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, p.18, 872-9, 2002.
- GOEL, R.K.; BHATTACHARYA, S.K. Gastroduodenal mucosal defense and mucosal protective agents. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.29, n.8, p.701-14, 1991.

- GONZALES, E. et al. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.3, p.329-33, 2000.
- HALICI, M. et al. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. **Phytomedicine**, v.12, n.9, p.656-62, 2005.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Journal of Biochemistry**, v.291, n.1, p.1-14, 1984.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n.6, p. 481-504, 2000.
- HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, v.95, n.22, p.180-5, 2006.
- HIRUMA-LIMA, C.A. et al. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphobiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, n.3, p. 229-34, 2000.
- HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-biological Interactions**, v.139, n.1, p.1-21, 2002.
- ISENBERG, J.I. et al. Acid peptic disorders. 2.ed. In:Lippincott, J.B. (Eds)Yamada's Text Book gastroenterology. Philadelphia, p.1347-1430.1995.
- LA CASA, C. et al. Evidence for protective and antioxidante properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1-2, p.45-53, 2000.
- LAPA, A.J. ET AL.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R. O.; DE LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1.ed. Porto Alegre: UFRGS/ UFSC, 1999. p.181-96.
- LIPTAK, J.M. et al. Gastroduodenal ulceration in cats: eight cases and a review of the literature. **Journal of feline Medicine and Surgery**, v.4, n.1, p. 27-42, 2002.
- LOLIGER, J. The use of antioxidant in food. In: AUROMA, O.I.; HALLIWEL, B. (Ed.). **Free radicals and food additives**. London: Taylor & Francis, 1991. 121p.
- LUKHOBÁ, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. Plectranthus: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, n.11, p.1-24, 2006.

- MARKMAN, O.E.O.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.55-7, 2004.
- MELO, A.E.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim SBCTA**, v.36, n.1, p 1-11. 2002.
- MILLER, T.A. Mechanism of stress-related mucosal damage. **The American Journal of Medicine**, v.83, n.6, p.8-14, 1987.
- NOLDIN, V.F. et al. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (artichoke) cultivated in Brazil. **Química Nova**, v.26, n.3, p.331-4, 2003.
- PEREIRA, B. et al. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in immune organs and muscles of sedentary and exercised trained rats. **Physiology & Behavior**, v.56, n.5, p.1095-9, 1994.
- PETROVIC, S.D. et al. Evaluation of *Tanacetum larvatum* for anti-inflammatory activity and for the protection against indomethacin-induced ulcerogenesis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, n.1, p.109-13, 2003.
- PILARSKI, R. et al. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.14, n.1-2, p.18-23, 2005.
- RAO, V.S. et al. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. II. Aqueous extract. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.20, p.803-805, 1987.
- RIBEIRO, A. B. et al. A New neolignan and antioxidant Phenol from *Nectandra grandiflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.3, p.526-30, 2005.
- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Pathologic Basics of disease**, 6.ed. New York: W.B. Saunders Company, 1998. 1425 p.
- SAIRAM, K. et al. Antiulceratogenic effect of methanolic extract of *Embllica officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n.1, p.1-9, 2002.
- SANNORNIYA, M. et al. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.1, p.1-6, 2005.
- SHAHEEN, F. et al. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatry, antioxidant and tyrosinase inhibition activities. **Phytochemistry**, v. 66, n.8, p. 935-40, 2005.
- SCHULTZ, C. et al. Inhibition of the gastric H⁺,K⁺-ATPase by plectrinone A, a diterpenoid isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.1, p.1-7, 2006.

- SILVA, J.L. et al. Avaliação da atividade antiulcerogênica *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). **Brazilian Journal of Ethnopharmacology**, v.15, n.1, p.30-5, 2005.
- SINGH, S.; MAJUMDAR, D.K. Evaluation of the gastric anti-ulcer activity of fixed oil of *cimum sanctum* (Holy Basil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n.1, p.13-19. 1999.
- SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J. Métodos utilizados para validação de plantas medicinais com atividade gastrointestinal. In: XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Cuiabá-MT, 2002, 32p.
- TOMA, W. et al. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, n.1-2, p.345-51, 2004.
- TWEDT, D.C.; MAGNE, M.L. Moléstia do estômago. In: ETTINGER, J. S. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3.ed. São Paulo: Manole, 1992, p.1353-1386.
- WENG, X.C.; WANG, W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. **Food Chemistry**, v.71, n.44, p.489-93, 2000.
- YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n.1, p.139-62, 1994.

CAPÍTULO 2

Efeito Gastroprotetor do extrato das folhas de *Byrsonima sericea* DC. contra lesões gástricas induzidas por etanol: potenciais mecanismos

Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC. leaf extract against ethanol-induced gastric injury: potential mechanisms

Periódico: Phytomedicine

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology

Submetido em outubro de 2008

Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC. leaf extract against ethanol-induced gastric injury: potential mechanisms

P. de A. Rodrigues^a, S. M. Morais^{a,b*}, C. M. de Souza^c, L. A. Aguiar^b, D. V. Magalhães^a, Í. G. P. Vieira^b, G. M. de Andrade^c, V. S. Rao^c, F. A. Santos^c

^a*Pos Graduate Program of Veterinary Sciences, Veterinary Faculty, State University of Ceará, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil*

^b*Natural Products Chemistry Laboratory, Technology Center, State University of Ceará, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil*

^c*Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, P.O. Box-3157, 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil*

*Corresponding author:

Rua Ana Bilhar N^o 601, Apto. 400, Meireles, CEP 60160-110, Fortaleza, Ceará, Brazil

Fax: + 55- 85- 3242-2793, E-mail address: selene@uece.br

Resumo

Folhas de *Byrsonima sericea* (Malpighiaceae) são largamente utilizados na medicina popular contra doenças gástricas. Este estudo investigou atividade do potencial gastroprotetor do extrato etanólico das folhas de *B. sericea* (BSLE) com possível mecanismo de ação usando o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto (0,2 mL / animal, p.o.) em camundongos. Análises fitoquímicas foram realizadas para identificar os componentes ativos presentes no extrato. BSLE em doses orais de 125, 250, 500 e 1000 mg / kg atenuaram significadamente lesões gástricas provocadas pelo etanol, inibindo 53,2, 86,5, 80,8 e 90,2%, respectivamente. O extrato da planta (250 mg / kg) foi capaz diminuir significativamente o dano induzido pelo etanol, e restaurar as atividades gástricas da superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT), diminuir a depleção de muco gástrico e dos grupos sulfidrílicos-não-protéico (NP-SH/GSH) e impedir o aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) promovidas pelo etanol absoluto, sugerindo um mecanismo antioxidante no efeito gastroprotetor. O pré-tratamento com o antagonista dos receptores TRPV1 capsazepina, bloqueou o efeito gastroprotetor de BSLE. O efeito do BSLE (250 mg / kg) no dano produzido pelo etanol foi significativamente reduzido em camundongos pré-tratados com capsazepina, L-NAME, ou glibenclamida, os respectivos bloqueadores / potenciais inibidores dos receptores vaniloide 1 (TRPV1), da óxido nítrico sintetase e ativadores dos canais de potássio dependentes de ATP. Investigações fitoquímicas do BSLE revelaram a presença de flavonóides, quercetina; isoquercetrina; rutina e kaempferol 3-O-rutinosídeo, substâncias conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes e gastroprotetora. Estes resultados em conjunto permitem concluir que BSLE oferece gastroproteção, por meio de vários mecanismos, que pode ser útil na disfunção associada a patologias gástricas.

Palavras chave :*Byrsonima sericea*; Gastroproteção; Etanol; Antioxidante; Óxido nítrico; Canais de K^+_{ATP}

Abstract

Byrsonima sericea (Malpighiaceae) leaves are extensively used in folk medicine against gastric ailments. This study investigated the *B. sericea* leaf ethanolic extract (BSLE) for potential gastroprotective activity with the possible mechanism using the absolute ethanol (0.2 mL/animal, p.o.)-induced gastric mucosal damage in mice as a model system. Phytochemical analysis was carried out to identify the active constituents present in the extract. BSLE at oral doses of 125, 250, 500 and 1000 mg/kg markedly attenuated the ethanol-evoked gastric lesions by 53.2, 86.5, 80.8 and 90.2 %, respectively. The plant extract (250 mg/kg) was able to significantly restore the ethanol-induced decreases in the activities of gastric superoxide desmutase (SOD) and catalase (CAT), and diminish the depletion of gastric mucus, non-protein-sulfhydryls (NP-SH/GSH) and the increase in thiobarbituric acid reactive species (TBARS) promoted by absolute ethanol, suggesting an antioxidant mechanism in its gastroprotective effect. The pretreatment with TRPV1 antagonist capsazepine blocked the gastroprotective effect of BSLE. The BSLE (250 mg/kg) effect against ethanol damage was found to be significantly reduced in mice pretreated with capsazepine, L-NAME, or glibenclamide, the respective blockers/inhibitors of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), nitric oxide synthase and K^+ _{ATP} channel activation. Phytochemical investigation on BSLE revealed the major presence of flavonoids, quercetin; isoquercetrin; rutin and kaempferol 3-O-rutinoside, substances well known for their antioxidant and gastroprotective properties. Taken together, these results allow us to conclude that BSLE affords gastroprotection through multiple mechanisms, which may be helpful in abrogation of gastric dysfunction associated pathologies.

Keywords: *Byrsonima sericea*; Gastroprotection; Ethanol; Antioxidant; Nitric oxide; K^+ _{ATP} channels

Introduction

Plants of the genus *Byrsonima* (Malpighiaceae) are widely distributed to various parts of Brazil where local people call them as murici. Leaves and trunk bark from various species *Byrsonima* are popularly employed in folk medicine to treat fever, gastrointestinal dysfunction (diarrhoea and gastric ulcer), asthma, skin infections, and snakebites (Mendes et al., 1999; Lira et al.,

2008). While chemical investigations on various *Byrsonima* species have shown the presence of several bioactive compounds like flavonoids, triterpenes and tannins (Béjar and Malone, 1993; Geiss et al., 1995; Martinez-Vázquez et al., 1999; Mendes et al., 1999), bioactivity studies demonstrated the gastroprotective, healing and antidiarrheal activities of *B. fagifolia* (Lima et al., 2008), antimutagenic activity of *B. basiloba* (Lira et al., 2008), mutagenic and gastroprotective effects of *Byrsonima crassa* (Sannomiya et al., 2007; Cardoso et al., 2006) and the antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (Martinez-Vázquez et al., 1999). The presence of phenolic compounds possibly explains the gastroprotective effect of the extracts of *Byrsonima* species.

Byrsonima sericea DC., also popularly known as *murici* that grows abundantly in the Northeastern states of Brazil, is traditionally used to treat gastrointestinal dysfunction. An antioxidant activity of the methanolic extract from *B. sericea* has recently been described, using the DPPH assay (Boscolo et al., 2007). To our knowledge there were no scientific studies in literature on *B. sericea* extracts in relation to the gastrointestinal activity. Since antioxidants can afford gastroprotection both in clinical and experimental settings, the present study was aimed to evaluate the *Byrsonima sericea* DC. leaf extract (BSLE) for potential gastroprotection and the underlying mechanism using the ethanol-induced gastric damage in mice as a model system. In addition, phytochemical analysis of the extract was carried out to identify the chemical compounds probably responsible for the plant is protective action.

Materials and Methods

Plant material and extract preparation

Byrsonima sericea DC. (Malpighiaceae) leaves were collected from State University of Ceará campus, Ceará, Brazil, in December of 2006, after its identification by Dr. Afrânio G. Fernandes, botanist of the Federal University of Ceará. A voucher specimen (39.451) has been deposited at Herbarium Prisco Bezerra.

Fresh leaves (1.24 kg) were macerated with 70% alcohol at room temperature for 7 days. The resultant extract was filtered and evaporated to dryness at 40 °C in a vacuum rotary evaporator to yield 153 g of crude ethanolic extract. The concentrated extract was then submitted for further extraction process using a low pressure silica gel chromatographic column with hexane, ethyl acetate and ethanol. These solvent solutions on evaporation gave three extracts weighing

1.1, 5.6 and 126.2 g, respectively. Only the ethanolic extract (BSLE) was utilised in the present work.

Phytochemical analysis

BSLE was analyzed for the presence of phenols, tannins, leucoantocyanidins, flavonoids, steroids, triterpens and alkaloids by qualitative chemical analysis (Matos, 1997).

HPLC analysis

The HPLC system (Waters 2690 Alliance) was connected to a Waters 486 tunable absorbance, column detector (Waters C18, 3.9 X 150mm X 4um). The analysis was run under isocratic conditions using the solvent mixture: 80:20 (ACN: H₂O, pH 2.8 phosphoric acid); flow rate: 1 mL/min, 20 µL; and temperature: 21°C. Quercetin, quercetin 3-O-glycoside, quercetin 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-rutinoside, used as standards for comparison, were isolated from *D. gardneriana* and characterized by spectroscopic methods. The concentration for the extract and standards was 1 mg/mL, the injection volume was 30 µL and the eluted was monitored at 350 nm.

Chemicals

Capsaicin, capsazepine, glibenclamide, diazoxide, L-arginine, N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Absolute ethanol was obtained from Synth (Brazil). Quercetin, quercetin 3-O-glycoside (isoquercetrin), quercetin 3-O-rutinoside (rutin) and kaempferol 3-O-rutinoside isolated from the flowers and leaves of *Dimofhandra gardneriana*, were used as standards. All other chemicals used were of analytical grade.

Animals

Female Swiss mice (20-25g) obtained from the Central Animal House of this University were used. Experimental groups consisted of 8 animals per group. They were housed at 24 ± 2°C under a 12-h light/12-h dark cycle and had free access to standard pellet diet (Purina chow) and tap water. The animals were deprived of food for 15 h before experimentation, but had free access to drinking water. The Institutional Ethics Committee on the Care and Use of Animals

for experimentation approved the experimental protocols, and all experiments were performed in accordance with the guidelines of National Institute of Health, Bethesda, USA.

Gastric damage induced by ethanol

Groups of mice (n=8), were pre-treated with the vehicle (0.9% saline in a 0.5% of DMSO, 10mL/kg), N-acetylcysteine (NAC) (150 mg/kg, i.p.) or BSLE (125, 250, 500 and 1000 mg/kg, p.o.) 1 h before the induction of gastric damage by oral administration of absolute ethanol (0.2 mL/animal) (Robert *et al.*, 1979). After 25 min, the animals were sacrificed, the stomachs excised, opened along the greater curvature, rinsed with saline (0.9%) and the mucosal lesion area (mm²) was measured by planimetry using a transparent grid (area: 1mm²) placed on the glandular mucosal surface and was expressed in percentage (%) in relation to total area of corpus. After evaluating of the lesions induced by ethanol, the glandular parts of the stomachs were frozen and stored at -70 °C for further biochemical analyses.

Estimation of anti-oxidant parameters

Gastric strips were cut into small pieces and then homogenized in ice-cold 50 mM Phosphate buffer pH 7.4 to give 10% homogenate. The homogenate was then made into aliquots and used for the assessment of anti-oxidant parameters. The gastric lipid peroxidation was determined by measuring of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) using the method described by Ohkawa *et al.* 1979. Superoxide dismutase (SOD) activity was assessed according to the method of Beauchamp and Fridovich (1971) through measurement of the enzyme capacity for photochemical inhibition of nitroblue-tetrazolium (NBT). Catalase (CAT) activity was measured by the method that employs hydrogen peroxide to generate H₂O and O₂ (Maehly and Chance, 1954). The protein concentrations were determined by the Bradford (1976). The non proteic sulphidrylic groups (NP-SH) were determined according to the method described by Sedlak and Lindsay, 1968.

Role of TRPV1 channel in the gastroprotective effect of BSLE

Groups of mice (n=8) were pretreated with vehicle (0.9% saline in a 0.5% of DMSO, 10mL/kg), BSLE (250 mg/kg, p.o.) and capsaicin (0.3 mg/kg, p.o.), alone, or in their combinations with capsazepine (5 mg/kg, i.p.) prior to the oral administration of 0.2 mL of

ethanol (96%). When given alone, BSLE and capsaicin were administered 1h before ethanol. Capsazepine was administered 30 min prior to ethanol.

Role of nitric oxide in the gastroprotective effect of BSLE

Mice (n=8) were pretreated with vehicle (0.9% saline in a 0.5% of DMSO, 10 mL/kg), BSLE (250 mg/kg, p.o.), L-arginine (400 mg/kg, i.p.) alone, or in their combinations with L-NAME (20 mg/kg, i.p.) prior to induction of gastric damage with ethanol (0.2 mL of ethanol, 96%). While BSLE was administered 1h before, L-NAME and L-arginine, were given 30 min prior to ethanol.

Role of K_{ATP} -channels in the gastroprotective effect of BSLE

Mice (n=8) were pretreated with vehicle (0.9% saline in a 0.5% of DMSO, 10 mL/kg), BSLE (250 mg/kg, p.o.), diazoxide (3 mg/kg, i.p.) alone, or in their combinations with glibenclamide (5 mg/kg, i.p.) prior to the oral administration of 0.2 mL of ethanol (96%). BSLE was given 1h before, whereas diazoxide was administered 30 min prior to ethanol or glibenclamide. Glibenclamide was administered 30 min before BSLE.

Determination of gastric mucus

The determination of mucus in gastric content was performed according to the methodology described by Corne et al., 1974. The gastric tissues were transferred to 0.1% Alcian Blue solution prepared in 16 mM sucrose and 50 mM sodium acetate (pH 5.8) and stained for 2 h at room temperature. The segments were then rinsed twice with 25 mM sucrose solution for 15 and 45 min, and the dye, together with the gastric mucus with 5 mM magnesium chloride solution was extracted for 2 h. The extract was then mixed with equal volume of diethyl ether and centrifuged at 3600 rpm for 10 min. Absorbance was determined at 598 nm. The amount of mucus was calculated using a standard curve of Alcian Blue.

Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm S.E.M. of 8 animals per group. Statistical analysis was carried out using one way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman Keul's post hoc test for multiple comparisons. *P*-values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of statistical significance.

Results

The qualitative phytochemical analysis of BSLE revealed the presence of flavones, flavonols, flavanones, xanthonenes and hydrolyzable tannins. The filtered ethanol extract of *B. sericea* was injected under the cited conditions (Fig. 1), as well as a mixture of authentic samples of rutin, isoquercitrin, kaempferol 3-O-rutinoside and quercetin (Fig. 2). The phenolic compounds were identified by comparing the authentic chromatographic standards obtained from *D. gardneriana*. The purity of each identified peak in Fig. 1 was determined by comparing with the UV spectra available at the HPLC computer library. For 1240 g of fresh leaves, each flavonoid content was evaluated in relation to a quercetin standard curve: isoquercitrin: 504 mg, quercetin: 12.6 mg, rutin: 25.4 mg and kaempferol 3-O-rutinoside: 254 mg.

The oral administration of BSLE (125, 250, 500 and 1000 mg/kg) exhibited a dose-unrelated protective effect against ethanol-induced gastric lesions and compared to vehicle group, the extent of inhibitions for the respective doses employed were 53.2, 86.5, 80.8 and 90.2 %. NAC, the positive control included for the study also offered significant protection (Table 1).

The animals that received ethanol alone showed a significant decrease in gastric catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and NP-SH levels and a significantly elevated TBARS level (Table 2). Pretreatment with BSLE (250 mg/kg) effectively decreased the ethanol associated increase in TBARS (67.76 ± 7.5 nmol/g tissue). Almost to a similar extent NAC (150 mg/kg) also inhibited the increase of TBARS (62.1 ± 6.96 nmol/g tissue) produced by the ethanol (Table 2). BSLE (250 mg /kg) treated animals showed significantly enhanced activities of the antioxidant enzymes SOD and CAT.

The NP-SH level seen in gastric mucosa of normal control mice (280.1 ± 12.7 μ g/g) was significantly lowered by ethanol (102.3 ± 10.4 μ g/g) treatment (Table 2). At the doses employed, both BSLE and NAC largely replenished the NPSH depleted by ethanol (239.5 ± 6.5 μ g/g).

In mice pretreated with vanilloid antagonist capsazepine, the gastroprotective effect of BSLE (250 mg/kg) and capsaicin (0.3 mg/kg, p.o.) were significantly reduced (Fig. 4A). These data indicate that the gastroprotective effect of BSLE is mediated by activation of capsaicin-sensitive primary afferents.

L-NAME (20 mg/kg, i.p.) pretreatment significantly blocked the gastroprotection produced by BSLE and L-arginine (400 mg/kg, i.p.), suggesting the participation of NO (Fig.4B) on BSLE gastroprotection. Pretreatment with K⁺_{ATP} channel blocker, glibenclamide (5 mg/kg, i.p.), also

significantly reduced the gastroprotection produced by BSLE and diazoxide (3 mg/kg, i.p.) (Fig. 4C), indicating a role for K^+_{ATP} channels in gastroprotection.

The amount of gastric mucus was significantly ($p < 0.01$) less in the gastric tissues collected from ethanol-treated animals, as compared to non-damaged tissues from control. The pretreatment of animals with BSLE greatly enhanced the gastric mucus, when compared to animals on ethanol injury (Fig.3).

Discussion

The results show that the leaf extract of *B. sericea* protects against absolute ethanol-induced gastric lesions in mice. However, at the doses tested, the protective response was not dose-related. The reason for this might be due to the complex nature of polyphenolics present, and or their impaired absorption following oral administration of the extract. Phytochemical analysis of BSLE indicated the presence of flavonoids and tannins, and the HPLC analysis confirmed the presence of rutin (quercetin 3-*O*-rutinoside), isoquercetrin (quercetin 3-*O*-glucoside), kaempferol 3-*O*-rutinoside and quercetin as the main secondary metabolites. Several of these flavonoids and their structurally related compounds have been shown to inhibit lipid peroxidation (Katsube et al., 2006; Lambert et al., 1999). The results of this study show that BSLE at doses of 125, 250, and 500 mg/kg affords pronounced gastroprotection against ethanol-evoked lesions, largely due to the presence of strong antioxidant flavonoids in the extract. The gastroprotective and antioxidant effects of quercetin and rutin are well-known (De la Lastra et al., 1994; La Casa et al., 2000) and there have been many studies, addressing the antiulcerogenic properties of flavonoids (Gonzalez and Di Stasi, 2002; Kahraman al., 2003). The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute ethanol-induced gastric mucosal lesions and the effects of quercetin have been evaluated in a few studies. It has been confirmed that quercetin treatment significantly inhibits the gastric erosions induced by ethanol (Gracioso et al., 2002). Galati et al. (2003) have also described that there is a correlation between the antioxidant and the antiulcer activity of the flavonoids. It has been firmly established that oxidative stress and impaired prostaglandin synthesis contribute to gastric mucosal damage in experimental models of gastric lesions induced by ethanol (Chattopadhyay et al., 2006). The administration of BSLE (250 mg/kg) to the animals increased the levels of gastric NP-SH (GSH) and the amount of mucus. Previous studies have shown that oral administration of the *Maytenus ilicifoli* leaf extract, rich in flavonoids can increase the mucus

production in ethanol model of gastric damage in mice, which is in agreement with our data (Baggio et al., 2007). Both gastric mucus and glutathione serve as protective agents against mucosal injury (Cnubben et al., 2001; Chen et al., 2005). The plant-derived natural antioxidants are extremely useful to combat the oxidative stress (Repetto and Llesuy, 2002). Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), in a preventive way, act as a first line defense against the reactive oxygen species (ROS). Acute treatment with ethanol promotes oxidative stress consequently enhancing the lipid peroxidation and malonaldehyde formation (Peskar et al., 2002). The present study clearly shows that BSLE inhibits lipid peroxidation and lowers TBARS formation indicating a cytoprotective function. Other studies have reported that NO is involved in the preservation of mucous membrane integrity in experimental models of gastric ulceration (Cho, 2001; Kwiecien et al., 2002; Ancha et al., 2003). In this study, L-arginine (400 mg/kg) and BSLE (250 mg/kg) induced gastroprotection was reversed by L-NAME, a non-selective NOS inhibitor, suggesting that the gastroprotective effect of BSLE is mediated, in part, by NO. It is known that potassium channels are involved in a variety of stomach physiological functions and that gastroprotection can be inhibited by several agents such as indomethacin, K^+_{ATP} blockers and glibenclamide (Peskar et al., 2002). Glibenclamide, a blocker of K^+_{ATP} channels, significantly antagonized the protective effect of BSLE and diazoxide. These results support the hypothesis that K^+_{ATP} channel opening is involved in the gastroprotective activity of BSLE. Since this protection is also sensitive to indomethacin, it is suggested that endogen prostaglandins activate the K^+_{ATP} channels and this mechanism is responsible, in part, for the BSLE gastroprotective action (Campos et al., 2008). The results of this study indicate that BSLE has a cytoprotective role in the gastroprotection against gastric damage induced by ethanol, which is presumably mediated, in part, by nitric oxide release and K^+_{ATP} channel opening. The extract does not seem to be toxic as consecutive daily oral administrations of BSLE (500 or 1000 mg/kg) over a period of five days to mice did not produce any signs of overt toxicity. Taken together these findings suggest that the ethanolic extract of *B. sericea* is a safe gastroprotectant to obliterate gastric dysfunction associated pathologies.

Acknowledgements

We are thankful for the financial support of FUNCAP (Ceará State Research Funding) and CNPq (National Council for Technological and Scientific Development, Brazil).

References

- Ancha, H., Ojeas, H., Tedesco, D., Ward, A., Harty, R.F., 2003. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. *Regul Pept* 110, 107-113.
- Baggio, C.H., Freitas, C.S., Otofujii, G.M., Cipriani, T.R., Souza, L.M., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Marques, M.C., Mesia-Vela, S., 2007. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. *J Ethnopharmacol* 113, 433-440.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44, 276-287.
- Béjar, E., Malone, M.H., 1993. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. *J Ethnopharmacol* 39, 141-158.
- Boscolo, O.H., Mendonça-Filho, R.F.W., Menezes, F.S., Senna-Valle, L., 2007. Potencial antioxidante de algumas plantas de restingas citadas como medicinais. *Rev Bras Pl Med* 9, 8-12.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Campos, D.A., de Lima, A.F., Ribeiro, R.S., Silveira, E.R., Pessoa, O.D., Rao, V.S., Santos, F.A., 2008. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. *J Pharm Pharmacol* 60, 391-397.
- Cardoso C.R., de Syllos Cólus I.M., Bernardi C.C., Sannomiya M., Vilegas W., Varanda E.A., 2006. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology* 225, 55-63.
- Chattopadhyay, I., Bandyopadhyay, U., Biswas, K., Maity, P., Banerjee, R.K., 2006. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radic Biol Med* 40, 1397-1408.
- Chen, S.H., Liang, Y.C., Chao, J.C., Tsai, L.H., Chang, C.C., Wang, C.C., Pan, S., 2005. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on the ethanol-induced gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 11, 3746-3750.
- Cho, C.H., 2001. Current roles of oxide nitric in gastrointestinal disorders. *J Physiol* 95, 253-256.

- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van Zanden, J., Van Bladeren, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *J Physiol* 10, 141-152.
- Corne, S.J., Morrisey, S.M., Woods, R.J., 1974. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J Physiol* 224, 116-117.
- De la Lastra, A.C., Martín, M.J., Motilva, V., 1994. Antiulcer and Gastroprotective Effects of Quercetin: A Gross and Histologic Study. *Pharmacology* 48, 56-62.
- Galati, E.M., Mondello, M.R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S., Taviano, M.F., 2003. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *J Agric Food Chem* 51, 4903-4908.
- Geiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D., Rimpler, H., Heinrich, M., 1995. Proanthocyanidins with (+) - epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry* 39, 635-643.
- Gonzalez, F.G., Di Stasi, L.C., 2002. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine* 9, 125-134.
- Gracioso, J.S., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., Souza Brito, A.R., 2002. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biol Pharm Bull* 25, 487-491.
- Kahraman, A., Erkasap, N., Köken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap, S., 2003. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 183, 133-42.
- Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamazaki, Y., Kuninori Shiwaku, K., Yamane, Y., 2006. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem* 97, 25-31.
- Kwiecień, S., Brzozowski, T., Konturek, P.C.H., Konturek, S.J., 2002. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol* 53, 761-773.
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcón de la Lastra, C., Motilva, V., Martín Calero, M.J., 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol* 71, 45-53.

Lambert, N., Kroon, P.A., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Mc Lauchlan, W.R., Day, A.J., Williamson, D.G., 1999. Purification of cytosolic beta-glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. *Biochim Biophys Acta* 1435, 110-116.

Lima ZP, Dos Santos RD, Torres TU, Sannomiya M, Rodrigues CM, Dos Santos LC, Pellizzon CH, Rocha LR, Vilegas W, Souza Brito AR, Cardoso CR, Varanda EA, de Moraes HP, Bauab TM, Carli C, Carlos IZ, Hiruma-Lima CA. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *J. Ethnopharmacol.* 2008 Aug 8. [Epub ahead of print]

Lira W.M., dos Santos F.V., Sannomiya M., Rodrigues C.M., Vilegas W., Varanda E.A., 2008. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. *J Med Food.* 11, 111-9.

Maehly, A.C., Chance, B., 1954. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal* 1, 357-424.

Malencić, D., Gasic, O., Popović, M., Boza, P., 2000. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* hornem. *Phytother Res* 14, 546-548.

Matos, F.J.A., 1997. Introdução à Fitoquímica Experimental, 2 ed. Ed. UFC Fortaleza, CE, 34-47.

Martínez-Vázquez M., González-Esquinca A.R., Cazares Luna L., Moreno Gutiérrez M.N., García-Argáez A.N., 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *J. Ethnopharmacol.* 66, 79-82.

Mendes, C.C., Cruz, F.G., David, J.M., Nascimento, I.P., David, J.P., 1999. Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla*. *Quím Nova* 22, 185-188.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.

Peskar, B.M., Ehrlich, K., Peskar, B.A., 2002. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin mediated gastroprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 969-974.

Repetto, M.G., Llesuy, S.F., 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 35, 523- 534.

Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Hanchar, A.J., 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology* 77, 433-443.

Sannomiya M., Cardoso C.R., Figueiredo M.E., Rodrigues C.M., dos Santos L.C., dos Santos F.V., Serpeloni J.M., Cólus I.M., Vilegas W., Varanda E.A., 2007. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *J. Ethnopharmacol* 112, 319-326.

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25, 192-195.

Legends to Figures

Fig. 1. HPLC Chromatogram of the ethanolic extract of *B. sericea*. Column: Waters C18 (150 x 3.9 mm, 4 μ m; eluent: water /ACN / fosforic acid / 80:20), Flow-rate: 1mL/min, 20 μ l, Temperature 21°C. Detection: 350nm. **1.** unidentified, **2.** rutin, **3.** isoquercitrin, **4.** kaempferol 3-*O*-rutinoside, **5.** quercetin

Fig. 2. HPLC Chromatogram of 4 marker compounds. (**2.** Rutin; **3.** Isoquercitrin; **4.** kaempferol-3-*O*-rutinoside; **5.** quercetin)

Fig. 3. Effect of the *B. sericea* extract (BSLE) treatment on the amount of mucus after induction of gastric lesion by ethanol in mice. The results are expressed as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ in comparison to control group (vehicle) (ANOVA followed by Student Newman Keul's test).

Fig.4. A. Involvement of TRPV1 channel in the gastroprotective effect of *B. sericea* extract (BSLE) against ethanol-induced gastric damage in mice. **B.** Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effect of *B. sericea* extract (BSLE) against ethanol-induced gastric damage in mice. **C.** Role of K_{+ATP} channels in the gastroprotective effect of BSLE against ethanol-induced gastric damage in mice. The results are expressed as mean \pm S.E.M. ^a $p < 0.05$ vs control (vehicle); ^b $p < 0.05$ vs BSLE alone; ^c $p < 0.05$ vs L-arginine (L-arg) or diazoxide alone (ANOVA followed by Student Newman Keul's test).

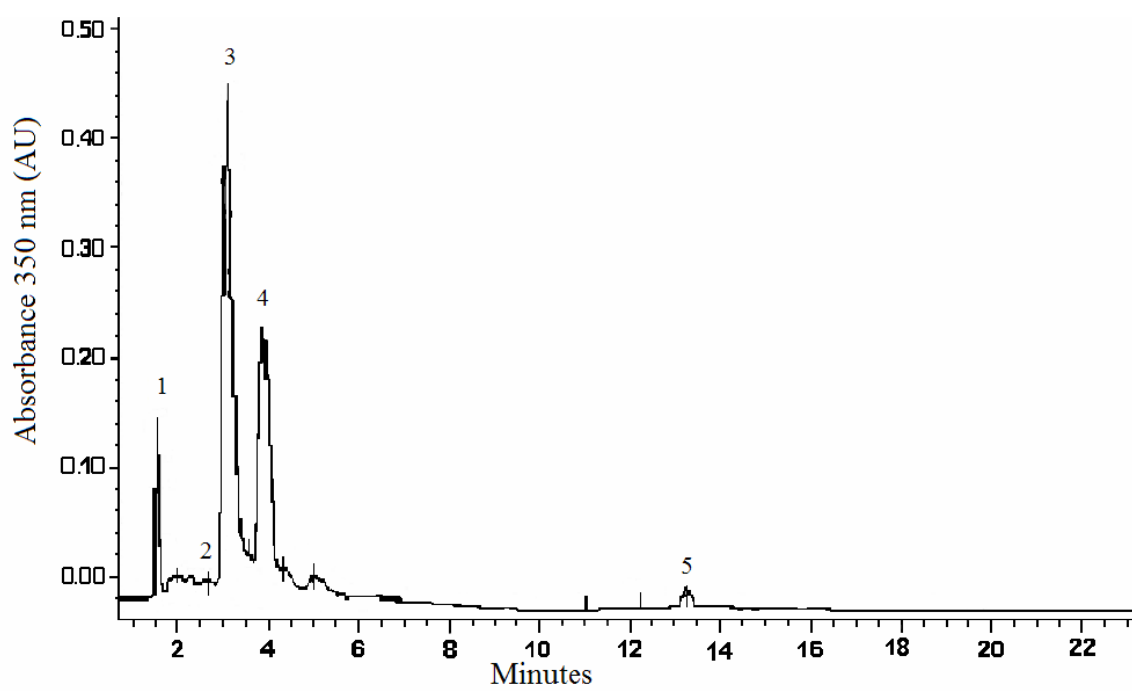


Fig. 1.

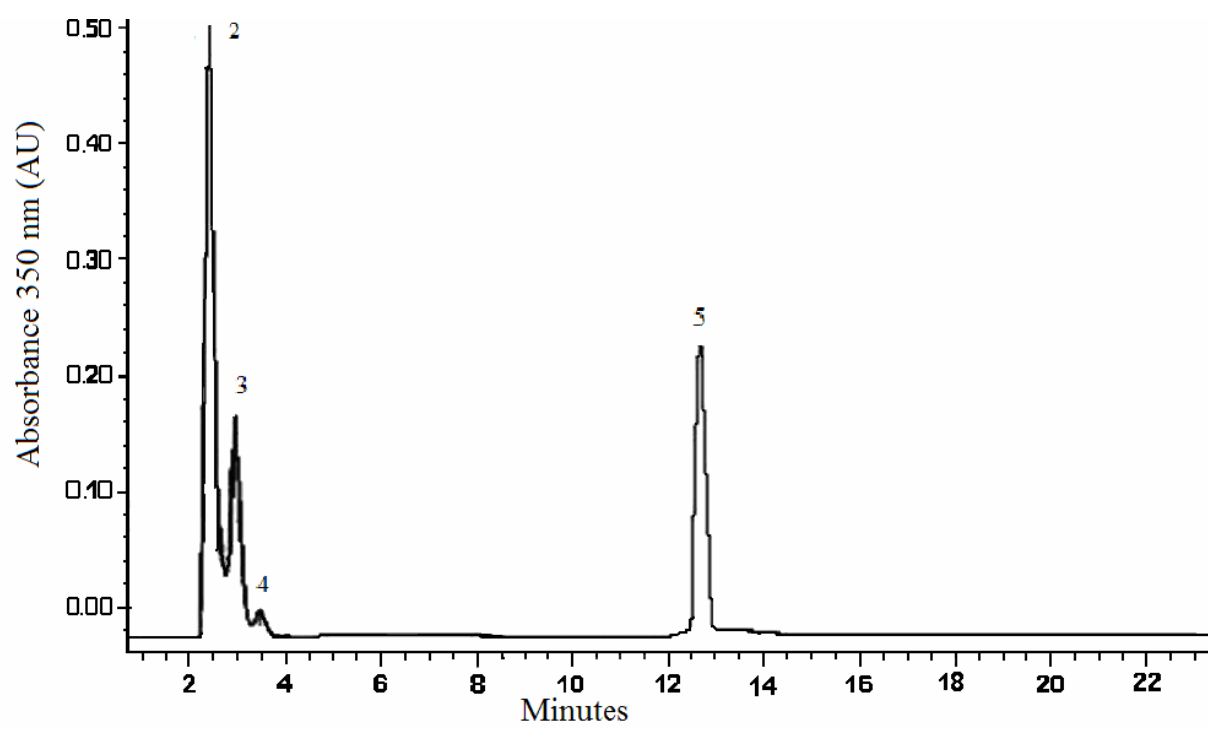


Fig. 2.

Table 1. Effect of *B. sericeae* extract (BSLE) on gastric damage induced by absolute ethanol in mice.

Treatment	Dose (p.o.)	Ethanol lesion area (mm ²)	% of inhibition
Control (vehicle)	-	21.8 ± 0.4	-
BSLE	125 mg/kg	10.4 ± 1.0 ^{***}	58.3
	250 mg/kg	3.3 ± 0.6 ^{***}	86.5
	500 mg/kg	2.7 ± 0.5 ^{***}	80.8
	1000 mg/kg	2.3 ± 0.1 ^{***}	90.2
NAC	150 mg/kg	3.0 ± 0.5 ^{***}	86.5

Data are mean ± S.E.M of 8 animals in each group. ^{***} p < 0.001 vs. Control (vehicle) (ANOVA followed by Student Newman Keul's test).

Table 2. Effects of *B. sericeae* extract (BSLE) on the contents of CAT, SOD, MDA and NP-SH on gastric damage induced by absolute ethanol in mice.

Treatment	CAT (U/g protein)	SOD (U/g protein)	TBARS (nmol/g tissue)	NP-SH (μ g/g tissue)
No lesion	14.2 \pm 0.8	1.0 \pm 0.2	54.6 \pm 6.9	280.1 \pm 12.7
Control (vehicle)	13.6 \pm 0.6	0.6 \pm 0.2 ^a	86.6 \pm 17.3 ^a	102.3 \pm 10.4 ^a
BSLE 250 mg/kg	13.1 \pm 0.9	1.0 \pm 0.1 ^b	67.7 \pm 7.5 ^b	229.1 \pm 9.9 ^b
NAC 150 mg/kg	15.4 \pm 0.4	1.0 \pm 0.1 ^b	62.1 \pm 6.9 ^b	239.5 \pm 6.5 ^b

Data are mean \pm S.E.M of 8 animals in each group. ^a p < 0.05 vs. Control (normal); ^b p < 0.05 vs. vehicle (ANOVA followed by Student Newman Keul's test).

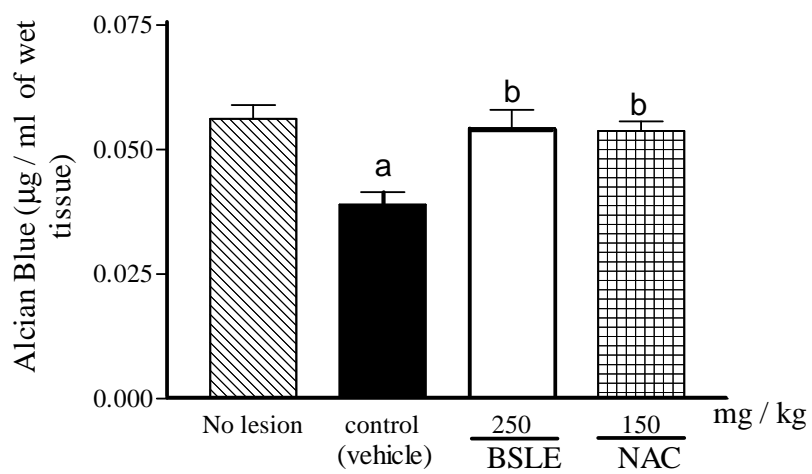


Fig. 3.

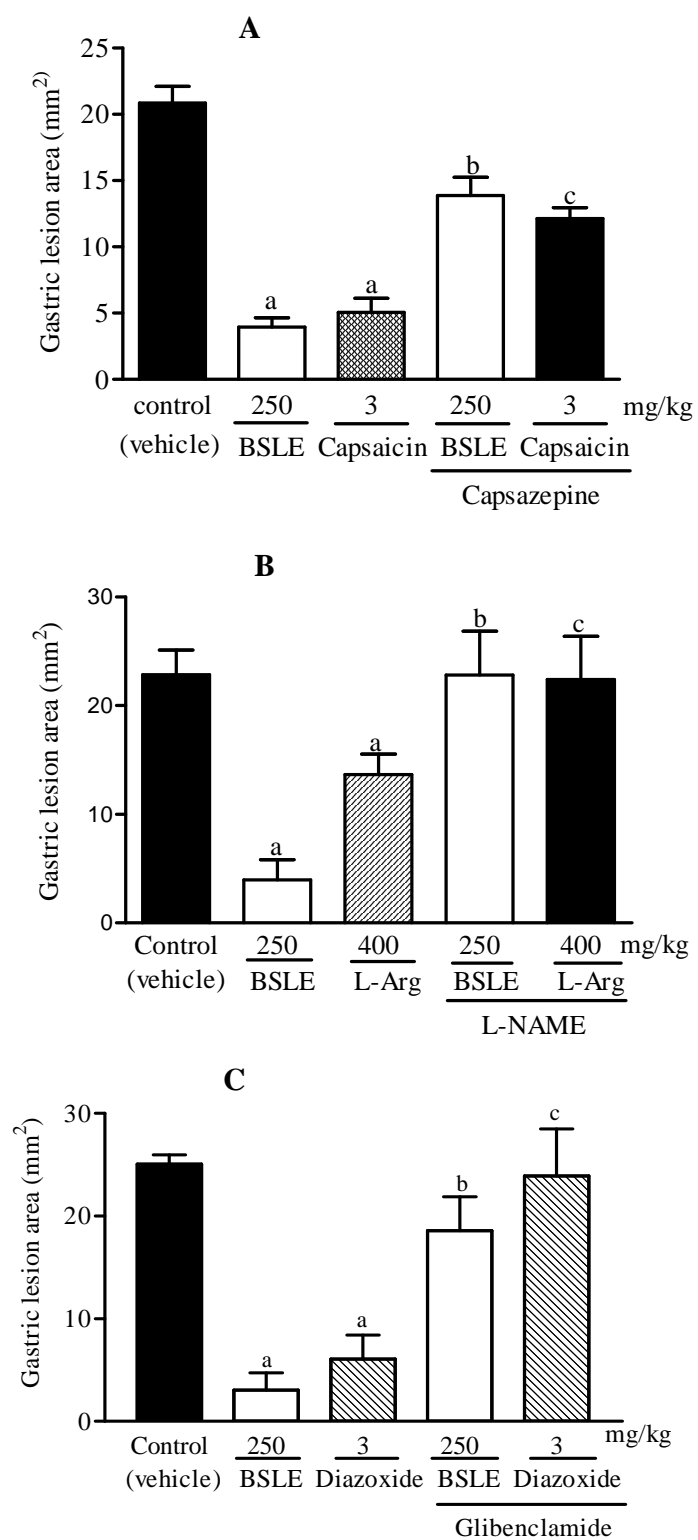


Fig. 4.

CAPÍTULO 3

Efeito do extrato etanólico de *Byrsonima sericea* DC. no sistema gastro-intestinal e avaliação da toxicidade em camundongos

Effect of *Byrsonima sericea* DC. ethanol extract in the gastro-intestinal system and assessment of toxicity in mice

Periódico: **Revista Brasileira de Farmacognosia**

Submetido em 29 de outubro de 2008

Efeito do extrato etanólico de *Byrsonima sericea* DC. no sistema gastro-intestinal e avaliação da toxicidade em camundongos

Patrícia A. Rodrigues,^{1*} Selene M. Morais,^{1,2} Ana R.A. Silva,² Liza A. Aguiar,² Carolina M. de Souza,³ Flávia A. Santos³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Campus do Itaperi, Fortaleza-Ceará, Brasil

² Departamento de Química, Laboratório de Química de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Campus do Itaperi, Fortaleza- Ceará, Brasil

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Rua Coronel Nunes de Melo, 127, Rodolfo Teófilo, 60430-270, Fortaleza- Ceará, Brasil

*E-mail: patriciaraujoro@yahoo.combr ; Tel: + 55- 85-30919838

RESUMO: *Byrsonima sericea* DC., conhecida como murici da praia, é usada popularmente para tratar doenças gastro-intestinais. Análises fitoquímicas e antioxidantes foram feitas com os extratos obtidos através de cromatografia do extrato etanólico bruto das folhas de *B. sericea* (EEB), obtendo-se os extratos hexânico (E.H), acetato de etila (E.Ac) e etanólico (E.E). Para comprovar o uso etnofarmacológico da espécie, foram avaliados a atividade gastroprotetora, o efeito na motilidade intestinal e a toxicidade do E.E. que apresentou a melhor atividade antioxidante (90%) e maior rendimento (126,2g). Doses orais de 500 e 1000 mg/kg não causaram mortalidade, não havendo diferença no peso dos animais, peso relativo dos órgãos e ASATe ALAT quando comparado ao grupo controle. Doses de 250, 500 e 1000 mg/kg

inibiram as lesões gástricas induzidas por indometacina em 52, 60 e 62 % respectivamente. A dose de 1000 mg/kg diminuiu a motilidade intestinal nos animais. A análise fitoquímica do E.E. e E.Ac. mostrou a presença fenóis, taninos, leucoantocianidinas, flavonoídes, esteróides, triterpenos e alcalóides. O E.E. de *B. sericea* não foi tóxico nas doses testadas, apresentou atividade gastroprotetora e efeito antidiarrêico, confirmando seu uso popular. Estas ações podem estar relacionadas com a presença de compostos fenólicos contidos no extrato estudado.

Unitermos: *Byrsonima sericea* DC, Gastroproteção, Toxicidade, Antioxidantes

ABSTRACT: “Effect of *Byrsonima sericea* DC. ethanol extract in the gastro-intestinal system and assessment of toxicity in mice”. *Byrsonima sericea* DC., popularly known as murici of the the beach, is used to treat gastro-intestinal diseases. In this study it was performed the phytochemical and antioxidant analysis of extracts obtained by chromatography of crude ethanol extract from *B. sericea* (BEE) leaves obtaining hexane extract (EH), ethyl acetate extract (E.Ac) and ethanol extract (EE). EE showed the higher yield and the best antioxidant activity (90%). The ethnopharmacological use of *B. sericea* was evaluated by assaying EE for gastroprotective activity in stomach ulcer induced by indometacin, intestinal motility and toxicity. Oral doses of 500 and 1000 mg/kg did not cause mortality, and there was no difference in animals weight, organs relative weight and ASAT and ALAT, as compared to the control group. Doses of 250, 500 and 1000 mg/kg inhibited the gastric lesions induced by indomethacin in 52, 60 and 62% respectively. The dose of 1000 mg/kg decreased intestinal motility in animals. Phytochemical analysis of E.E e E.Ac showed the presence of phenols, tannins, leucoanthocianidins, flavonoíds, esteróids, triterpenes e alkaloids. *B. sericea* E.E. was

not toxic and showed gastroprotective and antidiarrheal activities, confirming its popular use. These actions may be related to the presence of phenolic compounds in the studied extract.

Keywords: *Byrsonima sericea* DC., Gastroprotective, Toxicity, Antioxidants

INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos o homem procurou aproveitar os recursos existentes na natureza, principalmente nos vegetais, embora de modo totalmente intuitivo, baseado em descobertas ao acaso. Este fato ainda pode ser encontrado entre muitos povos primitivos isolados como algumas tribos indígenas da América do Sul (Van Den Berg, 1987).

Atualmente o uso de plantas medicinais tornou-se um recurso alternativo de ampla aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica. Das plantas que são utilizadas com fins terapêuticos, destacam-se as que possuem atividade antioxidante, uma vez que a oxidação de biomoléculas pode estar envolvida no surgimento de diversas doenças degenerativas. (Lee et al., 2003). As plantas produzem uma variedade de substâncias utilizadas no controle do estresse oxidativo, causado pela ação dos raios solares e oxigênio, tais substâncias podem representar uma fonte de novos compostos com atividade antioxidante (Morais, 2002). Dentre as doenças geradas pela ação das espécies oxidantes, estão as úlceras pépticas que afetam um número considerável de pessoas no mundo. As lesões gástricas ocorrem quando há um desequilíbrio entre os fatores agressores e os fatores protetores da mucosa (Sairam et al., 2002). As medicações disponíveis hoje em dia para o tratamento das úlceras desempenham seu efeito por reduzir fatores agressivos ou por estimular fatores defensivos presentes no tecido. Nesse contexto, as plantas surgem como fonte de compostos com capacidade tanto de reduzir fatores lesivos como aumentar a resistência da mucosa gástrica de maneira sinérgica, possibilitando um tratamento mais eficaz (Borrelli & Izzo, 2000).

Antioxidantes naturais como os polifenóis e carotenóides estão sendo extensivamente pesquisados para se estabelecer suas eficiências de absorção no trato gastrointestinal, biodisponibilidade, mecanismos de ação envolvidos e instruções para o consumo seguro em humanos (Augusto, 2006).

Byrsonima sericea DC., conhecida popularmente como murici da praia, e algumas outras espécies do gênero são usadas popularmente para tratar disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e ainda como anti-diarréicos (Amarquaye *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2008; Sannomya *et al.*, 2007). Não existem dados científicos publicados que avaliem os efeitos de *B. sericea* no sistema gastrintestinal. Tendo em vista o uso etnofarmacológico voltado para tratamento de enfermidades que possam estar envolvidos a ação de radicais livres, como úlceras gástricas, tornam-se importantes análises química e farmacológica da espécie. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade aguda, atividade gastroprotetora, e a motilidade intestinal em camundongos do extrato etanólico (E.E.) das folhas de *B. sericea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Folhas frescas de *B. sericea* foram coletadas em outubro de 2006 no Campus do Itaperi da Universidade Estadual do Ceará. A exsicata da planta foi preparada, e depositada no herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da UFC, obtendo o número de registro 39.451.

Preparação dos Extratos

As folhas frescas foram imersas em álcool etílico (70%) por uma semana à temperatura ambiente para extração de princípios ativos. A solução resultante foi filtrada e o solvente eliminado em evaporador rotativo para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB). Este extrato foi submetido a uma coluna filtrante misturando-se com sílica gel na proporção de 1:1 e

eluindo-se com solventes orgânicos em ordem de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e etanol). Após evaporação dos solventes foram obtidos os extratos hexânico (E.H.), de acetato de etila (E.Ac.) e de etanol (E.E.) e seus rendimentos foram calculados.

Análise Fitoquímica

Os extratos foram submetidos a testes fitoquímicos qualitativos para avaliar as classes de compostos presentes, seguindo a metodologia de Matos (1997). Esses testes são baseados na adição de reagentes específicos em alíquotas do extrato e observação em mudanças de cor ou formação de precipitados.

Teste de Atividade Antioxidante *in vitro* (Método da varredura do radical livre DPPH).

A atividade antioxidante foi determinada através do método do radical estável DPPH. Em um tubo de ensaio colocaram-se 3,9 mL de solução metanólica $6,5 \times 10^{-5}$ M do radical livre DPPH e, em seguida, adicionou-se 0,1 mL de solução metanólica das amostras das frações (1mg/mL). As análises foram feitas em triplicata e as absorvâncias lidas em espectrofotômetro a 515 nm em diferentes tempos (0 a 60 min). Para comparação, utilizou-se a quercetina como padrão na proporção molar quercetina/amostra de 1:10 (Yepez *et al.*, 2002).

Animais de Experimentação

Foram utilizados camundongos swiss, fêmeas, pesando entre 20-25g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração e água *ad libidum*. A manipulação dos animais obedeceu às normas de manipulação de animais, preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Avaliação da Atividade tóxica da E.E. em camundongos

Para os ensaios *in vivo* foi utilizado o E.E. que apresentou melhor atividade antioxidante e um melhor rendimento em relação aos demais. Os animais foram separados em grupos

experimentais (n=8): onde 2 grupos receberam a E.E nas doses de 500 ou 1000 mg/kg v.o. e um grupo controle que recebeu veículo (solução fisiológica 0,9%; DMSO 5%) uma vez ao dia por um período de 5 dias consecutivos. Os animais foram pesados no dia 1 e no dia 5 para monitoramento do peso. Durante o tratamento os grupos foram observados diariamente, avaliando-se possíveis mudanças nos parâmetros comportamentais. O sangue foi coletado por punção, através do plexo retro-orbital, centrifugado (3000 rpm, por 7 minutos) e o soro separado para a análise dos níveis de ASAT e ALAT, no dia zero antes da primeira dose do E.E. e no dia 5, último dia do tratamento. Os soros foram analisados no Laboratório de Hematologia no Hospital Geral de Fortaleza (HGF) em equipamento Konelab, pelo método cinético U.V. recomendado pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC). Para determinação do peso relativo dos órgãos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, no quinto dia de tratamento e retirado os órgãos (fígado, baço e rim), pesados e feitos à comparação com o grupo controle (adaptado de Pulla-Reddy & Lokesh, 1996).

Lesão gástrica induzida por indometacina

Animais, em jejum de sólidos de 18 h, (n=8), foram tratados, com E.E. (125, 250, 500 e 1000 mg / kg, v.o.), ou misoprostol (50 µg / kg, v.o.) ou o veículo (0,9% em salina a 0,5% do DMSO, 10mL/kg). Após uma hora, os animais foram tratados por via oral com indometacina (50 mg/kg v.o.). Oito horas após a administração da indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e instilados com formalina a 5 % por 15 minutos (Bhargava et al, 1973). Em seguida foram abertos ao longo da grande curvatura, lavados em salina e inspecionados para atribuições de escores de acordo com Szabo et al. (1985) de acordo com a seguinte escala: 0 = sem petéquias, hemorragia ou erosão; 1 = 5 petéquias; 2 = até 5 petéquias e hemorragias ou erosão de 1 milímetro profundidade; 3 = até 5

petéquias com hemorragias ou erosão acima de 1 mm. A média de escores atribuídos as úlceras para cada animal foi calculado e comparado entre os grupos.

Teste da motilidade intestinal em camundongos

Camundongos (n=8), em jejum de sólidos de 18 h, foram pré-tratados, com o E.E. (1000 mg / kg, v.o), ou atropina (1 mg/kg, i.m.) ou veículo (0,9% em salina a 0,5% do DMSO, 10mL/kg). Após 1 h, de receberem os tratamentos, os animais receberam 0,5 ml/animal de suspensão de carvão ativo 10% em solução de goma arábica 5%, v.o. Após 45 min os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo realizada a extirpação imediata do intestino desde o piloro até o início do ceco. Assim, foi feita a medida do comprimento total do intestino delgado e da distância percorrida pela suspensão de carvão ativo. O resultado foi expresso em porcentagem do comprimento total do intestino delgado (Stickney & Northup, 1959).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 3.0 (USA). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão (D.P.). A comparação entre as médias foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman Keuls, para dados paramétricos, e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnett, para dados não paramétricos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Obtenção dos extratos

A partir de 1240g de folhas secas foram obtidas 153g de extrato etanólico bruto que foi submetido a uma coluna filtrante de sílica gel. Após a eluição com solventes orgânicos seguida de evaporação destes foram obtidos 1,1g de E.H., 5,6g de E.Ac. e 126,2g de E.E., com rendimentos de 0,71; 3,66 e 3,66%, respectivamente.

Análise Fitoquímica

Os extratos E.E. e E.Ac mostraram a presença fenóis, taninos, leucoantocianidinas, flavonóides, esteróides, triterpenos e alcalóides. A presença de ácidos graxos e esteróides foram determinadas no E.H.

Avaliação das atividades antioxidantes dos extratos de *Byrsonima sericea in vitro*

Os E.E e E.Ac obtiveram um percentual de varredura (PV) do radical livre DPPH de 90 e 88 % respectivamente. Ambos os percentuais ficaram próximos ao padrão quercetina 94%. No entanto a E.H obteve um percentual de 21%.

Avaliação da Toxicidade da E.E em camundongos

Em nenhum dos grupos tratados foram observadas diarreia, vômitos, dificuldades motoras, morbidez nem mortes durante o tratamento. Os resultados da análise estão apresentados na tabela 1. A administração do E.E. nas doses testadas não alterou os níveis séricos de ASAT e ALAT nos animais. O peso corporal dos animais não mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. O peso relativo dos órgãos analisados (rim, baço e fígado) também não apresentou alteração.

Lesão gástrica induzida por indometacina

As doses de 250, 500 e 1000 mg/kg E.E atenuaram significativamente as lesões gástricas induzidas por indometacina, inibindo 52, 60 e 62 % respectivamente (Figura 1).

Motilidade intestinal em camundongos

O ensaio do trânsito intestinal reduziu significativamente a motilidade intestinal dos animais após administração do E.E. (1000 mg/kg), quando comparados com o controle atropina 1mg/kg (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Estudos realizados com outras espécies do gênero *Byrsonima* (Amarquaye et al., 1994; Rastrelli et al., 1997; Sannomiya et al., 2004) relataram a presença de compostos fenólicos, corroborando com os resultados do estudo fitoquímico de *B. sericea*. Outras plantas do gênero, como *B. crassifolia* e *B. crassa* mostraram também forte presença de taninos e flavonóides (). Compostos fenólicos são conhecidos por possuírem atividades antioxidantes (Béjar & Malone, 1993). O elevado potencial antioxidante do E.E. de folhas da *B. sericea* através do ensaio com DPPH corroborou com os achados de Boscolo e colaboradores (2006).

A administração oral por 5 dias da E.E na dose de 500 e 1000 mg/kg não produziram efeitos tóxicos em camundongos, não havendo óbito. Neste trabalho, a administração da E.E nas doses de 500 e 1000 mg/kg não alteraram os níveis séricos das transaminases estudadas. Segundo Fillipin et al, (2004) quando os níveis de ASAT e ALAT aumentam em uma análise sorológica, comparados a um grupo controle, tal aumento é indicativo de lesão hepática ocasionada por xenobióticos ou por hepatite C. Os animais que receberam a E.E nas doses de 500 e 1000 mg/kg não tiveram diferença no peso corporal quando comparados com os animais que receberam apenas veículo. De acordo com Jahn & Gunzel, (1997) o acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância. Também não foram observadas alterações no peso relativo dos órgãos analisados (rim, baço e fígado). Estudos já realizados em algumas espécies do gênero como *B. fagifolia* e *B. basiloba* (Lira et al, 2008), apresentaram baixa toxicidade na dose de 1000 mg/Kg e as espécies *B. crassa* e *B. intermedia* apresentaram toxicidade na dose de 500 mg/kg, incluindo morte de 33% dos animais (Higuchi, 2006).

No modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina, o E.E. mostrou-se eficaz em prevenir o dano à mucosa. Galati et al. (2003) descreveram uma correlação entre a atividade

antioxidante e gastroprotetora dos flavonóides. Os antiinflamatórios não esteróidais (AINEs), como aspirina e indometacina, são conhecidos por induzir úlceras durante o curso da terapia com anti-inflamatórios, através da inibição da síntese de prostaglandina pela via da ciclooxigenase (Rainsford, 1987). Os efeitos importantes das prostaglandinas no estômago relacionam-se com a defesa da mucosa gástrica, à estimulação da secreção de muco e bicarbonato e manutenção do fluxo sanguíneo (Hawkey, 2000). O E.E. em doses mais altas 250, 500 e 1000 mg/kg, parece ter influência sobre um ou mais fatores envolvidos na patologia da úlcera pela indometacina.

O ensaio do trânsito intestinal em camundongos demonstrou significativa redução da motilidade intestinal dos animais após a administração do E.E. quando comparado com o controle. Segundo Parmar & Ghosh, (1981) muitos flavonóides isolados de plantas medicinais apresentam atividade gastroprotetora, sendo as catequinas e flavonóides com atividade antiúlcera mais conhecidos e atuam através da inibição da enzima histidina descarboxilase, podendo justificar a diminuição da motilidade intestinal. Estudos adicionais relatam que da espécie *B. crassifolia*, foram isolados compostos voláteis dos frutos, glicolipídeos, triterpenos, ácidos triterpênicos, catequinas, e flavonóides das folhas (Amarquaye *et al.*, 1994; Rastrelli *et al.*, 1997) e do tronco proantocianidinas e taninos (Geiss *et al.*, 1995). De acordo com relatos científicos alguns flavonóides são conhecidos pela sua ação antidiarréica dentre eles estão a quercetrina, quercetina e ternatina. Essa atividade dos flavonóides foi observada através de experimentos de diarreia crônica em ratos e na motilidade do trânsito intestinal de camundongos (Galvez *et al.*, 1993; Galvez *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1997). Nossos resultados concordam com Figueiredo *et al.* (2005) que avaliaram a atividade antidiarréica dos extratos metanólico e hidrometanólico das folhas de *B. cinera* (Lira *et al.*, 2008), em camundongos nas doses de 1000 mg/kg, sendo observada uma redução significativa da motilidade intestinal.

Concluindo, a não toxicidade de *B. sericea* aliada a constatação de atividades protetoras do sistema gastro-intestinal corroboram o seu uso etnofarmacológico sem relatos de efeitos colaterais. Estas atividades podem estar relacionadas à presença de seus compostos fenólicos. No entanto há necessidade de mais estudos relacionados à espécie com o objetivo de isolar e avaliar a atividade dos seus compostos, bem como analisar os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro e a Universidade Estadual do Ceará.

Tabela 1.

Níveis séricos de ASAT e ALAT em U/L, de camundongos tratados com a E.E na dose de 500 e 1000 mg/kg.

	ASAT		ALAT	
	Dia 0	Dia 5	Dia 0	Dia 5
Veículo	145 ± 55 ^a	118 ± 22 ^a	53 ± 10 ^a	70 ± 26 ^a
500	104 ± 11 ^a	118 ± 21 ^a	49 ± 10 ^a	48 ± 14 ^a
1000	111 ± 31 ^a	158 ± 52 ^a	43 ± 7 ^a	64 ± 18 ^a

Nas colunas e nas linhas as médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 2.

Peso dos animais em g de camundongos tratados com a E.E na dose de 500 e 1000 mg/kg.

Tratamento	Dia 0	Dia 5
Veículo	25,93 ± 2,06 ^a	25,68 ± 1,80 ^a
500	26,18 ± 1,81 ^a	25,48 ± 2,17 ^a
Veículo	21,23 ± 2,31 ^a	20,12 ± 0,35 ^a
1000	19,20 ± 1,99 ^a	21,08 ± 0,36 ^a

Nas colunas e nas linhas as médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 3.

Peso relativos dos órgãos em mg/g de camundongos tratados com a E.E na dose de 500 e 1000 mg/kg.

	Orgãos		
	Fígado	Rim	Baço
Veículo	3,81 ± 0,39 ^a	0,62 ± 0,07 ^a	0,44 ± 0,21 ^a
500	3,91 ± 0,47 ^a	0,58 ± 0,06 ^a	0,59 ± 0,16 ^a
Veículo	4,52 ± 0,86 ^a	0,79 ± 0,18 ^a	0,46 ± 0,13 ^a
1000	4,59 ± 0,95 ^a	0,66 ± 0,11 ^a	0,37 ± 0,13 ^a

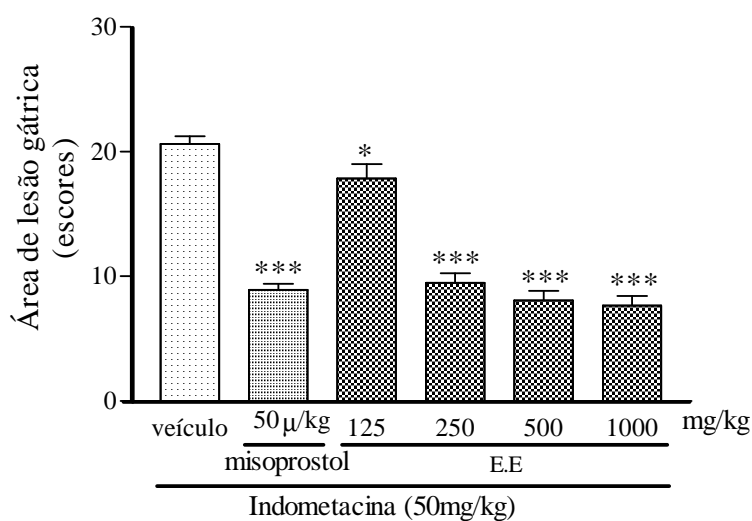
Nas colunas e nas linhas as médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 4.

Porcentagem da distância percorrida pelo carvão ativo no intestino dos camundongos após a administração da E.E.

	Dose	Distância percorrida pelo carvão ativo (%) \pm desvio padrão
Atropina	1 mg/kg	47,17 \pm 13,31**
E.E	1000 mg/kg	49,41 \pm 13,77**
Veículo	10 mL/kg	74,23 \pm 12,25

**Diferente em relação ao grupo veículo de acordo com o teste de Dunnett (P<0,01)

Figura 1.

Efeito da indometacina na gastroproteção da E.E em camundongos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais/grupo. Os animais foram tratados com E.E (125, 250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) ou misoprostol (50 µg/kg, v.o.). Indometacina (50 mg/kg,v.o.) foi administrada 1 h após os tratamentos com E.E ou misoprostol. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnett).

REFERÊNCIAS

- Amarquaye A, Che CT, Bejar E, Malone MH, Fong HHS 1994. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Med* 60: 85-86.
- Augusto O 2006. *Radicais livres: Bons, maus e naturais*. Oficina de textos: São Paulo
- Béjar E & Malone MH 1993. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. *J Ethnopharmacol* 39:141-158.
- Bhargava KP, Gupta MB, Tangri KK 1973. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *European J Pharmacol* 22: 191-195.
- Borrelli F, Izzo A.A 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phyto. Res.* 14: 581-91.
- Boscolo OH, Mendonça-Filho RFW, Menezes FS, Senna-Valle L 2007. Potencial antioxidante de algumas plantas de restingas citadas como medicinais. *Rev Bras Plantas Med* 9:8-12.
- Figueiredo ME, Michelin DC, Sannomiya M, Silva MA, Dos Santos L C, De Almeida LFR, Brito AR, Salgado MS, Vilegas HRNW 2005. Avaliação Química e da Atividade Antidiarréica das Folhas de *Byrsonima cinera* Dc. (Malpighiaceae). *Braz J Pharm Sci* 41:79-83.
- Fillipin FB, Reis K, Cemin L, Duzzioni M, Hermes EM, Souza CL 2004. Novo intervalo de referência para alanina aminotransferase usando o sistema automatizado de bioquímica DADE Behring Ar Dimension. *News Lab* 65: 148-160.
- Galati EM, Mondello MR, Giuffrida D, Dugo G, Miceli N, Pergolizzi S, Taviano MF 2003. Chemical characterization and biological effects of Sicilian opuntia *Ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *J Agric Food Chem* 51:4903-4908.
- Galvez J, Crespo ME, Jimenez J, Suarez A, Zarzuelo, A 1993. Antidiarrheic activity of quercitrin in mice and rats. *J Pharm Pharmacol* 45: 157- 159.

Galvez J, Duarte J, Demedina FS, Jimenez J, Zarzuelo A 1996. Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions. *Phytother Res* 10: 66-69.

Geiss F, Heinrich M, Hunkler, D, Rimpler H, Heinrich M 1995. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry* 39: 635-643.

Hawkey C J 2000. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 119: 521-535.

Higuchi CT, Longo MC, Sacramento LVS, Vilegas W, Oliveira AG, Leite CQF. Ensaio de Toxicidade Aguda (Dose Única) dos Extratos Clorofórmicos Microemulsionados (Ecm) de *Byrsonima Spp*. Disponível em: acessado em 22 de dezembro de 2006.

Jahn AI, Gunzel PK 1997. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reprod Toxicol* 11: 171-178.

Lee SEH Wang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim SH 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci* 73: 167-179.

Lima ZP, Dos Santos RD, Torres TU, Sannomiya M, Rodrigues CM, Dos Santos LC, Pellizzon CH, Rocha LR, Vilegas W, Souza Brito AR, Cardoso CR, Varanda EA, de Moraes HP, Bauab TM, Carli C, Carlos IZ, Hiruma-Lima CA 2008. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *J Ethnopharmacol*. Aug 8. [in print]

Lira WM, dos Santos FV, Sannomiya M, Rodrigues CM, Vilegas W, Varanda E.A 2008. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. *J Med Food* 11:111-9.

Matos FJA 1997. Introdução à fitoquímica Experimental, 2 ed., Fortaleza: Ed.UFC p. 141.

Morais SM, Luciano JH, S, Catunda Júnior FEA 2002. Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste do Brasil. *Ciências e Tecnologia* 4: 23-29.

Parmar NS, Ghosh MN 1981. Gastric antiulcer activity of (+) cyanidol-3, a histidine descarboxilase inhibitor. *Euro J Pharmacol* 69: 25-32.

Pulla-Reddy ACP, Lokesh BR 1996. Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats. *Toxicol* 107: 39-45.

Rainsford KD 1987. The effects of 5-lipoxygenase inhibitors and leukotriene antagonists on the development of gastric lesions induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs in mice. *Inflam Res* 21:316-319.

Rao VS, Santos FA, Sobreira TT, Souza MF, Melo CL, Silveira ER 1997. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med* 63: 146-149.

Rastrelli L, Detommasi N, Berger I, Caceres A, Saravia A, De Simone F 1997. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry* 45: 647-650.

Sairam K, Rao CV, Dora Babu M, Kumar KV, Agrawal VK, Goel RK 2002. Antiulceratogenic effect of methanolic extract of *Embllica officinalis*: an experimental study. *J Ethnopharmacol* 82:1-9.

Sannomiya M, Cardoso CR, Figueiredo ME, Rodrigues CM, dos Santos LC, dos Santos FV, Serpeloni JM, Cólus IM, Vilegas W, Varanda EA 2007. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *J Ethnopharmacol* 112:319-326.

Sannomiya M, Rodrigues CM, Coelho RG, Santos LC, Hiruma-Lima CA, Souza-Brito ARM, Vilegas W 2004. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). *J. Chromatogr. A* 1035: 47-51.

Stickney JC, Northup DW 1959. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. *Proc Soc Exp Bio Med.* 101: 582-583.

Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J, 1985. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 88: 228-236.

Van Den Berg ME 1987. *Plantas Mediciniais da Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático.* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Programa Trópico Úmido/MPEG. Museu Paraense Emílio Goeldi.

Vázquez MM, Esquinca ARG, Luna LC, Gutierrez MNM, Argaez ANG 1998. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia*. *J Ethnopharmacol* 66: 79-82.

Yepez B, Espinosa M, López S, Bolaños G, 2002. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria* 194: 879-884.

CAPÍTULO 4

Estudos pré-clínicos do efeito gastroprotetor da Barbatusina e 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina, diterpenos isolados de *Plectranthus grandis*, em modelos experimentais de lesão gástrica aguda e dos possíveis mecanismos

Pre-clinical studies of the gastroprotective effect of Barbatusin and 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusin, diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in experimental models of acute gastric injury and the possible mechanisms

Periódico: Journal of Ethnopharmacology
(Artigo em fase de elaboração)

Pre-clinical studies of the gastroprotective effect of barbatusin and 3 β -hydroxy-3-deoxobarbatusin, diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in experimental models of acute gastric injury and the possible mechanisms

Patrícia de Araújo Rodrigues ^a, Selene Maia de Morais ^{a,b*}, Carolina Melo de Souza ^c, Ana Raquel Araújo Silva ^b, Cláudio Cabral Campello ^a, Geanne Matos de Andrade ^c, Maria Gorette Vasconcelos Silva ^d, Roberto Lima Albuquerque ^d, Ednardo Rodrigues Freitas ^e, Vietla Satyanarayana Rao ^c, Flávia Almeida Santos ^c.

^a*State University of Ceará, Pos Graduate Program of Veterinary Sciences, Veterinary Faculty, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil*

^b*State University of Ceará, Natural Products Chemistry Laboratory, Technology Center, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil*

^c*Federal University of Ceará, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, P.O. Box-3157, 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil*

^d*Federal University of Ceará, Department of Department of Organic Chemistry and Inorganic, Center of Science, 60021-970, Fortaleza, CE, Brazil*

^e*Federal University of Ceará, Department of Zootchenc, Faculty of Agronomy, 60021-970 Fortaleza, CE, Brazil*

*Corresponding author:

Rua Ana Bilhar N^o 601, Apto. 400, Meireles, CEP 60160-110, Fortaleza, Ceará, Brazil Fax: +55- 85- 3242-2793, E-mail address: selene@uece.br

Resumo

Plectranthus grandis similarmente ao *P. ornatus* são utilizadas na medicina popular brasileira para tratamento de problemas gástricos. Barbatusina (BB) e 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina (OHBB), diterpenos isolados da espécie *P. grandis*, foram avaliados em modelo experimental de lesão gástrica aguda induzida por etanol, nas doses de 2,5; 5,0 e 10 mg/kg (p.o.). OHBB em todas as concentrações testadas atenuou significativamente as lesões gástricas induzidas por etanol e BB somente nas doses de 5,0 e 10 mg/kg. Estudos dos mecanismos foram realizados utilizando-se doses de 5 e 10 mg / kg de OHBB e BB respectivamente. OHBB e BB foram capazes de diminuir de forma significativa a depleção dos grupos sulfidrilas não-proteicos e o aumento nos níveis de malonaldeído, associados à administração de etanol. O pré-tratamento com glibenclamida não foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor da OHBB. Adicionalmente, o efeito da BB foi significativamente reduzido em camundongos pré-tratados com L-NAME e capsazepina frente às lesões induzidas por etanol. BB aumentou o muco gástrico em camundongos. A administração de OHBB foi capaz de causar depleção da Catalase (CAT), enquanto que a administração de BB não alterou a quantidade desta enzima no tecido gástrico. No entanto o pré-tratamento com OHBB preservou a quantidade da enzima superóxido desmutase a BB foi capaz de aumentar a quantidade da mesma no tecido. Os resultados do presente estudo indicam uma ação da gastroprotetora de OHBB e BB justificando o uso popular da planta. Em geral esses diterpenos agem por mecanismos distintos, conforme foi demonstrado nos resultados, revelando que diferenças na estrutura dos diterpenos modificam suas atividades.

Palavras chaves: *Plectranthus grandis*; Barbatusina; 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina; Gastroproteção; Canais de potássio; Óxido nítrico

Abstract

Plectranthus grandis similarly to *P. ornatus* are used in Brazilian folk medicine for treatment of gastric diseases. Barbatusina (BB) and 3 β -hydroxy-3-deoxobarbatusina (OHBB), diterpenes isolated from *P. grandis*, were evaluated in experimental model of acute gastric injury induced by ethanol, at doses of 2.5, 5.0 and 10 mg / kg p.o. OHBB at all concentrations tested significantly attenuated the gastric lesions induced by ethanol and BB only at doses of 5.0 and 10 mg / kg. Studies of the mechanisms were performed using a dose of 5 and 10 mg/kg OHBB and BB respectively. OHBB and BB were able to significantly reduce the depletion of non-protein sulfhydryl groups and the increase in the levels of malonaldehyde associated with the administration of ethanol. The pre-treatment with glibenclamide was unable to reverse the effect gastroprotective of OHBB addition, the effect of BB was significantly reduced in mice pre-treated with L-NAME and capsazepina front of lesions induced by ethanol. BB significantly attenuated the depletion of gastric mucus in mice. The administration of OHBB was capable of causing depletion of catalase (CAT), while the administration of BB did not alter the amount of this enzyme in stomach tissue. However the pre-treatment with OHBB preserved the amount of the enzyme superoxide dismutase the BB was able to increase the amount of the same fabric. The results of this study indicate a gastroprotective action for OHBB and BB which justify the folk medicine use. In general, these diterpenes act by different mechanisms as shown in the results, revealing that the structural difference in the compounds modifies its modes of action.

Keywords: *Plectranthus grandis*; Barbatusin; 3 β -hydroxy-3-deoxobarbatusin; gastroprotective

1. Introduction

The family Lamiaceae contains several genera and *Plectranthus* is a large genus containing about 300 species found in Tropical Africa, Asia and Australia. Some species of *Plectranthus* are difficult to identify because of a lack of well defined morphological criteria to discriminate not only among species within the genus but also among the closely related genera. Because of these taxonomic issues, different names have been used for the same species of *Plectranthus* and thus it has been difficult to get information about their utilization. *P. vettiveroides* is used in India to treat stomach diseases, dyspepsia, nausea and vomiting (Dash and Kashyap, 1987). *P. esculentus* and the leaves of *P. aegyptiacus* are also used to treat stomach problems (Morris, 1996; Parkia and Cooke, 2003).

Species of the *Plectranthus* genus have biosynthetic capacity to produce a large number of secondary metabolites, among them the diterpenes stand out, some with relevant biological properties already proven (Marques et al., 1997; Buznego and Perez-Saad, 1999; Abdel-Mogib et al., 2002; Costa & Nascimento, 2003; Hagiwara et al., 2003; Cerqueira et al., 2004; Marques et al., 2006; Wellsow et al., 2006; Schultz et al., 2006).

Zelnik et al. (1977) studying the chemical composition of *P. barbatus* leaves found three diterpenes: barbatusin, o 3 β -hydroxy-3-deoxobarbatusin and ciclobutatusin. Another compounds as 6 β -Hydroxycarnosol, barbatusol (Kelecom, 1983), carioical (Kelecom et al. 1985), coleonon E, coleon F, plectrinona A (Schultz et al., 2006), plectrinona B (Ruedi, 1986), identified in *P. barbatus*, have pharmacological or chemical importance. Agarwal & Parks (1982) report that *P. barbatus* extracts have been used in natural medicine in many countries for treatment of various cardiovascular disorders, respiratory, gastrointestinal and central nervous system. Fischman et al. (1991) demonstrated that aqueous extract of *P. barbatus* leaves

presents gastric hipossecretora action which decreases the acidity and amount of secretion of gastric juice.

Despite the widespread medicinal use of *P. barbatus* and diversity of isolated compounds, the active constituents accounting for the plant antacid/antiulcer activity and their mechanism of action are still unknown. *P. grandis* is popularly used in combating diseases related to the digestive tract. This species has similar morphological characteristics of *P. barbatus*, differing only in the "bitterness" of stems and leaves (Matos, 2000). 3 β -hydroxy-3-deoxobarbatusin and barbatusin were isolated from *P. grandis*, and to investigate their role in the folk medicine use of this plant, the gastroprotective activity of these compounds were investigate, in an experimental model of ethanol-induced gastric injury in mice and additionally evaluate their possible mechanisms of action.

2. Materials and methods

2.1. Plant Material

Plectranthus grandis (Cramer) Willense. leaves and stalk were collected from Garden of Medicinal Plants Francisco José de Abreu Matos of the Federal University of Ceará (HPM-FJAM/UFC), Ceará, Brazil, in September of 2001, identified by Dr. Raymond, M. Harley. A voucher specimen (28377) has been deposited at Herbarium Prisco Bezerra.

2.2. Extraction and isolation of barbatusin and 3 β -hydroxy-3-deoxibarbatusin

The dried leaves of *Plectranthus grandis* (990 g) were triturated and extracted with hexane for one week. The obtained solution was evaporated in rotaevaporator being obtained the hexanic extract and the left leaf material remaining was extracted with ethanol for one week. After this time the solvent was eliminated and the ethanol extract was submitted to a

silica gel chromatographic column of being eluted with the solvents hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The hexanic extract after chlorophyll removal was chromatographed in a silica gel column for isolation of barbatusin (**1**) (1.57 g, m.p = 142-145°C). The chloroform extract submitted to a column of silica gel furnished (**2**) (20 mg, PF = 205-207°C).

2.3. Spectral characterization of compounds (1) and (2)

IR spectra were recorded on Perkin Elmer FTIR spectrum 100 spectrophotometer and the values are expressed in cm^{-1} . NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer in CDCl_3 .

2.4. Reagents

Capsaicins, Capsazepine, glibenclamide, diazoxide, L-arginine, Nw-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Absolute ethanol was obtained from Synth (Brazil). All other chemicals used were of analytical grade.

2.5. Animals

Female Swiss mice (20-25g) obtained from the Central Animal House of this University were used. Experimental groups consisted of 8 animals per group. They were housed at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12-h light/12-h dark cycle and had free access to standard pellet diet (Purina chow) and tap water. The animals were deprived of food for 15 h before experimentation, but had free access to drinking water. The Institutional Ethics Committee on the Care and Use of Animals for experimentation approved the experimental protocols, and all experiments were performed in accordance with the guidelines of National Institute of Health, Bethesda, USA.

2.6. Gastric damage induced by ethanol

Groups of mice (n=8), were pre-treated with the vehicle (0.9% saline in a 0.5% of DMSO, 10mL/kg), N-acetylcysteine (NAC, 150 mg/kg, i.p.) OHBB or BB (2.5, 5, and 10 mg/kg, p.o.) 1h before the induction of gastric damage by oral administration of absolute ethanol (0.2 mL/animal) (Robert *et al.*, 1979). After 30 min, the animals were sacrificed, the stomachs excised, opened along the greater curvature, rinsed with saline (0.9%) and the mucosal lesion area (mm²) was measured by planimetry using a transparent grid (area: 1mm²) placed on the glandular mucosal surface and was expressed in percentage (%) in relation to total area of corpus. NAC the positive control used for model ethanol. After evaluating of the lesions induced by ethanol, the glandular parts of the stomachs were frozen and stored at -70 °C for further biochemical analyses.

2.7. Determination of gastric mucus

Gastric mucus was measured using the gastric mucosa obtained in the ethanol experiment. The gastric tissues were immediately transferred to 0.1% Alcian Blue solution prepared in 16 mM sucrose and 50 mM sodium acetate (pH 5.8) and stained for 2 h at room temperature. The segments were then rinsed twice with 25 mM sucrose solution for 15 and 45 min, and the dye, together with the gastric mucus with 5 mM magnesium chloride solution was extracted for 2 h. The extract was then mixed with equal volume of diethyl ether and centrifuged at 3600 rpm for 10 min. Absorbance was determined at 598 nm. The amount of mucus was calculated using standard curves of Alcian Blue (6.25-100.0 µg) (Corne *et al.*, 1974).

2.8. Antioxidant activity

Gastric strips were cut into small pieces and then homogenized in ice-cold 50 mM Phosphate buffer pH 7.4 to give 10% homogenate. The homogenate was then made into aliquots and used for the assessment of antioxidant parameters.

2.8.1. Determination of lipid peroxidation

Total thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were determined according to the method of Ohkawa et al. 1979. Gastric strips were cut into small pieces and then homogenized in ice-cold Phosphate buffer (50 mM pH 7.4) to give a 10% homogenate. The homogenates were transferred to test tubes and incubated in a water bath at 37°C for 60 min. After this period, 35% perchloric acid was added. The mixture was centrifuged at 14000 rpm for 10 min. Thiobarbituric acid at 0.6% was then added to the upper layer. The mixture was submitted to a water bath at 100°C for 30 min, after which the absorbance was measured at 532 nm. The standard curve was obtained using several concentrations of MDA solutions, expressed in nmol/g of wet tissue.

2.8.2. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD gastric activity was assessed according to the method of Beauchamp and Fridovich (1971) through measurement of the enzyme capacity for photochemical inhibition of nitroblue-tetrazolium (NBT). Nitroblue tetrazolium was used to intercept O_2^- generated enzymatically or photochemically. The reduction of NBT by O_2^- was used as the basis of assays for superoxide dismutase, which in its presence by inhibiting the reduction of NBT producing formazan, which is absorbed at 560 nm. Aliquots of tissue homogenates were centrifuged 12000 rpm for 20 min. In a dark room 50 μ L of phosphate buffer or supernatants were added to glass test tubes containing 1mL of reaction mixture (Phosphate buffer 50 mM, EDTA 100 nM and L-

methionine 19.5 mM pH 7.8). Then 150 μ L of NBT 750 μ M and 300 μ L riboflavin 10 μ M were added. After shaking the tubes were exposed to light (15 Watt) for 15min. The absorbance was measured at 560 nm. The results were expressed in enzyme units, representing the amount of SOD necessary to inhibit NBT reduction by 50%. The enzymatic activity was expressed as U/ μ g of protein.

2.8.3. Determination of CAT activity

CAT activity was measured by the method that employs hydrogen peroxide to generate H₂O and O₂ (Maehly and Chance, 1954). The activity was measured by the degree of the reaction. The supernatant (20 μ L) was added to a quartz cuvette containing 980 μ L de H₂O₂ 800 μ M, EDTA 25 μ M and tris buffer HCl (50 mM, pH 8.0). The change in absorbance was monitored at 240 nm over a 6-min period using a spectrophotometer. CAT activity was expressed as U/ μ g of protein.

2.8.4. Protein assay

The protein concentrations were determined by the Bradford (1976) method, using bovine serum albumin as standard.

2.8.5. Determination of non proteic sulphidrylic groups (NP-SH, GSH)

Reduced glutathione (GSH) was determined according to the method described by Sedlak and Lindsay, 1968. Aliquots (2 mL) of tissue homogenate were mixed with 1.6 mL of distilled water and 0.4 mL of trichloroacetic acid (TCA) 50% (w/v) in glass tubes and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatants (2 mL) were then mixed with 4mL of tris buffer (40 mM, pH 8.9) and 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB 10 mM) was added. After the lesions had been evaluated shaking the reaction mixture, its absorbance was measured

at 412 nm within 5 min of the addition of DTNB against the blank with no homogenate. The GSH concentration ($\mu\text{g/g}$ of wet tissue) was computed from a standard curve constructed using different concentrations of standard GSH.

2.9. Role of nitric oxide in the gastroprotective effect of OHBB and BB

To investigate the involvement of endogenous NO in the gastroprotective effect (Arrieta et al., 2003) the animals were divided in groups ($n=8$), 2 groups were pre-treated with L-NAME (20 mg/kg, s.c.) 1h before the treatments with vehicle (0.9% saline, 10 mL/kg) and/or OHBB (5.0, mg/kg, p.o.), or BB (10 mg/kg, p.o.). Other 2 groups of animals received L-arginine (400 mg/kg; i.p.), and one group, after 15 min received L-NAME (20 mg/kg s.c.). All groups received absolute ethanol (0.2 mL/animal). After 30 min of the ethanol administration, the animals were sacrificed; stomachs were removed and the area of gastric lesion was measured.

2.10. Role of K_{ATP} channels in the gastroprotective effect of OHBB and BB

In order to verify a likely activation of ATP-sensitive potassium channels in the gastroprotective effect, (Peskar et al., 2002) groups of mice ($n=8$) were pretreated with vehicle (0.9% saline, 10 mL/kg), and/or OHBB (5.0mg/kg, p.o.), or BB (10 mg/kg, p.o.) or diazoxide (3 mg/kg, i.p.) alone, or in their combinations with glibenclamide (5 mg/kg, i.p.) prior to the oral administration of 0.2 mL of ethanol (96%). The mice were given or OHBB (5.0mg/kg, p.o.), or BB (10 mg/kg, p.o.) 1 h before administering ethanol whereas diazoxide was administered 30 min prior to ethanol or glibenclamide. Glibenclamide was administered 30 min before OHBB or BB.

2.11. Effects of capsazepine pretreatments on OHBB and BB Gastroprotection

Groups of mice (n = 8) were pretreated with vehicle (0.9% saline, 10 ml/kg), and/or OHBB (5.0, p.o.), or BB (10 mg/kg, p.o.), and capsaicin (0.3 mg/kg, p.o.), alone, or in their combinations with capsazepene (5 mg/kg, i.p.) prior to the oral administration of 0.2ml of ethanol (96%). When given alone, OHBB, or BB, and capsaicin, was administered 1 h before ethanol. Capsazepene was administered 30 min, prior to ethanol.

2.12. Statistical analysis

The statistics were produced accomplished using the analysis of variance (ANOVA). When there was a significant difference among the groups, Student-Neewman-Keuls or Kruskall-Wallis post hoc test was applied for multiple comparisons. The results were expressed as the mean \pm standard deviation, being the differences considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Spectral characterization of compounds (1) and (2)

The ^1H and ^{13}C resonance magnetic nuclear and infrared spectra of these compounds were compared with literature data in the previous work of Zelnik et al. (1977). The difference between the two diterpenes is in carbon 3, in compound **1** there is a ketone group and in **2** there is an OH group. Compound **1** was characterized as barbatusin and compound **2** as 3 β -hydroxy-3-deoxobarbatusin. The structures of compounds are displayed in **Fig 1**.

3.2. Effect of OHBB and BB on gastric damage induced by ethanol

The oral administration of OHBB and BB at the tested doses of 2.5, 5 and 10 mg/ kg exhibited a dose-unrelated against ethanol-induced gastric lesions when compared to vehicle

group (Fig. 2A and 2B), the extent of inhibition for respective doses employed (53, 55, 96 %) and (9, 31, and 76 %) respectively. NAC the positive control include for this study also offered significant protection of a similar magnitude against ethanol (85% inhibition)-induced gastric lesion.

3.3. Effect of OHBB and BB on gastric mucus

The amount of gastric mucus was significantly ($p < 0.05$) less in the gastric tissues collected from ethanol-treated animals, as compared to non-damaged tissues from control. There was no difference between the group receiving OHBB with the injured group (**Fig. 3A**). The pre-treatment of animals with BB (10 mg/kg) greatly enhanced the gastric mucus, ($p < 0.01$) when compared to animals on ethanol injury (**Fig. 3B**).

3.4. Effect of OHBB and BB on gastric malonaldehyde, SOD, CAT, and NP-SH

The animals that received ethanol showed a significant increase ($p < 0.001$) in malonaldehyde levels (101.4 ± 4.72 tissue nmol/g) when compared to the control animals were given that the vehicle (65.71 ± 4.17 tissue nmol/g). OHBB (5 mg/kg) and BB (10 mg/kg) decreased the malonaldehyde produced by ethanol (57.43 ± 3.51 tissue nmol/g) and (52.63 ± 7.97 tissue nmol/g) respectively, in a significant way ($p < 0.001$) (for both). The treatment of the animals with OHBB (5 mg/kg) decrease the antioxidant enzyme SOD ($p < 0.01$), however the pre-treatment with BB increase the amount of SOD in the tissues. The administration of OHBB (5 mg/kg) was able to cause significant depletion of Catalase ($p < 0.001$), while the administration of BB (10 mg/kg) did not alter the amount of this enzyme in gastric tissue. The NP-SH level seen in gastric mucosa of normal control mice (280.1 ± 12.7 μ g/g) was significantly decreased 102.3 ± 10.4 mg/kg following the administration off ethanol (Table 2).

While pretreatment with NAC (150 mg/kg) almost completely replenished the ethanol depletion of NP-SH (239.5 ± 6.5 mg/kg), OHBB and BB markedly attenuated ($p < 0.001$) the depletion of gastric mucosal non-protein sulfhydryl of NP-SH (273.0 ± 21.7 and 262.6 ± 27.8 $\mu\text{g/g}$) respectively. The data are shown in tables 1 and 2.

3.5. Effects of capsazepine, role of nitric oxide and K_{ATP} - channels on the gastroprotective effect of OHBB and BB

The pre-treatment with TRPV1 receptor antagonist capsazepine and L-NAME was unable to reverse the gastroprotective effect of OHBB in lesions induced by ethanol (Fig. 4a and 4b). The pre-treatment with glibenclamide was able to reverse ($p > 0.05$) the gastroprotective effect of OHBB against lesions induced by ethanol (Fig. 4 C). Additionally, the effect of BB was significantly reduced ($p < 0.01$) in mice pre-treated with capsazepine (Fig. 5 A) and L-NAME (Fig. 5 B) ($p < 0.001$). The pre-treatment with glibenclamide was unable to reverse the gastroprotective effect of BB against lesions induced by ethanol (Fig. 5 C).

4. Discussion

The literature reveals that plants contain a large diversity of natural products that have demonstrated antiulcerogenic properties (Lewis and Hanson, 1991). The two diterpenes isolated from *Plectranthus grandis* OHBB and BB were tested against acute ulcer models in animals and demonstrated defence mechanisms to protect stomach mucous. Terpenes or its derivatives isolated from higher plants have been shown to display antiulcerogenic activity *in vivo* (Giordano et al., 1990; Lewis and Hanson, 1991; Matsuda et al., 1998; Rodríguez et al., 2002). However, its gastroprotective properties seems to act by different and many times complementary mechanisms, many of them exhibiting as common feature an improvement of

the mucosal defensive factors more than effects on the aggressive factors (Giordano et al., 1990; Lewis and Hanson, 1991; Hiruma-Lima et al., 1999). In the present study, OHBB and BB significantly protected the gastric mucosa against the injury induced by ethanol. The formation of gastric lesions in this model may be due to stasis in gastric blood flow which contributes to the development of the hemorrhage and necrotic aspects of tissue injury (Guth et al. 1984). The pretreatment of animals with BB (10 mg/kg) greatly enhanced the gastric mucus ($p < 0.01$), as compared to animals on ethanol injury. Treatment with ethanol induces solubilization of mucus constituents in the stomach, and a concomitant fall in the transmucosal potential difference, increasing the fluxes of Na^+ and K^+ into the lumen, pepsin secretion, lossing of H^+ ions and histamine content in the lumen (Guth et al. 1984; Szabo 1985).

ROS also have an important role in the pathogenesis of mucosal damage caused by indomethacin, ethanol and other agents (Elliot and Wallace, 1998). Antioxidant enzymes such as SOD, CAT, and GSH are the first line of defense against ROS. The administration of ethanol decreased the levels of SOD and GSH antioxidants and increased the LPO in stomach tissues of mice in comparison to healthy mice. In contrast to ethanol, doses of OHBB and BB showed increased levels of SOD and GSH and decreased effect on lipid peroxidation.

The pretreatment with TRPV1 antagonist capsazepine and L-NAME failed to effectively block the effects of the gastroprotective of OHBB (5 mg/kg) against ethanol damage. Capsaicin via includes sensory nerve fibers susceptible to capsaicin, which releases CGRP, and increase the formation of nitric oxide (KAUNITZ & AKIBA, 2004). These nerve endings and the mediators are involved with the protective mucosal response to luminal acid, including increasing of the mucosal blood flow and secretion of mucus and bicarbonate. Furthermore, the OHBB effect was significantly ($p < 0.01$) reduced in mice pretreated with glibenclamide. In general the authors suggest that regulation of opening and closing K^+_{ATP}

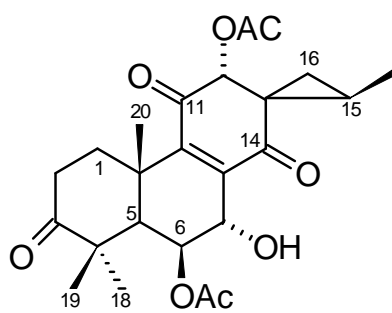
channels in the stomach can be a defense mechanism of external injuries in the gastric mucous. In the present work glibenclamide, a blocker of K^+_{ATP} channels significantly antagonized the protective effect of OHBB and diazoxide.

L-NAME (20 mg/kg s.c.) significantly blocked the gastroprotection produced by BB and L-arginine (400 mg/kg i.p.), suggesting NO participation in its gastroprotection. It is well known that NO is involved in the modulation of gastric mucosal integrity and is important in the regulation of acid and alkaline secretion, mucus secretion and gastric mucosal blood flow (Chandranath et al., 2002). The pretreatment with TRPV1 antagonist capsazepine failed to block effectively ($p>0,05$) the gastroprotective effect of BB (10 mg/kg) against ethanol damage.

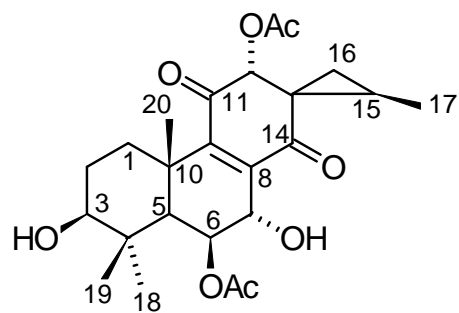
In conclusion, compounds OHBB and BB demonstrated significant anti-ulcer activity by oral administration. This effect could be related to an increase of gastric-mucosal defensive mechanisms mediated, in part, by K^+_{ATP} channel opening for OHBB and by activation of TRPV1 nitric oxide release, for BB. The protective role for OHBB and BB affording gastroprotection against gastric damage induced by ethanol indicates that these compounds contribute for the activity of *P. grandis* and *P. barbatus*. The different modes of action are probably related to differences in chemical structures.

Acknowledgements

The authors thank the for the financial support of FUNCAP (Ceará State Research Funding) and CNPq (National Council for Technological and Scientific Development, Brazil)



(1)



(1)

Fig. 1. Chemical structure of barbatusin (1) and 3β-hydroxy-3-deoxobarbatusin (2)

Table 1.

Effects of alcohol intake alone and after administration of either Barbatusin and OHBB contents of CAT SOD, MDA and NP-SH and in mouse stomachs.

Treatment	Dose	CAT (U/g protein)	SOD (U/g protein)	MDA (nmol g/g tissue)	NP-SH (μ g/g tissue)
No lesion	-	14.18 \pm 0.70	6,95 \pm 0,62	65.71 \pm 4.17	280.2 \pm 12.6
Vehicle	0.2 ml/animal	13.66 \pm 0.57	4,94 \pm 0,19 ^a	101.4 \pm 4,72 ^a	102.3 \pm 7.4 ^a
OHBB	5 mg kg-1	8.52 \pm 0,99 ^{ab}	8,75 \pm 0,80 ^b	57.43 \pm 3.51 ^b	273.0 \pm 21.7 ^b
NAC	150 mg kg-1	16.20 \pm 0.86	7,435 \pm 0,81 ^b	56.06 \pm 5.92 ^b	239.5 \pm 5.7 ^b

Data are mean \pm S.E.M of 8 animals in each group. ^a p < 0.05 vs. Control (no lesion); ^b p < 0.05 vs. Control (vehicle) (ANOVA followed by Student Newman Keul's test).

Table 2.

Effects of alcohol intake alone and after administration of either BB and on the contents of CAT SOD, MDA and NP-SH and in mouse stomachs.

Treatment	Dose	CAT (U/g protein)	SOD (U/g protein)	MDA (nmol g/g tissue)	NP-SH (μ g/g tissue)
No lesion	-	14.18 \pm 0.70	6,95 \pm 0,62	65.71 \pm 4.17	280.2 \pm 12.6
vehicle	0.2 ml/animal	13.66 \pm 0.57	4,94 \pm 0,19	101.4 \pm 4,72 ^a	102.3 \pm 7.5 ^a
BB	10 mg kg-1	12.82 \pm 1.32	9,12 \pm 1,14 ^b	52.63 \pm 7.97 ^b	262.6 \pm 27.8 ^b
NAC	150 mg kg-1	16.20 \pm 0.86	7,435 \pm 0,81	56.06 \pm 5.92 ^b	239.5 \pm 5.7 ^b

Data are mean \pm S.E.M of 8 animals in each group. ^a p < 0.05 vs. Control (no lesion); ^b p < 0.05 vs. Control (vehicle) (ANOVA followed by Student Newman Keul's test).

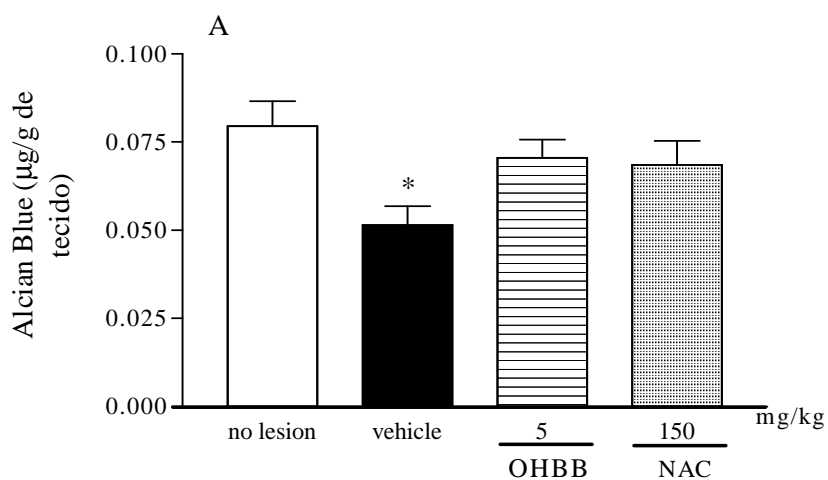
Figure. 3

Fig. 3 A. Effect of the OHBB treatment on the amount of mucus after induction of gastric lesion by ethanol in mice. The results are expressed as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ in comparison to no lesion group (ANOVA followed by Student Newman Keul's test).

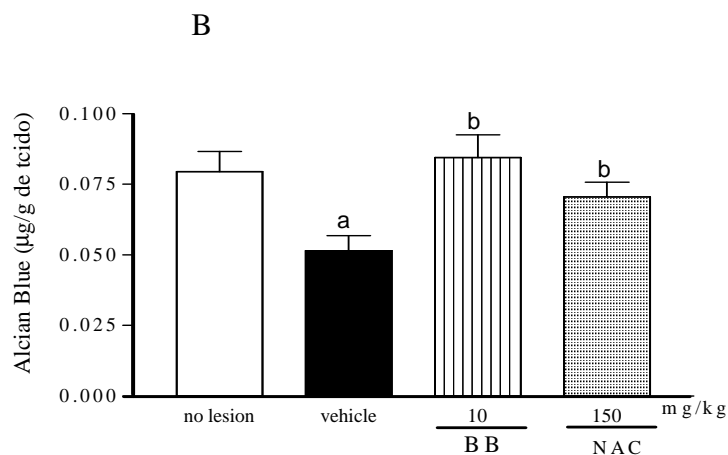


Fig. 3 B. Effect of the BB treatment on the amount of mucus after induction of gastric lesion by ethanol in mice. The results are expressed as mean \pm S.E.M. ^a $p < 0.05$ in comparison to no lesion group; ^b $p < 0.05$ in comparison to vehicle control (ANOVA followed by Student Newman Keul's test).

References

- Abdel-Mogib, M., Albar, H.A., Batterjee, S.M., 2002. Chemistry of the Genus *Plectranthus* Molecules 7, 271-301.
- Agarwal, K.C., Parks J.R., R.E., 1982. Synergistic inhibition of platelet aggregation by forskolin plus PGE₁ or 2 - fluoroadenosine: effects of 2', 5' - dideoxyadenosine and 5' - methylthioadenosine. Biochemical Pharmacology 31, 3713-3716.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochemistry 44,276-287.
- Bhat, S.V. et al. 1977. Structures and stereochemistry of new labdane diterpeneoids from *Coleus forskohlii* Brinq. Tetrahedron Letters 19, 1669-72.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.
- Buck, H., Burks, T.F., 1986. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. Pharmacological Reviews 38, 179–226.
- Buznego, M. T., Perez-Saad, H., 1999. Effect antiepiléptico de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés). Revista de Neurologia 29, 388-389.
- Cerqueira, F. Silva, A.C., Marques, C.G., Simões F., Pinto., M.M.M., Nascimento, M.S.J., 2004. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B- lymphocyte proliferation. Bioorganic & Medicinal Chemistry 12, 217-223.
- Chandranath, S.I., Bastaki, S.M., Singh, J., 2002. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanoland indomethacin-induced gastric lesions in the rat. Clinical Experimental Pharmacology and Physiology 29: 173–180.
- Corne, S.J., Morrisey, S.M., Woods, R.J., 1974. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. Journal of Physiology 224:116-117.

- Costa, M., do C., Nascimento, S. C., 2003. Atividade citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). Revista Acta Farmacêutica Bonaerense, 22: 155-158.
- Dash, V.B., Kashyap, V.L., 1987. Materia Medica of Ayurveda based on Ayurveda Saukhyan of Tadarananda. Concept Publishing Company, New Delhi.
- Elisabetsky, E., 1997. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: Ribeiro, Darcy (Ed.) Suma Etnológica Brasileira. Etnobiologia. Petrópolis, RJ: Vozes: 1.
- Elliot, S.N., Wallace, J.L., 1998. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. The Canadian Journal Gastroenterology 12: 559–568.
- Fischman, L.A., Lapa, A.J., Skoropa, L.A. & Souccar, C. 1991. The water and extract of *Coleus barbatus* Benth. decrease gastric secretion in rats. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 86: 141-143.
- Giordano, O.S., Guerreiro, E., Pestchanker, M.J., Guzman, J., Pastor, D., Guardia, T. 1990. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. Journal of Natural Products 53; 803-809.
- Guth, P.H., Paulsen, G., Nagata, H., 1984. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rats: effects of prostaglandin cytoprotection Gastroenterology 87: 1083–1090.
- Hagiwara, H., Takeuchi, F., Hoshi, T., Suzuki, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., 2003. First synthesis of 1,9-dideoxyforskolin from ptychantin A Tetrahedron Letters 44: 2305-2306.
- Hamilton, A.I., 2003. Medicinal plants and conservation: issues and approaches. International Plants Conservation Unit, WWF-UK.
- Hayllar, J., Bjarnason, I., 1995. NSAIDs, Cox-2 inhibitors, and the gut. Lancet 346: 521-522.

- Hiruma-Lima, C., Spadari-Bratfisch, R., Grassi-Kassisse, D., Souza-Brito, A., 1999. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 65: 325-330.
- Holzer, P., 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews* 43:143–201.
- Kelecom, A., 1983. Isolation, structure determination, and absolute configuration of barbatusol, a new bioactive diterpene with a rearranged abietane skeleton from the labiate *Coleus barbatus*. *Tetrahedron* 39: 3603- 3608.
- Kelecom, A., Dos Santos, T.C., 1985. Cariocal, a new seco-abietane diterpene from the Labiate *Coleus barbatus*. *Tetrahedron Letters* 26: 3659–3662.
- Kelecom, A., 1983. 6 β -hydroxycarnosol, a new minor diterpene from the false boldo *Coleus barbatus* Bentham (Labiatae). *Química Nova* 6: 117-118.
- Lewis, D.A., Hanson, P.J., 1991. Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin, Ed. G.P. Ellis, G.B. West, *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 28, 201-231.
- Lorenzi, H. & Matos, F.J.A., 2002. *Plantas medicinais no Brasil*. Nova Odessa, Plantarum p. 512.
- Maehly, A.C., Chance, B., 1954. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal* 1, 357-424.
- Marques, C.G., Rijo, P., Simões, M. F., Duarte, A., Rodriguez, B., 2006. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine* 13: 267-271.
- Matos, F. J. A., 2000. *Plantas Medicinais – guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 2ª ed. Fortaleza: Imprensa Universitária - UFC.

- Matsuda, H., Li, Y., Murakami, T., Yamahara, J., Yoshikawa, M., 1998. Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats *Life Sciences* 63:245- 250.
- Morris, B., 1996. Chewe medical botany. A study of herbalism in Southern Malawi. Monograph from the International African Institute : v. 2. LIT Verlag.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
- Parkia, M., Cooke, J.A., 2003. The ethnobotany of the Midzichenda tribes of the coastal forest areas in Kenya. 2. Medicinal plant uses. *South African Journal of Botany* 69: 382–395.
- Passinho, H.C.R., Margis, R., Felix, D., *et al.* 2000. Genetic differentiation between *Plectranthus grandis* cramer and *Plectranthus barbatus* andr. (Lamiaceae) *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 292-292.
- Peskar, B.M., Ehrlich, K., Peskar, B.A., 2002. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin mediated gastroprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 969-974.
- Rijo, P., Marques, C.G., Simões, M.F., Duarte, A., Apreda-Ojas, M.D., Cano, F.H., Rodriguez, B., 2002. Neoclerodane and labdane diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. *Journal of Natural Products* 65: 1387-1390.
- Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Hanchar, A.J., 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCL, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury *Gastroenterology* 77:433-443.
- Rodriguez, J.A., Bustamante C., Astudillo, L., Schmeda-Hirschmann, G., 2002. Gastroprotective activity of solidagenone on experimentally induced gastric lesions in rats *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54: 399-404.

- Ruedi, P., 1997. Physiologically Active Constituents from Medicinal Plants: Multiple Biological Screening, Bioactivity Guided Isolation, Synthetic and Stereochemical Aspects *Helvetica Chimica Acta* 80: 436.
- Szabo, S., Trier, JS., Brown, A., Schnoor, J., 1985. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 88: 228-236.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Analytical Biochemistry* 25,192-205.
- Schultz, C., Bossolani, M. P., Torres, L., M.B., Lima- Landman, M.T.R., Lapa, A.J., 2007. Inhibition of the gastric H⁺, K⁺- ATPase by plectrinone A, a diterpenoid isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews *Journal of Ethnopharmacology* 111:1-7.
- Souccar, C., 2002. Métodos utilizados para validação de plantas medicinais com atividade gastrintestinal. In: XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Cuiabá.
- Szabo, S., 1987. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: Time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies *Scandinavian Journal Gastroenterology* 22: 21–28.
- Tandon, J.S. et al., 1977. Structure of coleonol, a biologically active diterpene from *Coleus forskohlii* *Indian Journal of Chemistry* 15:880-883.
- Wellsow, J., Grayer, R. J., Veitch, N. C., Kokatan, T., Lelli, R., Kite, G. C.; Simmaids, M.S.J., 2006. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus* *Phytochemistry* 67:1818 -1825.
- Zelnik, R., Lavie, D., Levy, E.C., Wang, A.H-J., Paul, I.C., 1977. Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoids from *Coleus barbatus* Benth. *Tetrahedron* 33:1457-1466.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos do extrato etanólico das folhas de *B. sericea* (BSLE) permitiu tirar as seguintes conclusões:

- ✓ Análises químicas do BSLE por HPLC indicaram a presença como compostos majoritários dos flavonóides: quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona), isoquercetina (quercetina 3-*O*-glucosídeo), rutina (quercetina 3-*O*-rutinosídeo) e Caempferol 3-*O*-rutinosídeo, sugerindo que estes compostos possam ser os responsáveis pelo efeito gastroprotetor, visto que eles possuem várias atividades biológicas relatadas.
- ✓ BSLE, nas doses testadas não apresentaram toxicidade, nem causaram morte nos animais;
- ✓ BSLE inibiu o trânsito intestinal na dose de 1000 mg/kg, sugerindo um efeito antidiarrêico do extrato;
- ✓ BSLE apresentou atividade gastroprotetora em modelos experimentais de lesões gástricas agudas induzidas por etanol e indometacina;
- ✓ BSLE evitou a depleção dos grupos sulfidrilas não-proteicos, e reduziu a formação de malonaldeído no modelo de lesão gástrica induzida por etanol, indicando uma ação antioxidante como parte do seu mecanismo de ação gastroprotetora;
- ✓ O estudo do mecanismo citoprotetor do BSLE indica um possível envolvimento, do receptor TRPV1 nas fibras aferentes sensíveis à capsaicina, óxido nítrico e a abertura de canais de potássio sensíveis a ATP no modelo de lesão gástrica por etanol;
- ✓ O possível efeito gastroprotetor do BSLE pode estar relacionado ao aumento de fatores protetores da mucosa gástrica, como a ativação de mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos (CAT e SOD), e com a manutenção de muco;

Os principais resultados obtidos dos diterpenos 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina (OHBB) e barbatusina (BB), isolados da planta *Plectranthus grandis* mostraram que:

- ✓ OHBB e BB apresentaram atividade gastroprotetora em modelos experimentais de lesão gástrica aguda por etanol;
- ✓ OHBB e BB demonstraram ação gastroprotetora possivelmente, evitando a depleção dos grupos sulfrídilas não-proteicos e a redução da formação de malonaldeído no modelo de lesão gástrica induzida por etanol, indicando uma ação antioxidante como parte do seu mecanismo;
- ✓ O provável efeito gastroprotetor do OHBB pode está relacionado como a ativação da enzima antioxidante SOD;
- ✓ O estudo do mecanismo citoprotetor da OHBB indica uma possível participação, dos canais de K_{ATP} no seu efeito protetor;
- ✓ A investigação do envolvimento dos receptores vanilóides do tipo TRPV1 presentes nas fibras aferentes sensíveis à capsaicina, e do óxido nítrico, parecem que não estão envolvidos no mecanismo gastroprotetor da OHBB;
- ✓ O possível efeito gastroprotetor do BB pode está relacionado ao aumento de fatores protetores da mucosa gástrica, mantendo os níveis da catalase e da superóxido desmutase, evitando a diminuição de muco;
- ✓ No modelo de lesão gástrica induzida por etanol, tanto os receptores vanilóides do tipo TRPV1, bem como o L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, reverteram de maneira significativa o efeito gastroprotetor da BB, demonstrando um provável envolvimento nesses mecanismos;

- ✓ No estudo envolvendo os canais de potássio sensíveis a ATP, a glibenclamida não conseguiu reverter o efeito gastroprotetor da BB; evidenciando um não envolvimento desses no efeito da BB.

- ✓ Provavelmente as diferenças entre as estruturas químicas dos compostos OHBB e BB são responsáveis pelos diferentes mecanismos de ação de cada um.

PERSPECTIVAS

O extrato etanólico de *B. sericea* apresentou efeito gastroprotetor através dos experimentos farmacológicos realizados sem apresentar toxicidade nas doses testadas. A análise química deste extrato revelou a presença de quatro flavonóides, e, portanto, seria importante o isolamento de cada um desses compostos para avaliar a relação entre as suas estruturas químicas e as suas ações antioxidantes na gastroproteção. Desta forma esta planta seria validada cientificamente, podendo assim ser utilizada como fitoterápico para uso em animais e humanos após testes clínicos e adicionais testes farmacológicos.

Os diterpenos isolados da *P. grandis* apresentaram efeitos gastroprotetores significativos. A continuidade de estudos farmacológicos e clínicos permitirá avaliações adicionais que poderão levá-los a se tornarem matérias-primas de medicamentos a serem disponibilizados no mercado nas formas de fitofármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICAN, I.; KUBES, P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. **The American Journal of Physiology**. v.270, p.225-237, 1996.

AL-SHABANAH, O.A.; RAZA, M.; AL-HARBI, M.M.; AL-BEKAIRI, A.M.; AL-GHARABLY, N. M.; QUERESHI, S. Effect of ninhydrin on biochemical and histopathological changes induced by ethanol in gastric mucosa of rats. **Life Sciences**, v.67, p.559-566, 2000.

ARCOLINE, T. Plantas Mediciniais, saúde e cura pelas plantas. **Fitoterapia**. São Paulo: On Line, n. 1, p. 34, 2003.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S. & DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & other Lipids Mediators**, v. 61, p. 105-124, 2000.

BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M.; DOELMAN, C.J.A. – Oxidants and antioxidants: state of the art. **American Journal of Medicine**, (suppl 3C), v.91 p.2-13, 1991.

BEEJAY, U.; WOLFE, M.M. Acute gastrointestinal bleeding in the intensive care unit. **Gastroenterology Clinics North America**, n. 2, v.29, p. 309-335, 2000.

BÉJAR, E.; MALONE, M.H. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p. 141-158,1993.

BHAT, S.V. et al. Structures and stereochemistry of new labdane diterpeneoids from *Coleus forskohlii* Brinq. **Tetrahedron Letters** v.19, p.1669-1672,1977.

BLACHSHAW, J.K.; KELLY, W.R. Effects of gastric ulceration on growth rate of intensively reared pigs. **Vet. Rec**, v.106, p.52-54,1980.

BOOTHE, D.M. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice. **Gastrointestinal Pharmacology**, v. 29, n.2, p. 343-76, 1999.

BORGES, J.R.J.; et al. “Doenças do abomaso em bovinos importados e “POI” no Estado do Rio de Janeiro, Brasil”, **XV Congresso Pan-americano de Ciências Veterinárias**, Campo Grande, MS, outubro de 1996.

BOSCOLO, O.H.; MENDONÇA-FILHO, R.F.W.; MENEZES, F.S.; SENNA-VALLE, L. Potencial antioxidante de algumas plantas de restingas citadas como medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 8-12, 2007.

BUEGE, J.A. E.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. v. 52, p. 302-310, 1978.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; I.T.F.; MACEDO, L.M.B.; OLIVEIRA, R.R.; BRAGA, SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S.; NAVARRO, A.M.C.; Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.154 p.167-170, 2008.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 48 p.288–294, 2007.

CHEN, F.A.; WU, A.B., SHIED.; KUO, D.H. Evaluation of the activity of *Rothelia tuberosa*. **Food Chemistry** v.4, p.14-18, 2006.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. Capítulo 15. p. 301-332, 2001.

CHIDA, V.V.; MOREIRA, M.B.; LEME, L.F.P.; et al. Study of the hepatic function in spontaneously hypertensive rats submitted to different pressures of the CO₂ pneumoperitoneum. **Acta Cirurgica Brasileira**, n.1, v.18, p.01-12, 2003.

CHUANG, C.N.; CHEN, M.C.Y.; SOLL, A.H. gastrin-Histamine interections: direct and paracrine elements. **Scandinavian Journal Gastroenterology**, v.26, p.95-103, 1991.

COHEN, G. & HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, v.2, p.1420-1428, 1963.

COSTA, M.; e BROOKES, S.J.H. The enteric nervous system. **American Journal of Gastroenterology**, v.89, p.129-137,1994.

COSTA, M.C.C.D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae):revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003 **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**.v. 8, p.81-88, 2006.

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. 1.ed. Campinas: André Tosello, p. 10, 1996.

EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.118, p.3-4, 1991.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, p. 872-9, 2002.

GIRÃO,V.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.; MORAIS, S.M.; SEQUEIRA, J.L.; GIOSO, M.A. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham. Essential oils in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v.59, p. 95–102, 2003.

GISLASON, H.; SORBYE, H.; ABDI-DEZFULI, F.; WALDUM, H.L.; SVANES, K. Role of prostaglandins and histamine in hyperemic response to superficial and deep gastric mucosal injury and H⁺ back-difusion in cats. **Digestive Diseases and Sciences**, v.40, p.1669-1678, 1995.

GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; CARRETERO, E.; VILLAR, A . *Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.70, p.329-333, 2000.

GULÇIN, I.; OTAY, M.; KIREÇCI, E.; KUFREVIOGLU, O.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v.83, p.371-382, 2003.

GUO, G.; YANG, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, J. Antioxidante activities of peel, pulp and seed of common on fruits as determined by FRAP. **Nutrition Resesearch**, v.23, p.1719, 2002.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.**, 1 ed, p.358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**, 2° ed. Oxford, University Press. p. 543, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Journal of Biochemistry**, v.4, p. 291, 1985.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since. **Phytochemistry**, v.52, p.481-504, 2000.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAWKEY, C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology**, v. 119, p. 521-535, 2000.

HAWKEY, C.J.; RAMPTON, D.S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? **Gastroenterology**, v.89, p.1162-1188, 1985.

HENDLER, S.S. **Vitamin and Mineral Encyclopedia**, San Diego. Simon e Schuski, p. 576, 1990.

HOGBEN, C.A.M.; KENT, T.H.; WOODWARD, P.A.; SILL, A.J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog cat, guinea pig, and frog. **Gastroenterology**, v. 67, p.1143-1154, 1974.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, p. D1-6, 2000.

KELECOM, A. 6 β -hydroxycarnosol, a new minor diterpene from the false boldo *Coleus barbatus* Bentham (Labiatae). **Química Nova**, v. 6, p.117-118, 1983.

KUTCHAI, H.C. **Gastrointestinal secretions. In: principles of Physiology.** Ed. By R.M. Berne and M.N. Levy, 2nd Edition, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, Missouri, p. 516-589, 1996.

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

LIPTAK, J.M.; HUNT, G. B.; BARRS, V.R.D.; FOSTER, S F.; TISDALL, P.L.C. O'BRIEN, C. R. Gastroduodenal ulceration in cats: eight cases and a review of the literature **Journal of feline Medicine and Surgery**, v.4, p.27-42, 2002.

LOLINGER, J. **The use of anioxidante in food**, In: O Auroma & B . Halliwel, Free radical in food additives. London, Taylor & Francis, p. 121,1991.

LONGHURST, J.C.; KAUFMANN, M.P.; ORDWAY, G.A.; MUSCH, T.L. Effects of bradykinin and capsaicin on endings of aferent fibers from abdominal visceral organs. **American Journal Physiology - Regulatory Integrative Comparativa Physiology**, v.247, p. 552- 559, 1984 (b).

LONGHURST, J.C.; STTEBINS, C.L.; ORDWAY, G.A. Chemically induced cardiovascular reflexes arising from the stomach of the cat. **American Journal Physiology-Heart Circulatory Physiology**, v.247, p.459-466, 1984 (a).

LUCEY, M.R.; YAMADA, T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. **Digestive Disease Science**, v.34, p.5-13, 1989.

LUKHOBBA, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.1–24, 2006.

MABBERLEY, D. J. **The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants.** Cambridge University Press. 4° ed. New York, p.520, 1993.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer - recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.253, p.329–338, 2003.

MARINHO, M.L.; ALVES, M.S.; RODRIGUES, M.L.C.; ROTONDANO, T.E.F.; VIDAL, I.F.; SILVA, W.W.; ATHAYDE, A.C.R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, p.64-69, 2007.

MARQUES, J.L.L.; MORES, N., SOBESTIANSKY, J., CIACCI, J.R. Causas de morte súbita em suínos: III. Úlcera Gástrica EMBRAPA-CNPQA. **Comunicado técnico Junho**, p.1-3, 1998.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R.; CAZARES LUNA, L.; MORENO GUTIÉRREZ, M.N.; GARCÍA-ARGÁEZ, A.N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p.79-82, 1999.

MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais - guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**, Impr. Universitaria / Edições UFC, Fortaleza, p. 344, 2002.

MCBRIDE, O.W.; MITCHELL, A.; LEE, B.J.; MULLENBACH, G.; HATFIELD, D. Gene for selenium-dependent glutathione peroxidase maps to human chromosomes 3, 21 and X. **BioFactors**, v.1, p. 285-292, 1988.

MELO de A, E.; QUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. Bol. **SBPCTA**, Campinas, n.1, v.36, p.1-11, 2002.

MENDES, C.C.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M.; NASCIMENTO, I.P.; DAVID, J.P.; Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, v.22, p.185-188, 1999.

MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosa injury in rats. **Physiology Research**, v. 49, p.441-46, 2000.

MURRAY, M.J. Gastroduodenal ulceration. In: ROBINSON, N.E. (Ed.) **Current therapy in equine medicine**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.191-197, 1997.

MURRAY, M.J., SCHUSSER, G.F.; PIPERS, F.S. et al. Factors associated with gastric lesions in Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.368-374, 1996.

PAGLIA, D.E.; & VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.70, p.158-169, 1967.

PASSINHO, H.C.R.; MARGIS, R.; FELIX, D.; *et al.* Genetic differentiation between *Plectranthus grandis* cramer and *Plectranthus barbatus* andr. (Lamiaceae) **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.72, p. 292-292, 2000.

PEREIRA, B.; CURY, R.; COSTA ROSA, L.F.B.; SAFI, D.A.; MEDEIROS, M.H.G.; BECHARA, J. H. Seperoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in immune organs and muscles of sedentary and exercised trained rats. **Physiology & Behavior**, v. 56, p. 1095-1099, 1994.

PESKAR, B.; M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, p. 3-9, 2001.

PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNA, S, J.; HOLM, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxta mucosal pH. **American Journal Physiology Gastrointest and Liver Physiology**, v. 282, p. 211-219, 2002.

PULLA-REDDY, A.C.P.; LOKESH, B.R. Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats. **Toxicology**, n.1, v. 107, p. 39-45, 1996.

RASTRELLI, L.; DETOMMASI, N.; BERGER, I.; CACERES, A.; SARAIVIA, A.; DE SIMONE, F. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v.45, p. 647-650, 1997.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.L. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

RODRÍGUEZ-TÉLLEZ, M.; ARGÜELLES, F.; HERRERÍAS, J. M. Jr.; LEDRO, D.; ESTEBAN, J. & HERRERÍAS, J. M. Antiinflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 951-976, 2001.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Pathologic Basics of disease**, 6.ed. New York: W.B. Saunders Company, p.1425, 1998.

SAIRAM, K.; RAO, C.H.V.; DORA BABU, M.; VIJAY KUMAR, K.; AGRAWAL, V.K.; GOEL, R.K. Antiulceratogenic effect of methanolic extract of *Embllica officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 1-3, 2002.

SALUCCI, M.; STIVALA, L. A.; MAIANI, G.; BUGIANESI, R.; VANNINI, V. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells. **British Journal of Câncer**, v. 86, p.1645-1651, 2002.

SÁNCHEZ DE M, F.; VERA, B.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat, **Life Sciences**, v.70, p. 3097-3108, 2002.

SANIOTO, D.L. **Sistema digestivo: secreção e digestão**, In: Fisiologia, Ed. Por M. Mello Aires, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.601-629, 1991.

SANNORNIYA, M.; FONSECA, V. B. DA SILVA.; M.A.; ROCHA, L.R.M.; DOS SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA BRITO, A.K.M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1- 6, 2005.

SCHUBERT, M.L.; SHAMBUREK, R.D. Control of acid secretion. **Gastroenterology Clinics of America**, v. 19, p. 21-25, 1990.

SHAH, V.; KAMATH, P.; DE GROEN, P. Physiology of the splanchnic circulation. In: Theory and practice of vascular diseases (**Topol E, Lanzer F, eds**) Germany: Springer Verlag, p.1688-1694, 2002.

SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. **Gastroenterology**, v.126, p.903-913, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, (suppl 3C) v. 91, p.31-38, 1991.

SLATER, T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury, **Journal of Biochemistry**, v.222, p.1-15, 1984.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1/3, p. 1-15, 1996.

STAMLER, J.; LAMAS, S.; FANG, F. Nitrosylation: the prototypic redox based signaling mechanism. **Cell**, v.106, p.675-683, 2001.

SUNDLER, F.; EKBLAD, E.; HAKANSON, R. The neuroendocrine system of the gut-an update. **Acta Oncologica**, v.30, p.419-427, 1991.

TANDON, J.S. et al.; Structure of coleonol, a biologically active diterpene from *Coleus forskohlii* **Indian Journal of Chemistry**, v.15, p.880-883, 1977.

TSUKIMI, Y.; OKABE, S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. **Physiological Reviews**, v. 24, p.1-9, 2001.

TWEDT, D.C.; MAGNE, M.L. **Moléstia do estômago**. In: ETTINGER, J.S. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3^a ed. São Paulo: Manole, p 1353-1386, 1992.

VÁZQUEZ, M.M.; ESQUINCA, ARG.; LUNA, L.C.; GUTIERREZ, M.N.M.; ARGAEZ, A.N.G.. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia*. **Journal Ethnopharmacology** v. 66, p.79-82, 1998.

WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal of Medicine**, v.110, p. 19-23, 2001.

WENG, X.C.; WANG, W. Antioxidante activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. **Food Chemistry**, v. 71, p. 489-493, 2000.

WHITLOCK, R. Abomasal ulcers. In: Howard & Smith, *Curent Veterinray Therapy: Food animal practice*, Philadelphia: Saunders, 1999. p. 527-532.

WHITTLE, B.J.R.; VANE, J.R. Prostanoids as regulators of gastrointestinal function. In: **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, ed. By L.R. Johnson, 2nd ed.; Raven Press, New York, p. 143-180, 1987.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p.139-161, 1994.

ZAYACHKIVSKA, O.S.; KONTUREK S.J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M.R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **Journal Physiology Pharmacology**, v.56, p. 219-231, 2005.

ZELNIK, R.; LAVIE, D.; LEVY, E.C.; WANG, A.H.J.; PAUL, I.C. Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoids from *coleus barbatus bentham*. **Tetrahedron**, v. 33, p. 1457-67, 1977.

ZHAN, J.; ZHOU, P.A. Simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricius agglutinin. **Toxicology**, v. 186, p. 119-123, 2003.

ANEXOS

----- Mensagem Original -----
Assunto: Submission Confirmation
De: "Phytomedicine" <h.wagner@cup.uni-muenchen.de>
Data: Ter, Outubro 21, 2008 5:34 pm
Para: selene@uece.br

Dear Selene,

We have received your article "Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC. leaf extract against ethanol-induced gastric injury: potential mechanisms" for consideration for publication in *Phytomedicine*.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Phytomedicine

Prezado(a) Prof.(a) Dr.(a) **Patrícia Rodrigues**,

Confirmando o recebimento do manuscrito intitulado "**Efeito do extrato etanólico de *Byrsonima Sericea* DC. No sistema gastro – intestinal e avaliação da toxicidade em camundongos**", de autoria de **Patrícia Rodrigues** e col., para publicação na REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. Informo que este trabalho recebeu o número de controle **FG 734**. De acordo com as normas da revista, o mesmo foi encaminhado a dois referees. Assim que tivermos os resultados lhe comunicaremos.

Atenciosamente,

Rita de Cássia Bacelar

Secretária Executiva

REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA