UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HÉLIDA MARIA DE LIMA MARANHÃO

ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIULCEROGÊNICA, HEPATOPROTETORA E SEGURANÇA DE USO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE *Simarouba amara* Aublet (SIMAROUBACEAE)

Recife
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HÉLIDA MARIA DE LIMA MARANHÃO

ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIULCEROGÊNICA, HEPATOPROTETORA E SEGURANÇA DE USO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE *Simarouba amara* Aublet (SIMAROUBACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Recife
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

M311a Maranhão, Hélida Maria de Lima.
Atividades anti-inflamatória, antiulcerogênica, hepatoprotetora e segurança de uso do extrato aquoso da casca do caule de *simarouba amara aublet* (simaroubaceae) / Hélida Maria de Lima Maranhão. – Recife: O autor, 2014.
116 f: il.; fig.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Anti-inflamatórios. 2. Antiulcerosos. 3. Hepatoprotetores. 4. Simarouba amara. 5. Taninos. I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-178)

HÉLIDA MARIA DE LIMA MARANHÃO

ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIULCEROGÊNICA, HEPATOPROTETORA E SEGURANÇA DE USO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE *Simarouba amara* Aublet (SIMAROUBACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 08 de Agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Simone do Nascimento Fraga (Examinadora Externa)
CAV / Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André Sampaio Pupo (Examinador Externo)
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profª. Drª. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profª. Drª. Ana Cristina Lima Leite

Ao meu filho Davi, ao meu esposo Carlos, aos meus pais João e Lourdes e à minha amada avó Rita (in memorian).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida e por mais uma conquista, a Ele toda à glória.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley pela orientação concedida neste trabalho, pela compreensão e conhecimentos transmitidos. Muito obrigada!

Aos Professores: Dr. Haroudo Sátiro, Dr. Jacinto Costa, Dr. Pedro Rolim, Dra. Larissa Rolim, Dra. Alice Valença Araújo, Dr. João Henrique e à Dra. Mariana P. Fernandes pelo auxílio concedido em etapas de desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Produtos Bioativos e, em especial, à Rejane Souza.

Em especial a Carlos Brasileiro, meu esposo, pelo amor, companhia, dedicação sempre presentes em todos os momentos e pelo auxílio prestado no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu filhinho Davi, pela alegria que me dá, pois foi um presente que Deus me concedeu durante esse período.

Aos meus pais João e Lourdes, à minha irmã Marcela, às minhas tias Graça, Carminha e Maria das Neves, enfim, a toda família, pelo apoio incondicional, amo vocês!

À Sra. Aldira Brasileiro e Edna Santos Nascimento. Obrigada pelo auxílio.

Ao Sr. Jurandir Teixeira Vilela "Sr. Dande" (*in memorian*) e a João Teixeira da Rocha, pelo grande auxílio na localização e coleta de *Simarouba amara*.

Aos amigos Gustavo Dimech e Eduardo da Silva Gonçalves, muito obrigada!

Aos amigos do Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF): Adriana Jucá, Conciana Duarte, Silvia Luna, Ana Nery Xavier, Rafaela Fernandes, Washington Santos e Mateus Meira.

“O perfeito louvor Vos é dado pelos lábios dos mais pequeninos, das criancinhas que a mãe amamenta”. (Sl.8,3)

RESUMO

Simarouba amara é encontrada em quase todas as regiões brasileiras. A decocção da casca do seu caule é usada no tratamento da malária, inflamações, diarreia e como tônico. Esse estudo caracterizou quimicamente a casca do caule assim como investigou as ações anti-inflamatória, antiulcerogênica e hepatoprotetora do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* (EASA) em paralelo aos ensaios de toxicidade. O perfil fitoquímico foi avaliado por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os efeitos farmacológicos do EASA (100, 250 e 500 mg/kg de massa corporal, via oral) foram investigados em ratos Wistar usando modelos de edema de pata induzidos por carragenina ou histamina (via intraplantar); de úlceras induzidas por álcool a 70% (v/v) (v.o.), indometacina (30 mg/kg, via subcutânea) e ácido acético a 30% (v/v) (intragástrica); e modelo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4, v.o). As toxicidades aguda (EASA 2000 mg/kg, v.o) e de doses repetidas (EASA 250, 500 e 1000 mg/kg, v.o) foram avaliadas em ambos os sexos de ratos Wistar e camundongos Swiss, respectivamente. A CCD evidenciou taninos hidrolisáveis, condensados, fenilpropanóides, ácido caféico e traços de esteróides, saponinas e quassinóides. A CLAE quantificou os ácidos gálico (16,47 µg/mL), elágico (1,29 µg/mL) e clorogênico (3,83 µg/mL), catequina (349,96 µg/mL) e epicatequina (16,43 µg/mL). Em ambos os modelos edematogênicos, todas as doses do EASA inibiram a fase inicial da inflamação e apenas a dose de 500 mg/kg foi capaz de manter o efeito anti-inflamatório. Todas as doses do EASA protegeram a mucosa gástrica do dano agudo induzido pelo etanol ou indometacina. No modelo crônico (ácido acético), o EASA acelerou a cicatrização da úlcera ao promover a reepitelização, confirmada também pela proliferação das células da mucosa gástrica por meio da imunorreatividade ao antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA e, restabelecer a camada glandular. Todas as doses do EASA também diminuíram os níveis de peroxidação lipídica induzida pelo CCl_4 no fígado, os de aspartato e alanina aminotransferases, lactato desidrogenase, bilirrubina e aumentaram a proliferação dos hepatócitos (intensa imunorreatividade ao PCNA). Apenas as doses de 250 e 500 mg/kg do EASA aumentaram a expressão de catalase. Na toxicidade aguda, o EASA não produziu alteração comportamental nem sinal de toxicidade ou morte. Na de doses repetidas, os machos apresentaram aumento nos níveis de proteína total e albumina (todas as doses), de bilirrubina total e fosfatase alcalina (500 e 1000 mg/kg) e leucocitose (1000 mg/kg). As fêmeas apresentaram aumento na variação do tamanho das hemácias (RDW) e hipertrigliceridemia (1000 mg/kg), e hiperuricemia (500 e 1000 mg/kg). A análise histológica evidenciou aumento do espaço da cápsula de Bowman e hipertrofia dos espongiócitos das adrenais (dose 1000 mg/kg de ambos os sexos), discreto infiltrado linfocitário no coração dos machos (1000 mg/kg) e discreta esteatose hepática nas fêmeas (500 e 1000 mg/kg). Dessa forma, conclui-se que o EASA é composto principalmente por taninos e possui atividades antiedematogênica, antiulcerogênica e hepatoprotetora assim como baixa toxicidade quando administrado por via oral.

Palavras-chave: Anti-inflamatórios. Antiulcerosos. Hepatoprotetores. *Simarouba amara*. Taninos.

ABSTRACT

Simarouba amara is found in almost all Brazilian regions. A decoction of the stem bark is used to treat malaria, inflammation, diarrhea and as tonic. This study chemically characterized the stem bark as well as investigated the anti-inflammatory, gastroprotective and hepatoprotective actions from the aqueous extract of *Simarouba amara* stem bark (SAAE) in parallel to toxicity assessments. The phytochemical profile was assessed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The pharmacological effects of SAAE (100, 250 and 500 mg/kg of body weight, *per oral*) were investigated in rats using models of paw edema induced by carrageenan or histamine (intraplantar); of ulcers induced by 70 % alcohol (v/v) (*p.o*), indomethacin (30 mg/kg, subcutaneous) and 30% acetic acid (v/v) (intragastric); and hepatotoxicity model induced by carbon tetrachloride (CCl_4, *p.o*). The acute (SAAE 2000 mg/kg) and repetead doses (SAAE 250, 500 and 1000 mg/kg) toxicities were evaluated in both sexes of Wistar rats and Swiss mice, respectively. The TLC showed hydrolysable and condensed tannins, phenylpropanoids, caffeic acid and traces of steroids, saponins and quassinoids. The HPLC quantified gallic (16.47 µg/mL), ellagic (1.29 µg /mL) and chlorogenic acids (3.83 µg /mL), catechin (349.96 µg/mL) and epicatechin (16.43 µg/mL). In both edematogenic models, all doses of SAAE inhibited the early phase of inflammation and only the dose 500 mg/kg was able to maintain the anti-inflammatory effect. All doses of SAAE protected the gastric mucosa from acute damage induced by ethanol or indomethacin. In the chronic model (acetic acid), the SAAE accelerated ulcer healing by promoting re-epithelialization, confirmed by gastric cell proliferation through immunoreactivity to proliferating cell nuclear antigen - PCNA and, restored glandular layer. All doses of SAAE also decreased the levels of lipid peroxidation induced by CCl_4 on liver, aspartate and alanine aminotransferases, lactate dehydrogenase, bilirubin and increased hepatocyte proliferation (PCNA intense immunoreactivity). Only 250 and 500 mg/kg doses increased the catalase expression. In the acute toxicity, SAAE produced no behavioral changes nor toxicity signs or death. In the repetead doses, the males showed increases in the levels of total protein and albumin (all doses), total bilirubin, alkaline phosphatase (500 and 1000 mg/kg) and leukocytosis (1000 mg/kg). The females showed increased red cell distribution width (RDW) and hypertriglyceridemia (1000 mg/kg), and hyperuricemia (500 and 1000 mg/kg). Histological analysis revealed increased Bowman capsule space and hypertrophy of the adrenal gland espongiocytes (at dose 1000 mg/kg for both sexes), discrete lymphocytic infiltrate in the heart of males (1000 mg/kg) and discrete hepatic steatosis in females (500 and 1000 mg/kg). Thus, it is concluded that the EASA is composed mainly of tannins and has antiedematogenic, antiulcer and hepatoprotective activities as well as low toxicity when administered orally.

Keywords: Anti-inflammatories. Antiulcers. Hepatoprotectives. *Simarouba amara.* Tannins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécie de *Simarouba amara* coletada no município de São João-PE. Fonte: arquivo pessoal. 29

Figura 2. CLAE dos padrões e do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* (EASA). 54

Figura 3. Efeitos do EASA sobre o volume do edema da pata (mL) de ratos Wistar induzido por carragenina 1%. 55

Figura 4. Efeitos do EASA sobre o volume do edema da pata (mL) de ratos Wistar induzido por histamina 0,1%. 56

Figura 5. Efeito gastroprotetor do EASA sobre lesões gástricas (mm^2) induzidas por etanol 70%. 56

Figura 6. Efeito gastroprotetor do EASA sobre lesões gástricas (mm^2) induzidas por ácido acético a 30%. 57

Figura 7. Cortes histológicos dos estômagos de ratos tratados com EASA 500 mg/kg. 59

Figura 8. Análise imunohistoquímica do PCNA nas células estomacais de ratos tratados com EASA 500 mg/kg. 60

Figura 9. Consumo de água (mL/dia/animal) dos animais tratados com EASA 500 mg/kg durante 14 dias consecutivos. 60

Figura 10. Consumo de ração (g/dia/animal) dos animais tratados com EASA 500 mg/kg durante 14 dias consecutivos. 61

Figura 11. Ganho de massa corporal (g) dos animais tratados com EASA 500 61

mg/kg durante 14 dias consecutivos.

Figura 12. Análise imunohistoquímica do PCNA no tecido hepático de ratos tratados com EASA. 63

Figura 13. Consumo de água (mL/dia/animal) dos camundongos machos tratados com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. 66

Figura 14. Consumo de ração (g/dia/animal) dos camundongos machos tratados com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. 66

Figura 15. Ganho de massa corporal (g) dos camundongos machos tratados com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. 67

Figura 16. Consumo de água (mL/dia/animal) dos camundongos fêmeas tratadas com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. 67

Figura 17. Consumo de ração (g/dia/animal) dos camundongos fêmeas tratadas com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. 68

Figura 18. Ganho de massa corporal (g) dos camundongos fêmeas tratadas com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. 68

Figura 19. Cortes histológicos (HE) do coração de camundongos machos tratados com o SAAE durante 30 dias consecutivos. 76

Figura 20. Cortes histológicos (HE) do fígado de camundongos fêmeas tratadas com o SAAE durante 30 dias consecutivos. 76

Figura 21. Cortes histológicos (HE) do espaço capsular dos rins de camundongos tratados com o SAAE durante 30 dias consecutivos. 76

Figura 22. Cortes histológicos (HE) da glândula adrenal de camundongos tratados com o SAAE durante 30 dias consecutivos. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de eluição e reveladores utilizados para a identificação de metabólitos na cromatografia em camada delgada. 41

Tabela 2. Efeito gastroprotetor do EASA sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina 30 mg/kg (s.c) em ratos Wistar. 57

Tabela 3. Efeitos do EASA sobre os níveis de peroxidação lipídica, catalase e superóxido dismutase em ratos Wistar. 62

Tabela 4. Efeitos do EASA sobre as enzimas hepáticas de ratos Wistar. 64

Tabela 5. Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre os parâmetros hematológicos de camundongos machos após os 30 dias de tratamento. 70

Tabela 6. Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre os parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas após os 30 dias de tratamento. 71

Tabela 7. Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos machos após os 30 dias de tratamento. 72

Tabela 8. Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas após os 30 dias de tratamento. 73

Tabela 9. Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre as massas dos órgãos de camundongos machos após os 30 dias de tratamento. 74

Tabela 10. Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre as massas dos órgãos de camundongos fêmeas após os 30 dias de tratamento. 75

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Revisão bibliográfica	19
2.1 Plantas medicinais	19
2.1.1 Histórico	19
2.1.2 Potencial farmacológico	21
2.1.2.1 Metabólitos secundários	23
2.1.3 Toxicidade	23
2.1.4 Regulamentação do uso	25
2.1.4.1 Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10 de 09 de Março de 2010	25
2.2 *Simarouba amara* Aublet	27
2.2.1 Dados etnofarmacológicos	27
2.2.2 Aspectos botânicos	28
2.2.3 Perfil fitoquímico	29
2.2.4 Atividades farmacológicas	29
2.3 Inflamação	30
2.4 Úlceras gástricas	32
2.5 Hepatotoxicidade	33
2.5.1 Lipoperoxidação	35
3.0 Objetivos	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4.0 Materiais e Métodos	40
4.1 Material botânico	40
4.2 Tratamento do material vegetal	40
4.3 Extração	40
4.4 Caracterização química do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara*	40
4.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	41
4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	42
4.5 Animais	42

4.6 Tratamentos 43
4.7 Protocolos experimentais 43
4.7.1 Determinação do edema de pata induzido por carragenina ou histamina 43
4.7.2 Atividade antiulcerogênica do EASA 44
4.7.2.1 Úlcera gástrica induzida por etanol 70% 44
4.7.2.2 Úlcera gástrica induzida por indometacina 44
4.7.2.3 Úlcera gástrica induzida por ácido acético 45
4.7.2.3.1 Exame histológico do estômago 45
4.7.2.3.2 Análise imunohistoquímica do estômago 46
4.7.3 Atividade hepatoprotetora do EASA 46
4.7.3.1 Hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4) 46
4.7.3.2 Homogenato de tecido hepático 47
4.7.3.2.1 Peroxidação lipídica 47
4.7.3.2.2 Superóxido dismutase (SOD) 48
4.7.3.2.3 Catalase (CAT) 48
4.7.3.3 Análise imunohistoquímica do fígado 48
4.7.3.4 Parâmetros bioquímicos 48
4.7.4 Ensaios de toxicidade 49
4.7.4.1 Toxicidade aguda 49
4.7.4.2 Toxicidade de doses repetidas 49
4.7.4.2.1 Parâmetros hematológicos e bioquímicos 50
4.7.4.2.2 Estudo morfológico 50
4.7.5 Análise estatística 51
5. Resultados 53
5.1 Caracterização química do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* 53
5.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD) 53
5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 53
5.2 Determinação do edema de pata induzido por carragenina ou histamina 55
5.3 Atividade antiulcerogênica do EASA 56
5.4 Atividade hepatoprotetora do EASA 61

5.5 Ensaios de toxicidade 65
5.5.1 Toxicidade aguda 65
5.5.2 Toxicidade de doses repetidas 65
5.5.2.1 Parâmetros hematológicos e bioquímicos 69
5.5.2.2 Estudo morfológico 69
6. Discussão 79
7. Conclusões 89
Referências 90
Apêndice 107
Apêndice A – Artigo publicado 108

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O uso das plantas medicinais sempre fez parte da sociedade ao longo da história (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2008). Notavelmente, a prática etnomedicinal reflete os conhecimentos adquiridos e acumulados ao longo de séculos e até, possivelmente, milênios (KABIR et al., 2014). O conhecimento popular é o principal determinante para a utilização de uma dada espécie, e representa muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002).

Entretanto, é grande o número de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de uma utilização direta, como da obtenção de novos constituintes ativos, ou simplesmente, de novas moléculas que possam servir para preparar por semi-síntese compostos farmacologicamente ativos (DA CUNHA, 2003). Apesar do uso tradicional e da grande utilização das plantas medicinais, sua efetividade e a ausência de toxicidade devem ser comprovadas, por isso é necessário conhecer a dose eficaz e àquela que produz toxicidade, portanto, é fundamental um estudo farmacodinâmico e toxicológico padronizado (AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007).

A família Simaroubaceae compreende 28 gêneros com aproximadamente 25 espécies distribuídas na floresta amazônica e em regiões tropicais do México, Cuba, Haiti, Jamaica e América Central (ARRIAGA et al., 2002). *Simarouba amara* consiste numa árvore de grande porte distribuída em quase todas as regiões brasileiras (HALL et al., 1983). Ela tem uma longa história na medicina tradicional de muitos países. No Brasil, onde a planta é popularmente conhecida como “praíba”, “marupá” e “pau-paraíba”, a decocção da casca do seu caule tem sido usada no tratamento da malária, inflamações, diarréia e como tônico (BONTÉ et al., 1996; ARRIAGA et al., 2002; TAYLOR, 2005).

Simarouba amara é uma das espécies selecionadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para ser reintroduzida na farmacopéia brasileira, desde que sua monografia seja atualizada e complementada (BRASIL, 2007). No entanto, há uma carência de dados botânicos e físico-químicos relacionados à planta assim como de estudos que comprovem suas propriedades etnofarmacológicas e a segurança de seu uso pela população. Partindo desse contexto, esse estudo propôs-se a caracterizar quimicamente a casca do caule de *Simarouba amara* assim como investigar as propriedades anti-inflamatórias, antiulcerogênicas e hepatoprotetoras do extrato aquoso da casca do caule da planta em paralelo aos ensaios de toxicidade.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica

A revisão desse trabalho contextualizará os aspectos etnofarmacológicos, normativos e de toxicidade relacionados ao uso tradicional das plantas medicinais correlacionando-os com os de *Simarouba amara*, planta característica da mata atlântica brasileira, popularmente usada no tratamento de diversas doenças.

2.1 Plantas medicinais

Planta medicinal é definida como sendo a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2011). O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As civilizações primitivas logo perceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram empiricamente o seu potencial curativo. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada (DA CUNHA, 2003).

2.1.1 Histórico

Consideram-se como primeiros registros escritos do uso de plantas, as placas de barro atualmente conservadas no “British Museum”, onde se encontram copiados em caracteres cuneiformes, por ordem do rei assírio Ashurbanipal, documentos sumérios e babilônicos, datando mais de 3000 anos antes da era cristã. Em outro documento, o famoso papiro, decifrado em 1873 pelo egiptólogo alemão Georg Ebers, tem-se representado o primeiro tratado médico egípcio conhecido da primeira metade do século XVI antes da era cristã. Parte do seu texto é destinada ao tratamento das doenças internas e a restante dá indicações sobre a constituição dos medicamentos que deveriam ser empregados. Embora a medicina egípcia se apoiasse muito em elementos mágicos e religiosos, sabe-se que já eram utilizados o sene, o zimbro, as sementes do linho, o funcho, o rícino e muitas outras plantas (DA CUNHA, 2003).

Esse conhecimento, já bastante profundo, sobre plantas medicinais e tóxicas é revelado também ao serem estudadas outras civilizações antigas, como a chinesa e a hindu. Na chinesa, é bem reconhecida a obra denominada *Pent-Sao* constituída por vários livros em que há referências a numerosas plantas, entre as quais a efedra (*Ephedra sinica)*, que só

entrou na terapêutica dos povos ocidentais já no final do século XIX. Em relação às civilizações mais recentes, uma contribuição importante foi dada pelos povos helênicos, que ao receberem dos persas muitos produtos orientais, tiveram grandes médicos como Hipócrates (460-377 a. C.), o "pai da medicina", Claudius Galeno (129-216 d. C.) o "pai da farmácia", a quem é atribuído algumas das formas farmacêuticas precursoras usadas até hoje, e Teofrasto (372 – 287 a. C.) que com a sua "História das plantas", deixou descrições botânicas muito precisas, acompanhadas de indicações sobre efeitos tóxicos e propriedades curativas (DA CUNHA, 2003; NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

Contudo, quem posteriormente destacou-se no campo das plantas medicinais foi Dioscórides (50 – 70 d. C.), que ao acompanhar os exércitos romanos na Península Ibérica, no Norte da África e na Síria, recolheu abundante informação sobre plantas dessas regiões. Escreveu o tratado "De Materia Medica" que representa um marco histórico no conhecimento de numerosos fármacos, muitos dos quais ainda hoje usados. Foram descritos cerca de 600 produtos de origem vegetal, animal e mineral com as indicações sobre o seu uso terapêutico e passou a ser usado como guia de ensino no mundo romano e árabe, continuando em vigor até finais da Idade Média (DA CUNHA, 2003).

Durante a Idade Média houve um retrocesso na evolução da arte de curar. A estagnação da terapêutica durante esse período foi de algum modo compensada pelos árabes que ao dominarem a partir do século VIII, o comércio do oceano Índico e os caminhos das caravanas provenientes da Índia e da África, tiveram acesso a muitas das plantas dessas regiões, tais como o ruibarbo, a cânfora, o sândalo, a noz moscada, o tamarindo e o cravinho. No século XIII, o médico árabe Ibn Al Baitar na sua enciclopédia médico-botânica "Corpus simplicium medicamentarium" incorporou os conhecimentos clássicos e a experiência árabe, caracterizando mais de 2000 produtos dos quais cerca de 1700 são de origem vegetal (DA CUNHA, 2003).

Com o renascimento, foram sendo introduzidos na terapêutica novos remédios oriundos de plantas, pois havia uma preocupação permanente de anotar tudo o que de útil se descobria nesse domínio. Por isso, seguiam nas naus físicos e boticários que muitas vezes guardavam em sigilo essas informações por serem consideradas segredos de Estado (DA CUNHA, 2003). Nessa época, quem se notabilizou foi Garcia de Orta, um médico judeu português, que depois de ter permanecido na Índia por mais de trinta anos, em 1563 publicou em Goa os "Colóquios dos Simples e drogas da Índia", livro no qual esclareceu pontos polêmicos de obras anteriormente publicadas, corrigindo e dando indicações precisas sobre certas plantas usadas na terapêutica até então nunca descritas (KELLER, 1974).

Em 1673, a partir da publicação da “Histoire géneral des Drogues” pelo farmacêutico Pierre Pomet, o estudo das plantas entrou no período científico, pois foram adotadas a classificação e a descrição taxonômica para as mesmas. No entanto, somente no final do século XVIII, começou-se a isolar e a determinar a estrutura dos constituintes ativos dos produtos de origem natural dotados de propriedades medicinais (DA CUNHA, 2003).

Desse modo, percebe-se que o uso das plantas medicinais sempre fez parte da sociedade ao longo da história e elas continuaram a serem usadas como principal fonte de cura pela população dos países em desenvolvimento mesmo no século XX, período no qual o uso dos medicamentos de origem sintética tornou-se maior nos países desenvolvidos do ocidente (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2008).

2.1.2 Potencial farmacológico

De modo geral, há três formas de selecionar uma espécie vegetal. Essa escolha pode ser feita por meio de uma abordagem randômica, baseada na disponibilidade da planta; de uma abordagem quimiotaxonômica ou filogenética, considerando a ocorrência de certos metabólitos secundários em dado gênero ou espécie e, por fim, por intermédio de uma abordagem etnofarmacológica, baseada nas informações cedidas pela população. O conhecimento popular é o principal determinante para a utilização de uma dada espécie, e representa muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002).

Ainda é grande o número de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de uma utilização direta, como da obtenção de novos constituintes ativos, ou simplesmente, de novas moléculas que possam servir para preparar por semi-síntese compostos farmacologicamente ativos. E provavelmente, essas plantas pertencem ao arsenal fitoterapêutico que o homem já utilizou, muitas vezes, com bons resultados (DA CUNHA, 2003). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 65 - 80% da população mundial utilizam produtos à base de plantas medicinais na atenção primária à saúde. Por isso, desde 1978, a OMS incentiva investimentos públicos no estudo das mesmas (SILVEIRA; BANDEIRA; DOURADO, 2008).

Com a introdução da objetividade e metodologia experimental, muito desse conhecimento empírico começou a ser comprovado cientificamente, constituindo a base para o uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos de origem vegetal. Dessa forma, as plantas com propriedades

terapêuticas ou tóxicas adquiriram fundamental importância na medicina popular (RITTER et al., 2002).

Enquadradas nessa problemática, equipes ligadas à indústria farmacêutica e constituídas por botânicos, farmacognosistas e farmacologistas, procedem em muitas regiões do mundo, mas, sobretudo, nas tropicais e subtropicais, um esforço sistemático de coleta e estudo de espécies empregadas na medicina popular. Etnofarmacologistas estão atualmente empenhados nesses estudos, publicando resultados em revistas especializadas e fomentando, em nível internacional, reuniões científicas sobre essa matéria. A ocidentalização de muitas dessas populações e o risco iminente da perda total de tais conhecimentos empíricos, conferem ao seu registro um estado de necessidade urgente (DA CUNHA, 2003).

Desse modo, as plantas medicinais têm se mostrado importantes para a medicina moderna. Primeiramente, por poder fornecer fármacos que dificilmente seriam obtidos por síntese química, como os alcalóides de *Papaver somniferum* e os glicosídeos cardiotônicos de *Digitalis* spp. As fontes naturais ainda fornecem compostos que podem ser modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. E por último, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996).

Os diferentes extratos das plantas medicinais, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença das mais variadas classes de compostos ou estruturas que contribuem para a mesma atividade (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir desses (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Os produtos de origem natural podem ser tão eficazes quanto os obtidos por síntese química, contudo a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de sua utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (TOLEDO et al., 2003). Por isso, o maior problema para a utilização terapêutica das plantas medicinais no tratamento convencional é a falta de dados científicos que comprovem sua eficácia e segurança (SOUZA; OLIVEIRA; NICOLETE, 2011). Portanto, é essencial o uso responsável, racional, seguro e não abusivo das mesmas (CZELUSNIAK et al., 2012).

2.1.2.1 Metabólitos secundários

As plantas medicinais apresentam uma ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (SIMÕES et al., 2004). O metabolismo é definido como sendo o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas para suprir o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO; TORRES, 2007). Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2008).

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixa massa molecular, possuem diferentes atividades biológicas e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2008). Despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela variada atividade farmacológica que possuem. Muitos são de importância comercial e não apenas na área farmacêutica (SIMÕES et al., 2004).

A origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose 4-fosfato. Ele origina os taninos hidrolisáveis, os alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e o ácido cinâmico que é precursor da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides, compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos. Alguns metabólitos derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivado deste como é o caso das antraquinonas, dos flavonóides e dos taninos condensados (SIMÕES et al., 2004).

2.1.3 Toxicidade

O surgimento do conceito “natural” em muito contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas, baseando-se na suposição de que produtos naturais não causariam danos e consequentemente, não prejudicariam a saúde. O desconhecimento por parte da população sobre os efeitos secundários e toxicidade de espécies utilizadas habitualmente pode ter sérias consequências (MENGUE; MENTZ; SHENKEL, 2001).

As plantas medicinais podem desencadear reações adversas devido aos seus próprios constituintes, às interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda, reações associadas às características do paciente (idade, sexo, condições fisiológicas, genéticas, entre outros). Erros de diagnóstico, identificação incorreta de espécies de plantas e uso diferente da forma tradicional também podem ser perigosos, levando à superdose, inefetividade terapêutica e reações indesejadas (WHO, 2002).

Embora sejam popularmente consideradas terapêuticas, as plantas medicinais frequentemente possuem propriedades tóxicas desconhecidas pela população (SINTOX, 2010). As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais são de extrema importância, assim como o controle da sua comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JR; MACIEL; PINTO, 2005).

No Brasil, o estudo toxicológico pré-clínico de plantas medicinais é regulamentado pela RDC nº 90 de 16 de Março de 2004 que norteia alguns ensaios de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas e de longa duração (trinta dias a um ano, a depender da freqüência de uso do produto) (BRASIL, 2004). Esses ensaios têm por objetivo comprovar a eficácia e investigar a toxicidade das plantas visando os seus benefícios para o ser humano. Além disso, traçam o perfil dos efeitos colaterais, relacionando-os às doses e a um possível mecanismo de ação em várias espécies de animais em experimentação (SIMÕES et al., 2004).

A toxicidade aguda refere-se aos efeitos tóxicos decorrentes da administração da substância, em doses única ou múltiplas, por um período de 24 horas, e também seus efeitos durante 14 dias após a administração (LARINI; OLIVEIRA, 1993). Nesse estudo, as informações obtidas devem ser usadas em estudos subsequentes de toxicidade prolongada (LOOMIS; HAYES, 1996).

A toxicidade prolongada analisa e caracteriza todos os efeitos provocados por uma determinada substância quando administrada diariamente em animais experimentais, em doses previamente estabelecidas e por longos períodos (LOOMIS; HAYES, 1996). Os principais parâmetros a serem observados durante o tratamento são as modificações na atividade motora e comportamental, na cor e textura dos pêlos e na frequência

cardiorespiratória. Ao final dos experimentos, os animais devem ser sacrificados para a coleta do sangue (análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos) e remoção de órgãos para as análises macro e microscópica (BARNES; DOURSON, 1988).

2.1.4 Regulamentação do uso

No Brasil, a regulamentação do uso de plantas medicinais foi implementada, inicialmente, por meio da Lei nº. 5.991 de 17 de dezembro de 1973, que estabeleceu a dispensação das mesmas como sendo privativa das farmácias e ervanarias, observados o acondicionamento adequado e a classificação botânica. Só em 1981, começou de forma incipiente a política de plantas medicinais e fitoterápicos por meio da Portaria do Ministério da Saúde nº 212 de 11 de setembro, que definiu o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica. Em 1982, o mesmo Ministério lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (PPPM/Ceme) para obter o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, baseada no valor farmacológico das preparações populares feitas com plantas medicinais (BRASIL, 2011).

Ao longo dessa trajetória, várias políticas envolvendo plantas medicinais e fitoterápicos foram implantadas, destacando-se o Decreto nº. 5.813 de 22 de junho de 2006 que instituiu a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, a Portaria nº. 971 de 03 de maio de 2006 que aprovou a política nacional de práticas integrativas e complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Portaria Interministerial nº 2.960 de 09 de dezembro de 2008 que aprovou o programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e criou o comitê nacional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) considerando a necessidade de contribuir para a construção do marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de drogas vegetais, a partir da experiência da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização, de modo a garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a esses produtos, resolveu adotar a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10 de 09 de Março de 2010 (BRASIL, 2011).

2.1.4.1 Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10 de 09 de Março de 2010

Através dessa resolução ficou instituída a notificação de drogas vegetais no âmbito da Anvisa, sendo assim consideradas as plantas medicinais ou suas partes, que contenham as

substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas. Não podem ser notificadas drogas vegetais em qualquer outra forma farmacêutica como cápsula, tintura, comprimido, extrato, xarope, entre outras.

Já as plantas medicinais *in natura*, cultivadas em hortos comunitários e Farmácias Vivas reconhecidas junto aos órgãos públicos e as drogas vegetais manipuladas em farmácias de manipulação, não estão sujeitas à notificação instituída por esta Resolução, devendo atender às condições estabelecidas em regulamento próprio.

Ainda de acordo com a RDC nº 10/10, as drogas vegetais são produtos de venda isenta de prescrição médica destinada ao consumidor final. Sua efetividade encontra-se amparada no uso tradicional e na revisão de dados disponíveis em literatura relacionada ao tema. Esses produtos destinam-se ao uso episódico, oral ou tópico, para o alívio sintomático das doenças de baixa gravidade (doença auto-limitante, de evolução benigna que pode ser tratada sem acompanhamento médico), devendo ser disponibilizadas exclusivamente na forma de droga vegetal para o preparo de infusões, decocções e macerações.

Para fins de padronização, a resolução adotou as seguintes medidas de referência:

a) Colher das de sopa: 15 mL/3 g;

b) Colher das de sobremesa: 10 mL/2 g;

c) Colher das de chá: 5 mL/1 g;

d) Colher das de café: 2 mL/0,5 g;

e) Xícara das de chá ou copo: 150 mL;

f) Xícara das de café: 50 mL;

g) Cálice: 30 mL

Os fabricantes das drogas vegetais abrangidos por esta resolução devem apresentar metodologia, especificações e resultados dos seguintes testes de identidade e qualidade da droga vegetal no momento da notificação:

a) Descrição da droga vegetal em Farmacopéias reconhecidas pela Anvisa, ou em sua ausência, em publicação técnico-científica indexada ou laudo de identificação emitido por profissional habilitado;

b) Prospecção fitoquímica, cromatografia em camada delgada (CCD) ou outro método cromatográfico, acompanhada da respectiva imagem em arquivo eletrônico reconhecido pela Anvisa, com comparação que possa garantir a identidade da droga vegetal;

c) Características organolépticas;

d) Granulometria da droga;

e) Teor de cinzas totais;

f) Teor de umidade/perda por dessecação;

g) Contaminantes macroscópicos;

h) Teste limite para metais pesados;

i) Contaminantes microbiológicos, para os quais serão adotados limites, a depender do processo extrativo cuja planta medicinal será submetida: a quente (preparados por infusão e decocção) ou a frio (maceração).

O fabricante deve garantir a manutenção da qualidade do produto durante o prazo de validade, confirmada por meio de laudo técnico de análise. A embalagem deve garantir a proteção da droga vegetal contra contaminações, efeitos da luz e umidade e apresentar lacre ou selo de segurança que garanta a inviolabilidade do produto. A embalagem deve apresentar exclusivamente o nome do produto, no painel principal, que deverá ser composto pela nomenclatura popular escolhida seguida da nomenclatura botânica: espécie (gênero + epíteto específico).

2.2 *Simarouba amara* Aublet

A descrição botânica de *Simarouba amara* consta apenas no primeiro volume da farmacopéia brasileira (1926) e, recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, busca reintroduzi-la na farmacopéia, desde que a sua monografia seja atualizada e complementada (BRASIL, 2011). A seguir segue uma resvisão sobre a espécie.

2.2.1 Dados etnofarmacológicos

O uso popular de *Simarouba amara* remete-se ao ano de 1713, quando os exploradores franceses descobriram que tribos indígenas da floresta da Guiana faziam uso da casca do caule da planta para tratar disenteria e malária. Quando a França foi acometida por uma disenteria endêmica entre os anos de 1718 – 1725, o uso da decocção da casca do caule de *S. amara* foi um dos poucos tratamentos efetivos, sendo usada até hoje naquela região da Guiana para esse fim. Outras tribos indígenas presentes em toda a floresta tropical sul-americana também usam as cascas de *S. amara* como agentes antitérmico, hemostático, tônico, para tratar malária e disenteria (TAYLOR, 2005).

Simarouba amara tem uma longa história na medicina tradicional de muitos outros países. Em Cuba, onde é chamada “gavilan”, a infusão das folhas ou da casca do caule é

considerada adstringente e administrada oralmente para tratar diarréia, malária e colite e, topicamente, nas feridas e úlceras. Em Belize, a árvore é chamada “negrito” ou “casca para disenteria”. A casca do caule e, ocasionalmente, a raiz é fervida em água para produzir um tônico adstringente usado topicamente em feridas na pele e no tratamento de distúrbios estomacais, intestinais e hemorragias (TAYLOR, 2005). No Brasil, onde a planta é popularmente conhecida como “praíba”, “marupá” e “pau-paraíba”, a decocção da casca do seu caule tem sido usada no tratamento da malária, inflamações, diarréia e como tônico, sendo tomada diariamente uma xícara das de chá do decócto 2-3 vezes ao dia (BONTÉ et al., 1996; ARRIAGA et al., 2002; TAYLOR, 2005).

2.2.2 Aspectos botânicos

A família Simaroubaceae compreende 28 gêneros com aproximadamente 25 espécies distribuídas na floresta amazônica e em regiões tropicais do México, Cuba, Haiti, Jamaica e América Central (ARRIAGA et al., 2002). No Brasil, está representada pelos gêneros Quassia e Picrolemma - na região Amazônica; Castela e Picrasma - no sul do país; Simaba e Simarouba em quase todas as regiões brasileiras (HALL et al., 1983).

Simarouba amara consiste numa árvore grande que atinge até 40 m de altura e 0,5 - 0,9 m de diâmetro. Apresenta tronco reto, cilíndrico, sem raízes visíveis. A casca externa é de cor cinza-clara, de textura quase lisa à levemente rachada, com fissuras finas verticais. A casca interna é amarelo-esbranquiçada, de textura arenosa e sabor amargo. As folhas são alternas, compostas, imparipinadas, com folíolos alternos, coriáceos e de base inequilátera. As flores são unissexuais e dispostas em panículas terminais (ESPINAL; SIGIFREDO, 1986). O fruto é composto por cinco drupas pequenas, ovóides, até 1,5 cm de largura com uma semente cada, quando maduro, o fruto torna-se negro-azulado (GONZALES; DIAZ; LOWY, 1995). A imagem de *Simarouba amara* é mostrada na figura 1.

Figura 1: Espécie de *Simarouba amara* coletada no município de São João-PE. Fonte: arquivo pessoal.

2.2.3 Perfil fitoquímico

Em estudos de investigação fitoquímica realizados Polonsky et al. (1978) foram isolados alcalóides, triterpenos e quassinóides da casca de *S. amara.* Grosvenor et al. (2006) conseguiram isolar 6 novos triterpenos das cascas de *Simarouba amara*, além de dois outros compostos anteriormente conhecidos (3-oxatirucalla-7, 24-dien-23-ol e niloticina). Coimbra (1994) isolou alcalóides e taninos da casca da planta.

2.2.4 Atividades farmacológicas

Após cerca de 200 anos de história documentada do uso da casca do caule de *S. amara* para tratar a disenteria, a sua utilização para esse fim foi finalmente validada por médicos de um hospital militar da Inglaterra em 1918. Eles demonstraram que o chá da casca foi um tratamento eficaz para a disenteria amebiana em humanos. Em 1944, o Instituto Merck constatou em estudo que *S. amara* era realmente efetiva (91,8%) contra amebas intestinais em humanos e, em 1962, outros pesquisadores descobriram que as sementes de *S. amara* também apresentavam essa ação em seres humanos (TAYLOR, 2005).

O primeiro estudo que comprovou a propriedade antimalárica tanto da casca do caule quanto da raiz de *S. amara* ocorreu em 1947, em galinhas, no qual doses de apenas 1 mg de extrato da casca por kg de massa corporal apresentaram resultados relevantes. Quando cepas resistentes aos antimaláricos existentes começaram a surgir, *S. amara* foi estudada mais uma vez. As cascas da planta assim como os quassinóides isolados dela apresentaram ação antimalárica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TAYLOR, 2005).

A partir da década de 1980 outros pesquisadores comprovaram a ação antimicrobiana de *S. amara*. O'Neill et al. (1988) verificaram a ação antimalárica dos frutos de *S. amara;* enquanto Wright et al. (1988) verificaram a atividade amebicida da casca do caule de *S. amara* e Caceres (1990) demonstrou o efeito bactericida dos extratos aquosos e hidroalcóolicos da casca do caule de *S amara* frente às bactérias *Salmonella typhosa* e *Shigella flexineri*.

Polonsky et al. (1978) isolaram os quassinóides 13,18-dehidroglaucarubinona e glaucarubinona do extrato aquoso da raiz de *S. amara* que apresentaram atividade antiproliferativa contra células leucêmicas correspondendo a valores da CE_{50} de 0,95 e 0,34 µg/mL, respectivamente e, por fim, Bonté et al. (1996) evidenciaram uma maior hidratação na pele de mulheres adultas tratadas com o extrato aquoso da casca da raiz de *S amara* assim como houve maior diferenciação dos queratinócitos em culturas de pele *in vitro*.

2.3 Inflamação

A inflamação é a resposta tecidual às infecções e injúrias que tem como finalidade o reparo tecidual por meio da liberação de mediadores inflamatórios como aminas bioativas, eicosanóides, citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição. A persistência do processo inflamatório leva à inflamação crônica que pode ocorrer pela persistência da infecção, pela injúria local recorrente ou pela deficiência de mecanismos anti-inflamatórios naturais (RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

A resposta inflamatória gerada pelo sistema imunológico tem a finalidade de remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual do local agredido. A evolução tem início imediatamente após o dano. As células residentes do tecido são estimuladas e uma fase vascular é iniciada; vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar são mediados por aminas vasoativas, histamina e serotonina liberadas por mastócitos e monócitos. Esses eventos permitem que um exsudato rico em proteínas e água extravase para o espaço extravascular. Também são ativados componentes do sistema complemento, do sistema de

cininas e do sistema de coagulação. Adicionalmente, os macrófagos residentes liberam citocinas inflamatórias, como interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF-α) e quimiocinas (CRUVINEL et al., 2010).

Além disso, o endotélio ativado passa a expressar moléculas de superfície que favorecem a aderência e a migração de leucócitos para o tecido. As selectinas permitem a adesão fraca dos neutrófilos, as integrinas promovem a adesão forte e as quimiocinas ativam e estimulam a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório. Essas interações fazem com que os neutrófilos rolem pela parede do vaso e sejam expostos aos fatores quimiotáticos. O gradiente quimiotático crescente direciona a migração dos neutrófilos ao sítio inflamatório (CRUVINEL et al., 2010).

O óxido nítrico (NO), produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, possui potente ação vasodilatadora - o que leva a um aumento da permeabilidade vascular. Além disso, atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra microrganismos. É sintetizado pela NO sintase (NOS), enzima presente em três isoformas, sendo a forma indutível (iNOS) a envolvida nas reações inflamatórias. Esta é induzida em macrófagos e em outras células durante o processo (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008).

Simultaneamente a este processo, mediadores lipídicos também são produzidos em consequência da ativação de fosfolipases que clivam fosfolipídios constituintes da membrana celular e liberam o ácido araquidônico que pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas: a cicloxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX). A COX-2 é a isoforma envolvida na inflamação e inicia a biossíntese de prostaglandinas (PG) e tromboxano (TX). Já a LOX está envolvida na biossíntese de leucotrienos (LT) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Os prostanóides mais importantes na inflamação são: PGE_2, PGD_2, $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (prostaciclina) e TXA_2. A prostaciclina possui ação vasodilatadora, além de potencializar os efeitos quimiotáticos e aumentar a permeabilidade de outros mediadores. As prostaglandinas PGE_2, PGD_2 e $PGF_{2\alpha}$ também são vasodilatadoras, além de exacerbarem o edema. Além disso, as prostaglandinas também estão envolvidas nos eventos de algesia e hipertermia durante a inflamação (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Por sua vez, LTB_4 é o principal leucotrieno envolvido no processo inflamatório. Exerce potente atividade quimiotática para leucócitos, eosinófilos e monócitos, promovendo a migração destes tipos celulares para o local afetado. Uma vez no sítio, os leucotrienos ativam as células da série branca, promovendo a desgranulação e a produção de superóxidos, que

contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação. Os leucotrienos C_4, D_4 e E_4 (LC_4, LD_4 e LE_4) aumentam a permeabilidade vascular (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Dentre as diversas metodologias empregadas para pesquisas de novas drogas com potencial anti-inflamatório, os agentes flogísticos indutores do processo inflamatório, como carragenina, dextrana e histamina são bastante usados em triagem farmacológica para avaliação de substâncias com potencial anti-inflamatório (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

A carragenina, um polissacarídeo sulfatado de origem vegetal e isolado da alga *Chondrus crispus*, é amplamente utilizada como agente edematogênico (EMIM, 1996). O edema de pata induzido por sua administração intraplantar é considerado um modelo padrão de inflamação aguda (KALE et al., 2007), pois induz a infiltração de fagócitos, produção de radicais livres e liberação de mediadores inflamatórios (SALVEMINI et al., 1996). A histamina, um mediador inflamatório, quando administrada por via intraplantar promove dor local, ativação do complemento e das células endoteliais, recrutamento dos leucócitos e formação do edema no local da inflamação (DAUD; HABIB; RIERA, 2006).

2.4 Úlceras gástricas

O estômago é exposto a uma série de substâncias que podem causar danos ao seu epitélio, como o ácido clorídrico, enzimas digestivas e a bile. Entretanto, danos significativos à mucosa raramente ocorrem em condições normais (WALLACE, 2008). A úlcera péptica, uma das maiores doenças gastrintestinais, é causada por múltiplos fatores incluindo estresse, cigarro, deficiência nutricional, agentes nocivos como álcool, anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), infecções por *Helicobacter pylori* entre outros (BELAICHE et al., 2002).

Dentre os fatores que promovem a integridade da mucosa gástrica têm-se a secreção de muco, bicarbonato, prostaglandinas, a proliferação celular e a perfusão sanguínea da mucosa. Essa circulação é a responsável pela nutrição e remoção dos resíduos, particularmente radicais livres que possuem um papel importante na formação da lesão gástrica (SAIRAM, 2002).

Embora os supressores da secreção ácida tenham sido a base terapêutica utilizada para a cura da úlcera por três décadas, tem havido um interesse crescente nos últimos anos tanto nos mecanismos pelos quais a úlcera cicatriza quanto na possibilidade de que a velocidade e a qualidade da cicatrização possam ser farmacologicamente moduladas. A cicatrização requer angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera juntamente com replicação de células

epiteliais na margem da úlcera e subseqüente restabelecimento da arquitetura glandular (WALLACE, 2008).

Entre os modelos farmacológicos que induzem úlcera gástrica em animais, a utilização do etanol é amplamente divulgada (LOGUERCIO et al., 1993). Os danos causados pelo etanol na mucosa gástrica devem-se aos distúrbios na microcirculação da mucosa, isquemia, aparecimento de radicais livres, desgranulação dos mastócitos, inibição das prostaglandinas e diminuição da produção de muco (SAMONINA et al., 2004). O ácido acético, outro indutor ulcerogênico, forma úlceras por causar obstrução pilórica e necrose da mucosa (OKABE; PFEIFFER, 1972) e a indometacina, um AINES, induz a formação da úlcera gástrica por inibir de forma não-seletiva a COX, inibindo a síntese de prostaglandinas citoprotetoras (SAIRAM, 2002).

Extratos de plantas são algumas das fontes mais atrativas de novas drogas e têm mostrado efeitos promissores no tratamento das úlceras gástricas (BORRELLI; IZZO, 2000). Na medicina tradicional, várias plantas têm sido usadas para tratar doenças gastrointestinais, incluindo úlceras gástricas. Daí a importância de se investigar o efeito antiulcerogênico das plantas medicinais que têm sido popularmente usadas para esse fim (SILVA et al., 2009).

2.5 Hepatotoxicidade

O fígado é um órgão importante envolvido na manutenção da homeostasia do organismo como um todo. Desempenha diferentes funções como metabólica, excretora, secretora, de armazenamento, síntese e desintoxicação (biotransformação) (MOTTA, 2009).

Lesões hepáticas induzidas por substâncias químicas, drogas e vírus têm sido bem reconhecidas como um problema toxicológico (DAY, 2007). Elas vêm acompanhadas pelo aumento nos níveis séricos das aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT, respectivamente), gama-glutamiltranspeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), lactato desidrogenase (LDH) e bilirrubina (MAUSS; WEDEMAYER, 2008).

A ALT está presente no citoplasma do hepatócito enquanto a AST na mitocôndria, apesar de não ser uma enzima hepato-específica. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a citoplasmpática e em lesões graves, há a liberação da enzima mitocondrial. A GGT e FA são marcadores de processos colestáticos. A LDH está presente no citoplasma de muitas células do organismo e lesões no hepatócito provocam elevações plasmáticas significantes da enzima (MOTTA, 2009). No metabolismo da bilirrubina, o fígado é o responsável por sua captação, conjugação e excreção. Por isso, a análise dos seus

níveis séricos é importante para o diagnóstico diferencial de várias doenças (MARTINELLI, 2004).

Os ensaios farmacológicos usados para verificar a atividade hepatoprotetora de diferentes substâncias e/ou extratos utilizam o tetracloreto de carbono (CCl_4) como hepatotoxina. O modelo baseia-se nos efeitos dos intermediários altamente reativos e tóxicos que são produzidos durante seu metabolismo hepático (MADDREY, 2005). Os radicais livres formados, por serem extremamente reativos e instáveis, participam de reações com substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos (LEMOS, 2006).

A produção de radicais livres ocorre naturalmente no organismo como um processo fisiológico. No entanto, essas espécies reativas são também a maior fonte de estresse celular quando ocorre o desequilíbrio entre a sua geração e a defesa antioxidante (MANDA; NECHIFOR; NEAGU, 2009). Os efeitos dos radicais livres são amplos, mas quatro reações são particularmente relevantes para o mecanismo de lesão celular: peroxidação lipídica das membranas, modificações oxidativas das proteínas, lesões no ácido desoxirribonucléico (DNA) e lesão de reperfusão (OLSZEWER, 2008).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado os radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento, doenças autoimunes, infecciosas e/ou inflamatórias e pelas doenças degenerativas, como câncer, cardiopatias, hepatopatias, catarata, diminuição da imunidade e disfunções cerebrais (KANAAN et al., 2014).

Normalmente, o organismo dispõe de eficientes mecanismos de reparo antioxidante, capazes de impedir ou retardar os efeitos deletérios dessas moléculas. Os antioxidantes consistem num conjunto heterogêneo de substâncias que bloqueiam a formação de radicais livres. Os endógenos, produzidos pelo próprio organismo, são classificados em enzimáticos (superóxidos dismutases citoplasmática e mitocondrial, catalase, glutationa-peroxidase, glutationa-redutase) e não-enzimáticos (glutationa, ácido lipóico, albumina, ubiquinona, metalotioneínas, transferrina e ceruloplasmina); os exógenos ou dietéticos, são adquiridos por meio da ingestão alimentar (ácido ascórbico, tocoferol, carotenóides, minerais - zinco, cobre, selênio e magnésio - compostos fenólicos e demais metabólitos secundários vegetais) (SHAHIDI; HO, 2007).

As substâncias antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção do organismo contra os radicas livres. O primeiro mecanismo de defesa é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes

são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados, os aminoácidos das proteínas e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular (ABRAHÃO et al., 2010).

O outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos na molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta à geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (LIMA et al., 2012).

A terapia antioxidante, portanto, pode inibir todas as alterações oxidativas deletérias envolvidas na hepatotoxicidade. Apesar do conhecimento da patogênese molecular e das descobertas de novos agentes hepatoprotetores, as intervenções terapêuticas efetivas ainda são limitadas para o tratamento das doenças hepáticas. Devido a isso, as plantas medicinais, especialmente àquelas já usadas tradicionalmente, são consideradas fontes para a descoberta de terapias efetivas (UPUR et al., 2009).

2.5.1 Lipoperoxidação

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído - MDA), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989).

A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Assim, como na formação das EROs, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS; MOLDEUS, 1991). A lipoperoxidação talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia a sequência de lesões na célula (KANAAN et al., 2014). Ela está representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Essas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio (GARDÈS-ALBERT; JORE; FERRADINI, 1991):

$LH + OH\bullet$ (ou $LO\bullet$) ———> $L\bullet + H_2O$ (ou LOH) Iniciação

$L\bullet + O_2$ ———> $LOO\bullet$ Propagação

$LH + LOO\bullet$ ———> $L\bullet + LOOH$ Propagação

$LOO\bullet + L\bullet$ ———> LOOL Terminação

$LOO\bullet + LOO\bullet$ ———> $LOOL + O_2$ Terminação

A reação inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana celular realizado pelo OH• ou LO• (radical alcoxila), com conseqüente formação do L• (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L• reage rapidamente com o O_2, resultando em LOO• (radical peroxila), que por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, formando novamente o L• na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais LOO• e L• produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se.

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (LO• e LOO•), que iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação (BORG; SCHAICH, 1988). O radical hidroxila (OH•) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar Fe^{3+}: Fe^{2+} no meio, para que ocorra a lipoperoxidação (GUTTERIDGE, 1988).

As principais metodologias utilizadas para a avaliação da lipoperoxidação em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases desse processo. Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lipídeos é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados por cisão *beta* dos ácidos graxos poli-insaturados peroxidados, prinicpalmente o ácido araquidônico. É um composto volátil, de baixa massa molecular, ácido moderamente fraco. Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absortividade molar no espectro visível (KANAAN et al., 2014).

OBJETIVOS

3.0 Objetivos

Os principais propóstios delineados para o trabalho são descritos a seguir.

3.1 Objetivo geral

Investigar as atividades anti-inflamatória, antiulcerogênica e hepatoprotetora do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* (EASA) em paralelo aos ensaios de toxicidade.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente o extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara*;

- Analisar a atividade anti-inflamatória, por via oral (v.o.), do EASA sobre o edema de pata induzido por carragenina ou histamina em ratos Wistar;

- Avaliar a atividade gastroprotetora, por v.o., do EASA em modelos ulcerogênicos induzidos por etanol a 70% (v/v) (v.o.), indometacina (30 mg/kg, s.c) e ácido acético 30% (v/v) (intragástrica) em ratos Wistar;

- Explorar os efeitos hepatoprotetores, por v.o., do EASA sobre a injúria hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4) em ratos Wistar;

- Averiguar a toxicidade aguda e de doses repetidas do EASA, por v.o., em ratos Wistar de ambos os sexos e camundongos Swiss de ambos os sexos, respectivamente.

MATERIAS E MÉTODOS

4.0 Materiais e Métodos

Os materiais e as metodologias empregados na execução dos protocolos experimentais estão descritos abaixo.

4.1 Material botânico

As cascas do caule de *Simarouba amara* Aublet foram coletadas no município de São João-PE (08° 52’ 33” S e 36° 22’ 01” O Gr.) e identificadas no Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). A exsicata da planta foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima sob o número 85268.

4.2 Tratamento do material vegetal

As cascas do caule de *Simarouba amara* foram coletadas em Dezembro de 2010 perfazendo um total de aproximadamente 5 kg. As amostras foram previamente secas à sombra, em local arejado e isento de precipitação durante 48 horas. Em seguida, foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de 45 ± 2°C até estabilização da umidade residual que foi de 7,74 ± 0,33 (g %), estando dentro dos limites estabelecidos pela farmacopéia brasileira (1988), que variam de 8 - 14%. Ao final, as cascas foram submetidas à moagem em moinho de facas. O material cominuído resultante foi misturado, constituindo assim, a matéria-prima vegetal.

4.3 Extração

A matéria-prima vegetal foi submetida à decocção (10 : 100, m/v) durante 10 minutos usando água destilada como solvente extrator. Em seguida, o extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* (EASA) foi filtrado e concentrado em liofilizador (-80°C e 4,58 mmHg). Após o procedimento, o rendimento do extrato seco de *Simarouba amara* foi de 12,15 g por litro do extrato aquoso da casca de *Simarouba amara*.

4.4 Caracterização química do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara*

Serão realizadas uma investigação qualitativa, através da cromatografia em camada delgada e, outra, quantitativa (cromatografia líquida de alta eficiência), baseada nos principais metabólitos identificados na CCD.

4.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Aos 0,25 g do extrato seco da casca do caule de *Simarouba amara* foram adicionados 20 mL de metanol e alíquotas de 10 µL dessa solução foram aplicadas em placas cromatográficas de gel de sílica (Merck® art. 105553, UV 250–366nm), usando fases móveis, reagentes e padrões apropriados como mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Sistemas de eluição e reveladores utilizados para a identificação de metabólitos na cromatografia em camada delgada.

Metabólitos	Sistema de eluição	Revelador	Referência
Açúcares redutores	n-BuOH - Me_2CO - TP (pH = 5,0)[3]	Trifeniltetrazólio	Metz (1961)
Alcalóides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H_2O[1]	Dragendorff	Wagner e Bladt (1996)
Cumarinas	Éter - Tolueno - AcOH 10%[2]	UV (365 nm)	Wagner e Bladt (1996)
Derivados Cinâmicos	AcOEt - HCOOH - AcOH - H_2O[1]	NEU	Wagner e Bladt (1996); Neu (1956)
Flavonóides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H_2O[1]	NEU	Wagner e Bladt (1996); Neu (1956)
Proantocianidinas e Leucoantocianidinas	AcOEt – HCOOH – AcOH – H_2O[1]	VC	Roberts et al. (1957)
Quassinóides	n-hexano – Clorofórmio		Harborne (1998)
Taninos hidrolisáveis	n-BuOH - H_2O - AcOH[3]	NEU	Xavier (1988)
Triterpenos / esteróides	Tolueno - AcOEt[4]	LB	Harborne (1998)

[1]100: 11: 11: 27 v/v; [2]50: 50: 50 v/v; [3] 40: 50: 10 v/v; [4]90: 10 v/v; AcOEt = Acetato de etila; HCOOH = Ácido fórmico; AcOH = ácido acético; $CHCl_3$: clorofórmio; H_2O = água; UV = ultravioleta; NEU = ácido etilborilaminoéster a 1% em etanol; n-BuOH = n-butanol; LB = Lieberman e Burchard; Me_2CO = acetona; TP = tampão fosfato; VC = Vanilina Clorídrica.

4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Condições cromatográficas

A análise cromatográfica para quantificar taninos foi realizada de acordo com Vasconcelos et al. (2011) com modificações. Foram utilizados cromatógrafo líquido Shimadzu® (UFLC, Japão) controlado pelo Software LC Solution 1.0 e constituído por bomba LC-20 AT, desgaseificador DGU – $20A_5$, injetor automático Sil- 20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD – M20A. Empregou-se coluna C_{18} Restek® (250 mm x 4 mm, 5 µm) mantida a 30°C. Os padrões e as amostras foram eluídos através de um gradiente de fase móvel composto por 0,5 % de ácido acético (pH 3,0) (A) e metanol (B). As condições do gradiente foram: 0 - 50 min (90 - 10 % de A e 10 - 90 % de B), 50 - 55 min (10 - 90 % de A e 90 - 10 % de B), 55 - 60 min (90 % de A e 10 % de B). O fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. Os cromatogramas foram obtidos a 290 nm.

Preparação das amostras

O EASA foi usado na concentração de 1,6 mg/mL. Para a obtenção dos padrões, foram preparadas soluções aquosas de catequina (0,16 mg/mL), ácidos gálico (0,16 mg/mL) e elágico (0,16 mg/mL), epicatequina (0,1 mg/mL) e solução metanólica de ácido clorogênico (0,05 mg/mL). As concentrações dos padrões foram utilizadas para construir as curvas analíticas. Todas as amostras e padrões foram filtrados através de membranas de 0,22 µm (Millipore®) e injetadas em triplicata.

4.5 Animais

Ratos Wistar machos e fêmeas (Rattus norvegicus var. albinus) com 2 meses de idade, pesando 250-280g e 210-240g, respectivamente, foram obtidos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). E camundongos Swiss machos e fêmeas (Mus musculus), com 2 meses de idade, pesando 35-40 g e 30-35 g, respectivamente, obtidos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os animais foram mantidos sob condições ambientais padrão (22 ± 2°C; 12:12 h ciclo de claro/escuro). Água e ração industrializada (Presence®, Purina, Brasil) foram disponíveis ad libitum. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética e experimentação animal

da UFPE (Processo nº. 26449) de acordo com o Instituto Nacional das Diretrizes de Saúde para o Cuidado e Uso dos animais de Laboratório.

4.6 Tratamentos

Em revisão de literatura não foram verificados estudos que investigassem as atividades anti-inflamatória, antiulcerogênica e hepatoprotetora do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* (EASA). Portanto, as doses do EASA foram selecionadas a partir de estudos-piloto realizados no laboratório (dados não mostrados) e nas doses previamente utilizadas para a verificação das atividades gastroprotetoras e anti-inflamatórias com outras espécies da família Simaroubaceae de acordo com Novello et al. (2008), Melanchauski et al. (2010) e Almeida et al. (2011). Desse modo, as doses selecionadas do EASA foram 100, 250 e 500 mg/kg de massa corporal.

4.7 Protocolos experimentais

Nessa secção serão descritos os modelos experimentais para avaliação das atividades anti-inflataória, antiulcerogênica, hepatoprotetora e segurança de uso do EASA.

4.7.1 Determinação do edema de pata induzido por carragenina ou histamina

O ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Winter, Risley e Nuss (1962). Ratos *Wistar* machos foram submetidos a jejum de 12 h com livre acesso à água e randomicamente divididos em 6 grupos (n = 6/grupo). O grupo I (controle - recebeu água), o grupo II (indometacina 10 mg/kg de massa corporal, v.o., ou hidroxizina 70 mg/kg), os grupos III – VI foram tratados, v.o., com EASA nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg, respectivamente. Foram usados como padrões no grupo II: indometacina um anti-inflamatório não esteroide e hidroxizina um agonista inverso de receptores histaminérgicos H_1.

Decorridos 1 h após os tratamentos foi administrado por via subplantar, na pata direita traseira de cada animal, 0,1 mL da solução de carragenina 1% ou histamina 0,1%. A pata contralateral (controle) recebeu o mesmo volume de solução salina 0,9%. Imediatamente após a injeção (t = 0 h), o volume das patas foi medido por meio de um hidropletismômetro (Ugo Basile 7140) e em intervalos regulares (t = 0,5; 1; 2; 3 e 4 h). O volume do edema (mL) foi expresso como a diferença entre as patas direita e esquerda.

4.7.2 Atividade antiulcerogênica do EASA

Para investigar a atividade antiulcerogênica do EASA, serão usados dois modelos para avaliação do efeito preventivo do EASA (etanol a 70% e indometacina) e outro, com a utilização do ácido acético, para verificar o efeito curativo do mesmo. Nesse últmo, também serão descritos protocolos para análise histológica e imunohistoquímica.

4.7.2.1 Úlcera gástrica induzida por etanol 70%

Após 16 h de jejum, os ratos foram aleatoriamente divididos em 5 grupos (n = 6/grupo) e tratados. O grupo I (controle - recebeu água), o grupo II (pantoprazol 40 mg/kg, v.o.), os grupos III – V foram tratados com o EASA nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg, respectivamente. 1h após os tratamentos, as lesões gástricas foram induzidas por etanol (70%, 0,5 mL/100 g de massa corporal, v.o.) de acordo com o método descrito por Robert et al. (1979). O grupo II (padrão) foi representado por pantoprazol, um inibidor da bomba de prótons.

Uma hora após a indução das lesões, os animais foram anestesiados e eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico utilizando Nembutal® até a dose de 140 mg/kg, i.p. Os estômagos foram removidos, abertos ao longo da maior curvatura, o conteúdo estomacal descartado, a mucosa cuidadosamente lavada com solução de NaCl 0,9% e examinada quanto à presença de lesões. Os estômagos foram então fotografados e a extensão da lesão foi mensurada (mm^2) no programa Image J em relação à área total do corpo gástrico (KHAN, 2004).

4.7.2.2 Úlcera gástrica induzida por indometacina

Os grupos experimentais e tratamentos foram estabelecidos conforme o protocolo anterior. Exceto a indução das lesões gástricas que foi feita pela administração subcutânea de indometacina (30 mg/kg), 30 min após os respectivos tratamentos de acordo com Djahanguri (1969). Seis horas após a injeção de indometacina, os animais foram anestesiados e eutanasiados com aprofundamento do plano anestésico utilizando Nembutal® até a dose de 140 mg/kg, i.p. Seus estômagos foram removidos e avaliados sob ampliação para determinar as lesões gástricas produzidas.

Por não permitir uma mensuração direta fácil, essas lesões são avaliadas subjetivamente e pontuadas segundo o grau aparente de intensidade e comprometimento da mucosa de acordo com Vela et al. (1997). Os resultados foram expressos como índice de lesão (considerando cor, edema, perda de muco e de pregas da mucosa gátrica), índice de úlcera (petéquias, hemorragia, número e tamanho das lesões necro-hemorrágicas) e índice total.

4.7.2.3 Úlcera gástrica induzida por ácido acético

A indução da úlcera foi realizada como descrito por Okabe e Amagase (2005). Após 16 h de jejum, os ratos (n = 6/grupo) foram anestesiados (xilasina 7 mg/kg, i.p. e cetamina 70 mg/kg, i.p.) e a laparotomia realizada por meio de uma incisão epigástrica mediana. Após a exposição do estômago, 0,05 mL de uma solução de ácido acético 30% (v/v) foi injetado na camada sub-serosa da parte glandular da parede anterior. O estômago foi lavado com solução de NaCl 0,9% para evitar aderência à superfície externa da região ulcerada. O abdômen foi então suturado e os animais alimentados normalmente.

Um dia após a cirurgia, os animais foram randomicamente divididos em 3 grupos (n = 6/grupo) e tratados, v.o., uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos. O grupo I (controle – recebeu água), o II (pantoprazol 40 mg/kg), o III (EASA 500 mg/kg). Durante esse período, a massa corporal, o consumo de água e ração foram registrados diariamente. No 15º dia, os animais foram anestesiados e eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico utilizando Nembutal® até a dose de 140 mg/kg, i.p. Seus estômagos foram removidos e as lesões gástricas foram avaliadas por meio da análise da superfície gástrica interna com uma lupa. Os estômagos foram então fotografados e a extensão da lesão foi mensurada (mm^2) pelo programa Image J (KHAN, 2004). Amostras de sangue também foram coletadas do plexo retro-orbital para quantificação de lactato desidrogenase (VASCONCELOS et al., 2011).

4.7.2.3.1 Exame histológico do estômago

Os estômagos foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 h. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água e imersas em álcool a 70% até a análise histológica. Os estômagos foram impregnados e incluídos em parafina, de onde foram obtidos cortes com espessura de 5µm. As lâminas histológicas foram analisadas após serem coradas com hematoxilina-eosina (HE) e com o ácido periódico de Schiff (PAS), para verificar a produção

de muco. As análises das imagens foram realizadas em microscópio automático MICRO DIP® (Kacil Inc.) do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE.

4.7.2.3.2 Análise imunohistoquímica do estômago

A análise imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi realizada em estômago parafinizado de rato. Cortes de 4 µm de espessura foram obtidos, fixados em lâmina, desparafinizados em xileno e rehidratados. A recuperação antigênica foi realizada utilizando forno microondas a 100 ºC. Depois de resfriar à temperatura ambiente, a peroxidase endógena foi bloqueada com solução de bloqueio da peroxidase. As secções foram incubadas com os anticorpos primários para PCNA (anticorpo anti-PCNA [PC10] - marcador de proliferação (ab29) - anticorpo monoclonal de rato) (1:100), durante 30 min e, em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário (Nichirei Biosciences®) (1:200), durante 30 min e lavou-se em PBS (*phosphate buffered saline*). A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB), contra-coradas com hematoxilina e montadas em resina.

As células coradas pelo PCNA foram contadas e o índice de PCNA foi calculado pela contagem de 1000 núcleos em cada lâmina utilizando a seguinte fórmula: (número de células coradas/número de células coradas e não coradas) x 100. A reatividade ao PCNA foi verificada pela coloração marrom dos núcleos das células epiteliais utilizando os parâmetros de imunoreatividade fraca, moderada e intensa para a avaliação dos mesmos. As análises das imagens foram realizadas em microscópio automático MICRO DIP® (Kacil Inc.) do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE.

4.7.3 Atividade hepatoprotetora do EASA

Para a investigação do efeito hepatoprotetor do EASA utilizou-se como agente indutor da injúria hepática o tetracloreto de carbono, cujo protocolo é descrito a seguir. Também foram realizados análises de enzimas marcadoras do dano hepático, antioxidantes, níveis de peroxidação lipídica e avaliação imunohistoquímica.

4.7.3.1 Hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4)

A injúria hepática foi induzida de acordo com Simile et al. (2001) com poucas modificações. Os animais foram randomicamente divididos em 6 grupos (n = 6/grupo). O

Grupo I (veículo – recebeu óleo de milho); grupo II (controle -CCl_4); os grupos III, IV, V e VI, foram pré-tratados (v.o.) durante 10 dias consecutivos, uma vez ao dia, com Legalon® 50 mg/kg, EASA nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg, respectivamente. A injúria hepática foi induzida no 11º dia pela administração, por via oral, de 2 mL/kg de CCl_4 (20%; diluído em óleo de milho). Os animais jejuaram *overnight* com livre acesso à agua *ad libitum*. Decorridos 24 h após a injúria, os animais foram anestesiados com Nembutal® (35 mg/kg, i.p.) e as amostras sanguíneas foram coletadas por punção do plexo retro-orbital para as análises bioquímicas. Em seguida, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico com Nembutal® até a dose de 140 mg/kg, i.p., para remoção cuidadosa dos fígados.

4.7.3.2 Homogenato de tecido hepático

O homogenato de tecido hepático foi preparado em tampão Tris-HCl 50 mM contendo 1mM EDTA (pH 7,4), ortovanadato de sódio 1 mM e fluoreto de fenilmetanossulfonil 2 mM (PMSF). Para isso, pesou-se 60 mg de tecido hepático para cada 1 mL de tampão. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2500 x g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado nos experimentos seguintes como descritos abaixo. A concentração de proteína no sobrenadante foi estimada pelo método de Bradford utilizando albumina sérica bovina (BSA) cristalina como padrão (Bradford, 1976).

4.7.3.2.1 Peroxidação lipídica

O estresse oxidativo foi estimado através dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com Buege e Aust (1978). Na reação com o ácido tiobarbitúrico (ATB), o malondialdeído (MDA) ou substâncias semelhantes a ele reagem para produzir um pigmento de cor rosa com um máximo de absorção a 535 nm. Resumidamente, a reação foi desenvolvida pela adição sequencial da amostra (100 µL do homogenato de fígado), ácido tricloroacético a 30% e 10 mM Tris-HCl (pH 7,4). A mistura foi centrifugada a 2500 x g durante 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado ATB a 0,8% (v/v). A mistura foi levada à ebulição em banho-maria durante 30 min. Após resfriamento, a absorbância da fase orgânica foi lida a 535 nm num espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol por mg de proteína (nmol / mg de proteína).

4.7.3.2.2 Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da superóxido dismutase total (SOD-t) foi realizada de acordo com Misra e Fridovich (1972). Os homogenatos de fígado (80 µg) foram incubados com 880 µL de carbonato de sódio (0,05%; pH 10,2; 0,1 mM de EDTA) em banho-maria, durante 45 min a 37°C, antes da aferição. A reação foi desenvolvida através da adição de 20 µL de epinefrina 30 mM (em ácido acético a 0,05%). A absorbância foi lida a 480 nm, durante 3 min. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para inibir 1 µmol de epinefrina por minuto. A atividade enzimática da SOD-t tecidual foi expressa em unidades por mg de proteína (U / mg de proteína).

4.7.3.2.3 Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi mensurada de acordo com Aebi (1984). O princípio do ensaio baseiou-se na determinação da taxa constante k de decomposição de H_2O_2 nos homogenatos de fígado (80 µg), que nas condições de temperatura (30°C) e pH (7,0) estabelecidas foi definida como $4,6 \times 10^7$. Por meio das alterações na mensuração da absorbância (240 nm) por minuto, durante 4 min, determinou-se a constante de velocidade da enzima. As atividades enzimáticas foram expressadas como H_2O_2 consumido em µmol/min/mg de proteína.

4.7.3.3 Análise imunohistoquímica do fígado

A análise imunohistoquímica do PCNA foi realizada em fígado parafinizado de rato e seguiu como descrito no protocolo 4.7.2.3.2.

4.7.3.4 Parâmetros bioquímicos

No final do tratamento, o sangue coletado foi centrifugado a 1500 × g durante 10 minutos para obter o soro (VASCONCELOS et al., 2011). As análises séricas dos marcadores da função hepática como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamiltranspeptidase (GGT), lactato desidrogenase (LDH),

bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD) e bilirrubina indireta (BI) foram determinadas usando sistemas comerciais de diagnóstico padronizados da Boehringer Ingelheim®.

4.7.4 Ensaios de toxicidade

Para se avaliar os efeitos do EASA nos tratamentos agudo e de doses repetidas durante 30 dias consecutivos, foram utilizados dois protocolos experimentais de toxicidade elaborados pela *Organization for Economic Co-Operation and Development.*

4.7.4.1 Toxicidade aguda

O estudo de toxicidade aguda foi realizado em ratos, segundo o protocolo "Up and down", teste 425 descrito pela *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD, 2001), com pequenas modificações.

Ratos Wistar saudáveis, de ambos os sexos, foram submetidos a jejum de 12 h com livre acesso à água e divididos em 4 grupos (n=5/grupo/sexo). Os grupos em tratamento receberam oralmente o EASA na dose de 2000 mg/kg de massa corporal. Já os grupos controles receberam água (10 mL/kg). Os animais foram observados aos 30, 60, 120, 180 e 240 min após os tratamentos e diariamente durante 14 dias. Alterações no comportamento, na massa corporal, no consumo de ração e água, sinais clínicos de toxicidade e mortalidade foram registrados diariamente (MALONE, 1977).

4.7.4.2 Toxicidade de doses repetidas

O ensaio foi realizado de acordo com *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD, 1995), com pequenas modificações. Camundongos *Swiss* saudáveis de ambos os sexos foram divididos randomicamente em 8 grupos (n=12/grupo/sexo) e tratados oralmente. Os grupos I e II (controles – receberam água) e os demais foram tratados com o EASA nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg/dia durante 30 dias consecutivos. A massa corporal foi registrado semanalmente e a ingestão de ração e água foi monitorada diariamente. Os animais foram observados quanto aos sinais de anormalidades durante o período de tratamento. Ao final, os animais foram submetidos a jejum de 12 h com livre acesso a água *ad libitum*. Em seguida, foram anestesiados com Nembutal® (35 mg/kg, i.p.) e as amostras de sangue foram obtidas por punção retro-orbital (WAYNFORTH, 1980) usando tubos capilares para análises hematológica e bioquímica.

4.7.4.2.1 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

As avaliações foram realizadas de acordo com Silva et al. (2009). A análise hematológica foi realizada por meio de analisador hematológico automático (Coulter STKS, Beckman®). Os parâmetros avaliados foram: eritrócitos, glóbulos brancos (GB), hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), variação de tamanho das hemácias – *Red Cell Distribution Width* (RDW), plaquetas e volume médio de plaquetas (VMP). A contagem diferencial de leucócitos foi feita em microscópio óptico após coloração e, em cada caso, 100 células foram contadas.

Para a análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 1500 × g durante 10 minutos para a obtenção do soro, que foi armazenado a -20 ºC até serem determinados os seguintes parâmetros: glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD) e indireta (BI), lactato desidrogenase (LDH), colesterol total, triglicerídeos, proteínas totais e albumina. As dosagens foram feitas usando sistemas comerciais de diagnóstico padronizados da Boehringer Ingelheim®.

4.7.4.2.2 Estudo morfológico

Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico com Nembutal® até a dose de 140 mg/kg, i.p. A necropsia foi realizada nos animais (n=6/grupo/sexo) para analisar as características externas macroscópicas do coração, pulmão, fígado, estômago, baço, rins, adrenais, órgãos reprodutores masculino (testículos, epidídimos e vesícula seminal) e feminino (útero e ovários). Esses órgãos foram cuidadosamente removidos e pesados individualmente. As massas dos órgãos foram expressas em termos absolutos e relativos (g e g/100g de massa corporal, respectivamente).

Já o exame histológico foi realizado nos animais restantes do grupo (n=6/grupo/sexo). Os mesmos órgãos foram cuidadosamente removidos e fixados em formalina tamponada a 10% por 24 h. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água e imersas em álcool a 70%

até a análise histológica. Em seguida, os órgãos foram impregnados e incluídos em parafina, de onde foram obtidos cortes com espessura de 5µm. As lâminas histológicas foram analisadas após serem coradas com hematoxilina-eosina (HE). As imagens foram capturadas e adaptadas através de um sistema automatizado com *zoom* digital Micro DIP® Kacil do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE.

4.7.5 Análise estatística

Os resultados das análises foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M). A diferença entre os grupos foi estabelecida pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls quando necessário. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism®5.0. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre ≥ 5%.

RESULTADOS

5. Resultados

Os resultados descritos a seguir abrangem os obtidos na caracterização fitoquímica, nos protocolos de investigação da atividade farmacológica e os de segurança de uso do EASA.

5.1 Caracterização química do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara*

A seguir são descritos os metabólitos identificados na CCD e os quantificados na CLAE, baseado nessa análise preliminar.

5.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise fitoquímica do extrato seco da casca do caule de *Simarouba amara* revelou a presença de taninos hidrolisáveis (ácidos gálico e elágico) e taninos condensados (proantocianidinas e leucoantocianidinas). As leucoantocianidinas são reduzidas à procianidinas, classe na qual se encontram os taninos condensados catequina e epicatequina (SIMÕES et al., 2004). Fenilpropanóides e ácido caféico também foram identificados, bem como vestígios de saponinas, esteróides e quassinóides.

5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise do EASA por CLAE revelou a presença de picos cromatográficos consistentes com os padrões. Os tempos de retenção dos padrões foram 5,78; 17,80; 18,57; 19,15 e 32,6 min para o ácido gálico, ácido clorogênico, catequina, epicatequina e ácido elágico, respectivamente. E os do EASA foram 5,76; 17,90; 18,62; 19,26 e 32,7 min, respectivamente (Figura 2).

As concentrações dos metabólitos (x) presentes no EASA foram obtidas através das equações de regressão linear criadas para os compostos de referência, no qual Y é a média das áreas dos picos. As equações obtidas foram: ácido gálico ($Y = 7972.5 + 46676\ x$, R^2 : 0.9996); ácido clorogênico ($Y = -14411 + 39623.6\ x$, R^2 : 0.9996); catequina ($Y = 133758.92 + 325788.25\ x$, R^2 : 0.9998); epicatequina ($Y = -32128.5 + 46676.2\ x$, R^2 : 0.9995) e ácido elágico ($Y = 7972.5 + 46676.2\ x$, R^2 : 0.9996). A análise da regressão linear indicou

linearidade do método. As concentrações desses compostos no EASA foram, respectivamente, 16,47 µg/mL; 3,83 µg/mL; 349,96 µg/mL; 16,43 µg/mL e 1,29 µg/mL.

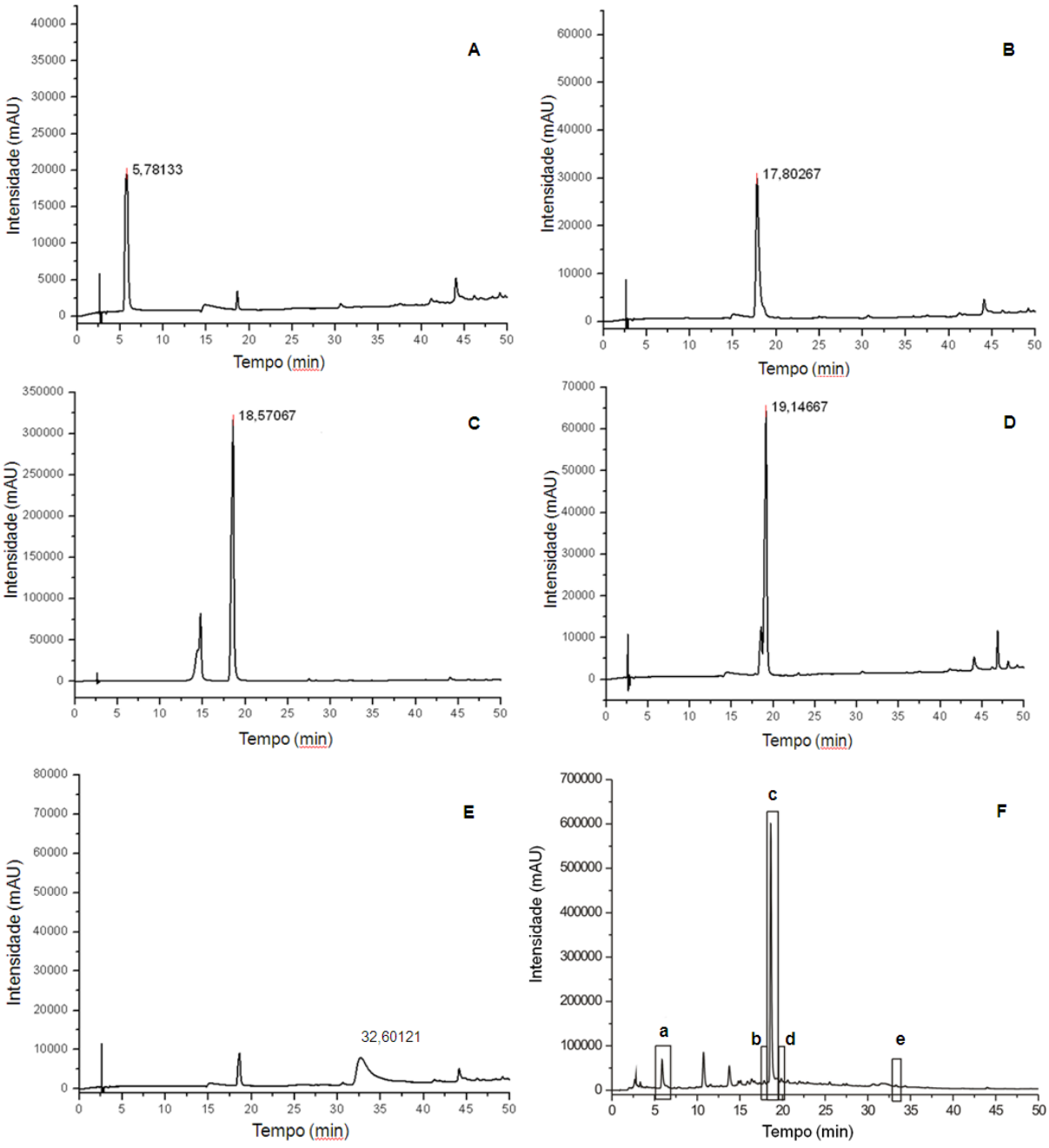

Figura 2: CLAE dos padrões e do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* (EASA). Padrões: **A** – ácido gálico; **B** – ácido clorogênico; **C** – catequina; **D** – epicatequina; **E** – ácido elágico; EASA: **F** – (a – ácido gálico; b – ácido clorogênico; c – catequina; d – epicatequina; e – ácido elágico).

5.2 Determinação do edema de pata induzido por carragenina ou histamina

A carragenina produziu uma reação edematogênica aguda e progressiva nas patas dos animais, atingindo o pico em 3 horas. Até 2 h após a sua administração, todas as doses do EASA produziram inibição significativa do edema em relação ao controle. Porém, apenas a dose 500 mg/kg manteve esse efeito inibitório durante e após o pico inflamatório com percentuais de inibição de 43,4% e 54,8%, respectivamente, comparado ao controle (figura 3).

Em relação ao edema induzido pela histamina, o efeito anti-histamínico do EASA foi observado para todas as doses até 2 h após a indução (pico da reação edematogênica). As reduções significativas do edema foram de 10,4; 12,0 e 56,0% para as doses de 100, 250 e 500 mg/kg, respectivamente, em relação ao controle. Nas horas posteriores, apenas a dose de 500 mg/kg manteve a ação farmacológica (figura 4).

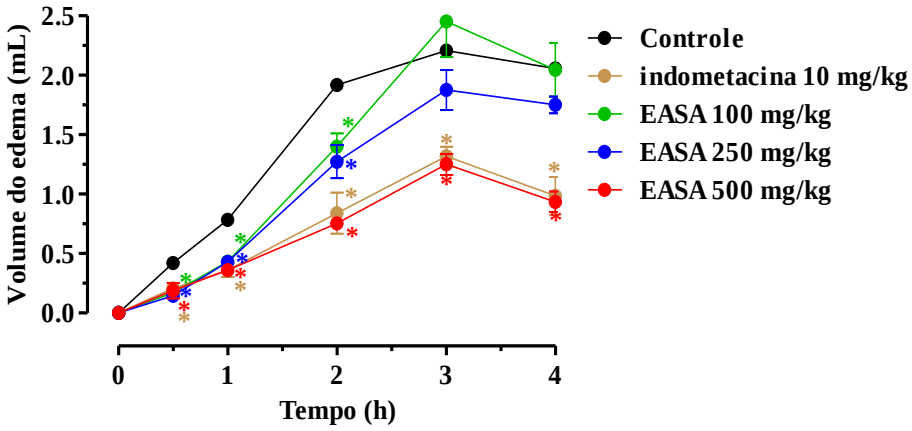

Figura 3: Efeitos do EASA sobre o volume do edema da pata (mL) de ratos Wistar induzido por carragenina 1%. Os valores representam a média ± E.P.M. (n= 6/grupo). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

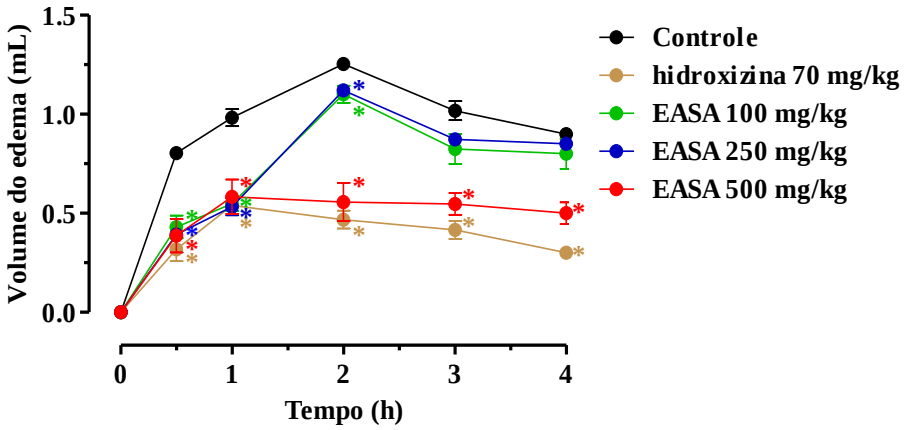

Figura 4: Efeitos do EASA sobre o volume do edema da pata (mL) de ratos Wistar induzido por histamina 0,1%. Os valores representam a média ± E.P.M. (n= 6/grupo). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5.3 Atividade antiulcerogênica do EASA

O pré-tratamento com o EASA, em todas as doses, inibiu a formação de lesões gástricas (mm^2) induzidas por etanol 70% quando comparado ao controle (figura 5). A porcentagem de inibição das úlceras foi de 66,9; 87,7 e 96,3% para as doses de 100, 250 e 500 mg/kg, respectivamente. A maior dose do EASA produziu inibição semelhante a do pantoprazol (93%). O pré-tratamento com todas as doses do EASA também reduziu os efeitos ulcerogênicos provocados pela indometacina (30 mg/kg, s.c) quando comparado ao controle (tabela 2).

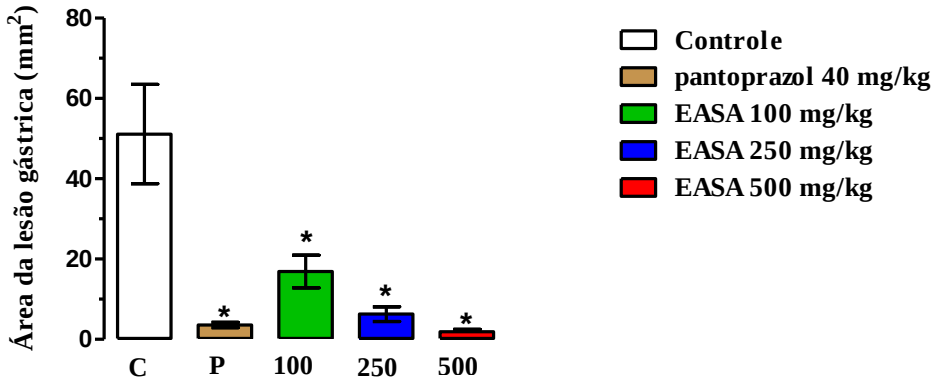

Figure 5: Efeito gastroprotetor do EASA sobre lesões gástricas (mm^2) induzidas por etanol 70%. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 6/grupo). * Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela 2: Efeito gastroprotetor do EASA sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina 30 mg/kg (s.c) em ratos Wistar.

Grupos	Índice de lesão	Índice de úlcera	Índice total
Controle	3,99 ± 0,16	21,77 ± 0,93	25,76 ± 1,03
pantoprazol	0,92 ± 0,12*	2,33 ± 0,18*	3,25 ± 0,71*****
EASA 100	1,52 ± 0,13*****	4,52 ± 0,41*****	6,04 ± 1,50*****
EASA 250	1,08 ± 0,15*****	3,18 ± 0,31*****	4,26 ± 1,05*****
EASA 500	0,75 ± 0,12*	1,12 ± 0,22*	1,87 ± 0,18*****

Pantoprazol 40 mg/kg; EASA nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 6 / grupo). * Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

No modelo de indução com ácido acético a 30%, o EASA 500 mg/kg acelerou a cicatrização da úlcera gástrica dos ratos durante os 14 dias de tratamento (figura 6), diminuindo estatisticamente a área principal da lesão (1,89 ± 0,56 mm^2) (95,7%) quando comparado ao controle (44,51 ± 0,65 mm^2) e não diferindo significativamente da redução promovida pelo pantoprazol (2,13 ± 0,83 mm^2) (95,2%). Os níveis de LDH (U/L) estavam significativamente diminuídos ao final do tratamento nos animais tratados com EASA (573, 70 ± 6,67) e com o pantoprazol (522,00 ± 5,95) quando comparados ao controle (988,00 ± 8,97).

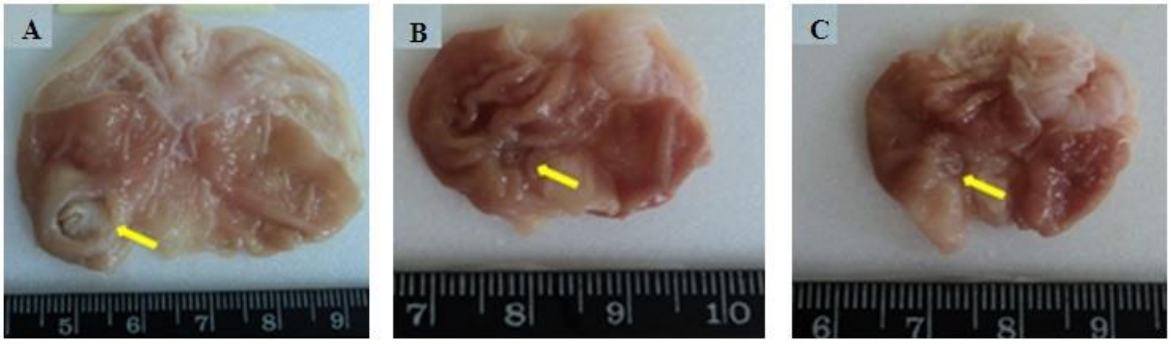

Figura 6: Efeito gastroprotetor do EASA sobre lesões gástricas (mm^2) induzidas por ácido acético a 30%. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 6 / grupo). **A** – controle; **B** – pantoprazol 40 mg/kg; **C** – EASA 500 mg/kg.

A coloração por HE revelou que a úlcera induzida por ácido acético 30% nos animais do controle ocasionou destruição das camadas epitelial, mucosa e submucosa com abundante infiltrado inflamatório e demonstrou as ações gastroprotetoras do pantoprazol (40 mg/kg) e do EASA (500 mg/kg) confirmadas pela presença de áreas reepitelizadas. A coloração por PAS também revelou a presença de muco gástrico e o arranjo de glândulas intactas nos grupos tratados com o pantoprazol ou o EASA. A atividade secretória está ilustrada na figura pela cor rosa intensa (figura 7).

Os tecidos gástricos parafinizados também foram usados para a localização imunohistoquímica do PCNA. Os núcleos celulares positivos ao PCNA estão corados em marrom. Os animais tratados com o EASA apresentaram intensa imunoreatividade ao PCNA (> 75%) quando comparado ao controle. Essa reação foi similar ao pantoprazol. As amostras do controle apresentaram intenso infiltrado linfocitário e imunoreatividade fraca ao PCNA (< 50%) verificada apenas nos núcleos celulares remanescentes na camada adjacente à úlcera (figura 8).

Durante o tratamento, os animais que receberam o EASA 500 mg/kg ou pantoprazol não apresentaram sinais visíveis de toxicidade tais como diarréia, alterações no comportamento ou na atividade locomotora. Os animais tratados com o EASA apresentaram elevação significativa no consumo de água do 3º ao 8º dia de tratamento (figura 9) comparado ao controle, não diferindo após esse período. Já o consumo de ração (figura 10) manteve-se elevado do início até o final do tratamento em relação ao controle, porém o ganho de massa corporal só foi significativo até o 8º dia de tratamento em relação ao mesmo grupo (figura 11).

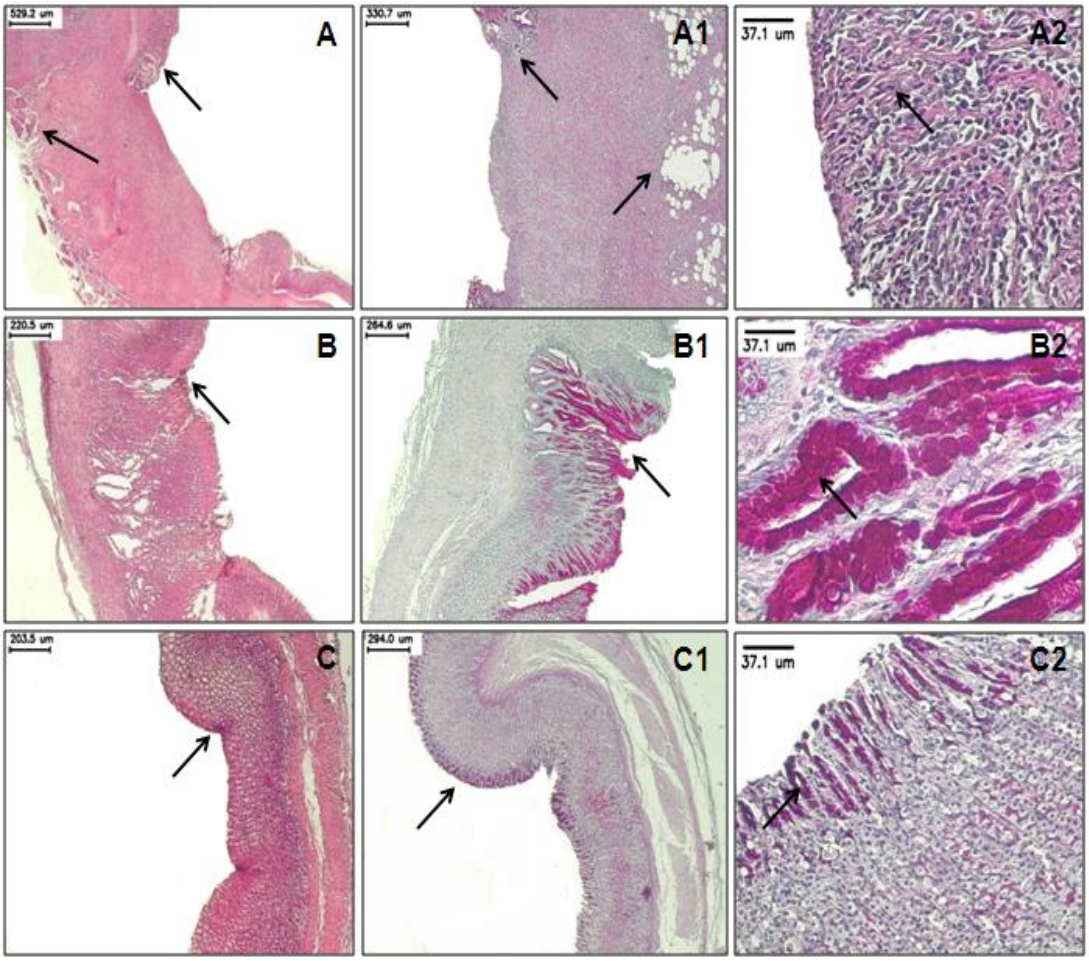

Figura 7: Cortes histológicos dos estômagos de ratos tratados com EASA 500 mg/kg. **A** – controle em HE (aumento 10 x), com destruição das camadas epitelial, mucosa e submucosa (setas). **A1 e A2** – controle em PAS (aumento 10 x), apresentando destruição total da camada glandular da mucosa (setas) e intenso infiltrado inflamatório (setas), respectivamente. **B** – pantoprazol em HE (aumento 10 x), destacando a camada de reepitelização (setas). **B1 e B2** – pantoprazol em PAS, evidenciando camada de reepitelização com formação glandular (setas) (aumentos de 10x e 400x, respectivamente). **C** – EASA 500 mg/kg em HE (aumento 10 x), destacando camada de reepitelização (setas). **C1** e **C2** - EASA 500 mg/kg em PAS, mostrando camada de reepitelização com formação glandular (setas) (aumentos de 10 x e 400 x, respectivamente).

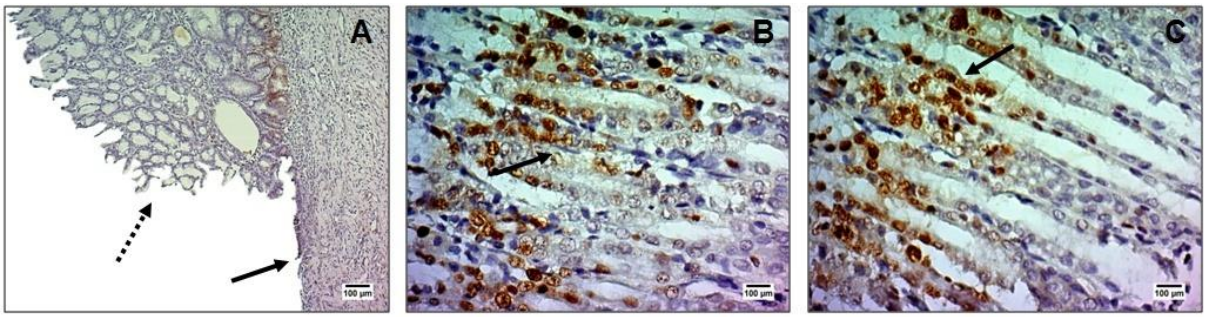

Figura 8: Análise imunohistoquímica do PCNA nas células estomacais de ratos tratados com EASA 500 mg/kg. **A** – controle (aumento 200 x): destruição da camada epitelial (seta pontilhada) e área com infiltrado linfocitário e imunoreatividade fraca ao PCNA (< 50%) nos núcleos celulares remanescentes (seta); **B** – pantoprazol (aumento 500 x): imunoreatividade intensa ao PCNA (> 75%); **C** – EASA 500 mg/kg (aumento 500 x): imunoreatividade intensa ao PCNA (> 75%).

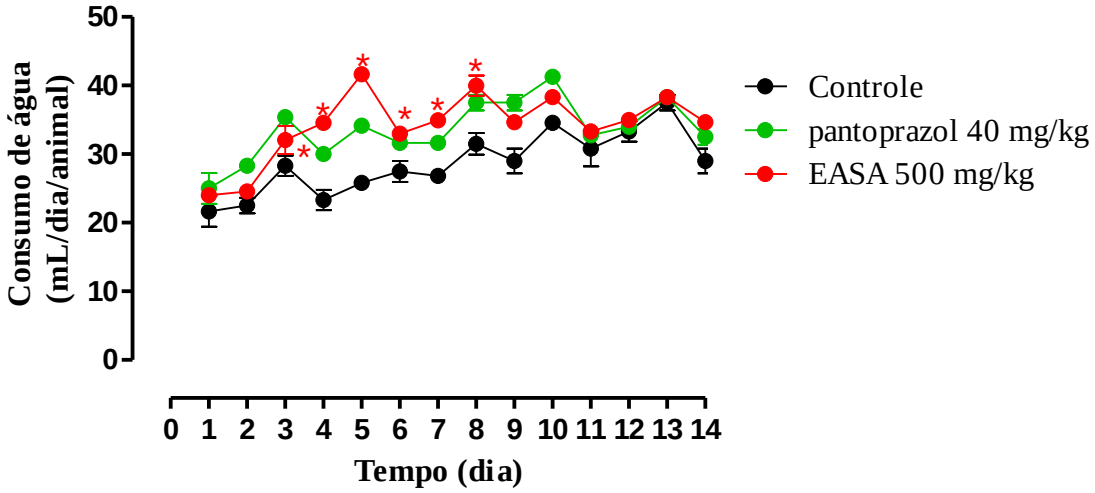

Figura 9: Consumo de água (mL/dia/animal) dos animais tratados com EASA 500 mg/kg durante 14 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M. (n= 6/grupo). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, p < 0,05).

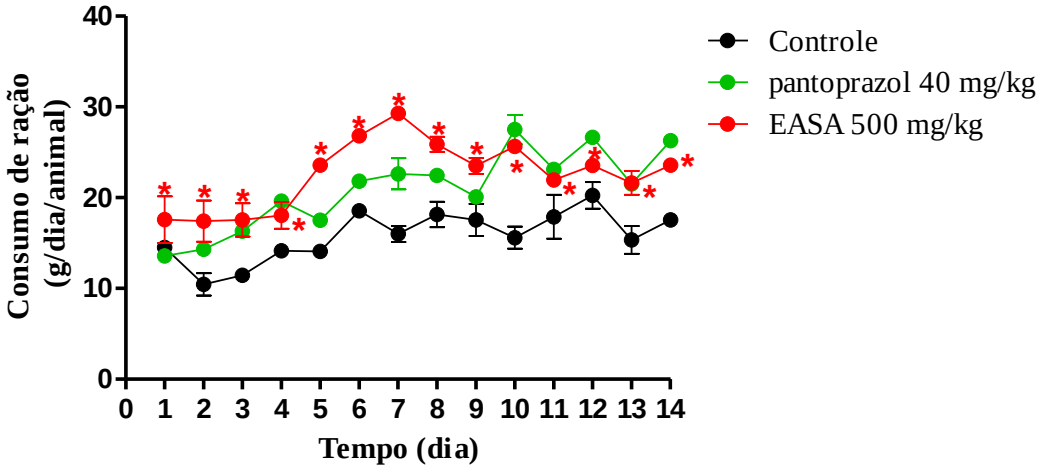

Figura 10: Consumo de ração (g/dia/animal) dos animais tratados com EASA 500 mg/kg durante 14 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M. (n= 6/grupo). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

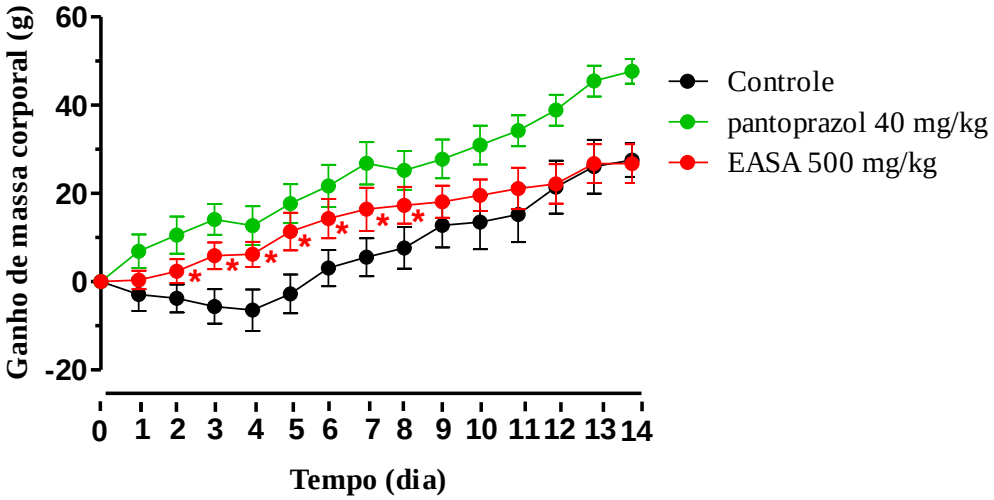

Figura 11: Ganho de massa corporal (g) dos animais tratados com EASA 500 mg/kg durante 14 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M. (n= 6/grupo). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5.4 Atividade hepatoprotetora do EASA

A administração do CCl_4 promoveu estresse oxidativo significativo nos animais do controle que pôde ser constatado por intermédio dos níveis aumentados do malondialdeído (MDA) no tecido hepático. Entretanto, o pré-tratamento com todas as doses do EASA evitou essa elevação comparado ao controle. Não foram observadas diminuição das atividades da

SOD e CAT induzida por CCl_4 , porém o tratamento com o EASA nas doses de 250 e 500 mg/kg aumentou a expressão de CAT (tabela 3).

Tabela 3: Efeitos do EASA sobre os níveis de peroxidação lipídica, catalase and superóxido dismutase em ratos Wistar.

Grupos	**MDA (nmol/mg proteína)**	**CAT (U/mg proteína)**	**SOD (U/mg proteína)**
Controle	5,94 ± 0,88	0,33 ± 0,03	11,96 ± 0,06
Veículo	3,88 ± 0,44	0,46 ± 0,04	11,89 ± 0,17
Legalon®	3,19 ± 0,36 *	0,40 ± 0,02	11,57 ± 0,62
EASA 100 + CCl_4	3,42 ± 0,37 *	0,45 ± 0,05	12,22 ± 0,13
EASA 250 + CCl_4	2,69 ± 0,42 *	0,92 ± 0,12 *	11,77 ± 0,21
EASA 500 + CCl_4	3,56 ± 0,55 *	0,83 ± 0,02 *	12,17 ± 0,34

Os valores representam a média ± E.P.M. (n= no mínimo 4 animais/grupo). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$). MDA: malondialdeído; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase.

A administração CCl_4 também resultou numa elevação significativa dos níveis de ALT, AST, LDH e bilirrubina. O pré-tratamento com todas as doses do EASA reverteu os níveis aumentados dessas enzimas, entretanto os níveis elevados de GGT só foram reduzidos pelo tratamento com a maior dose (tabela 4).

A análise imunohistoquímica do fígado revelou um grande número de células imunorreativas ao PCNA nos animais tratados com EASA em todas as doses (intensa imunoreatividade), quando comparado ao grupo controle (imunoreatividade fraca) (figura 12). Os hepatócitos dos animais tratados com o EASA 500 mg/kg apresentaram imunoreatividade semelhante ao Legalon® (> 75%).

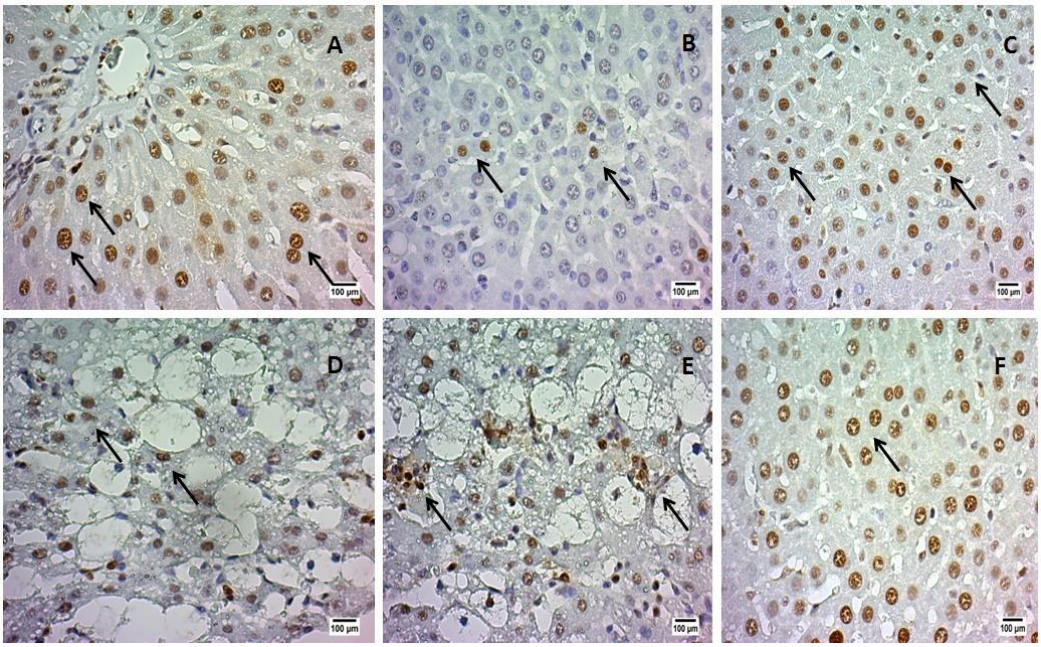

Figura 12: Análise imunohistoquímica do PCNA no tecido hepático de ratos tratados com EASA (aumentos 500 x). **A** – Veículo (óleo de milho); **B** – Controle (CCl_4); **C** - Legalon® ; **D** – EASA 100 mg/kg; **E** – EASA 250 mg/kg; **F** – EASA 500 mg/kg. Núcleos imunoreativos ao PCNA (pontos marrons indicados pelas setas).

Tabela 4: Efeitos do EASA sobre as enzimas hepáticas de ratos Wistar.

Grupos	AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)	GGT (U/L)	BT (mg/dL)	BD (mg/dL)	BI (mg/dL)	LDH (U/L)
Veículo	85,53 ± 4,78	43,70 ± 2,27	96,80 ± 5,50	0,20 ± 0,20	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,01	328,60 ± 3,57
Controle	2001,00 ± 7,35	2478,00 ± 6,45	125,60 ± 6,40	2,20 ± 0,60	0,42 ± 0,07	0,26 ± 0,08	0,13 ± 0,03	2560,01 ± 8,81
Legalon®	213,70 ± 8,70*	120,80 ± 4,95*	100,00 ± 8,30	1,50 ± 0,60	0,25 ± 0,15*	0,20 ± 0,10	0,05 ± 0,05*	421,50 ± 5,50*
EASA 100 + CCl_4	501,80 ± 9,25*	576,50 ± 6,31*	92,70 ± 8,70	0,80 ± 0,30	0,10 ± 0,00*	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00*	599,50 ± 16,40*
EASA 250 + CCl_4	419,70 ± 7,66*	541,00 ± 14,20*	91,20 ± 7,50	0,80 ± 0,40	0,10 ± 0,00*	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00*	462,80 ± 7,93 *
EASA 500 + CCl_4	252,80 ± 5,42*	220,60 ± 6,92*	86,20 ± 6,50	0,30 ± 0,20*	0,12 ± 0,00*	0,10 ± 0,00	0,02 ± 0,00*	337,80 ± 2,60 *

Os valores representam a média ± E.P.M (n = 6/grupo). * Estatisticamente diferente do controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina, GGT: gama-glutamiltranspeptidase; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: lactato desidrogenase.

5.5 Ensaios de toxicidade

Os resultados obtidos no ensaio agudo estão descritos a seguir assim como os de doses repetidas, incluindo os gráficos de consumo de água, ração e ganho de massa corporal; as tabelas com os parâmetros bioquímicos, hematológicos e as massas absoluta e relativa dos órgãos; e as imagens histológicas dos tecidos e órgãos que apresentaram alguma alteração.

5.5.1 Toxicidade aguda

Os resultados indicaram que o tratamento agudo, por via oral, com o EASA na dose de 2000 mg/kg de massa corporal não produziu alteração comportamental nem sinal de toxicidade ou morte dos animais durante os 14 dias de observação. De forma similar, não houve alteração no consumo de água e ração durante o mesmo período (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que a DL_{50} é maior que 2000 mg/kg, o que indica baixa toxicidade do extrato.

5.5.2 Toxicidade de doses repetidas

Nenhum sinal de toxicidade (piloereção, alteração na atividade locomotora e diarreia) ou morte foi registrado durante os 30 dias consecutivos de tratamento com todas as doses do EASA. O tratamento dos machos não promoveu alterações significativas no consumo de água durante todo o período comparado ao controle (figura 13). Houve reduções significativas no consumo de ração apenas na última semana de tratamento para as doses EASA de 500 e 1000 mg/kg em relação ao controle (figura 14), porém esse diminuição só foi refletida na massa corporal dos animais tratados com a maior dose do extrato, cujo ganho foi estatisticamente menor quando comparado ao controle nesse mesmo período (figura 15).

O tratamento das fêmeas não comprometeu os consumos de água e ração em relação ao controle durante todo o período (figuras 16 e 17, respectivamente). Mesmo assim, os animais tratados com o EASA 1000 mg/kg demonstraram uma diminuição no ganho de massa corporal ainda na fase inicial de tratamento (2ª semana), mantendo esse padrão de redução até o final quando comparado ao controle (figura 18).

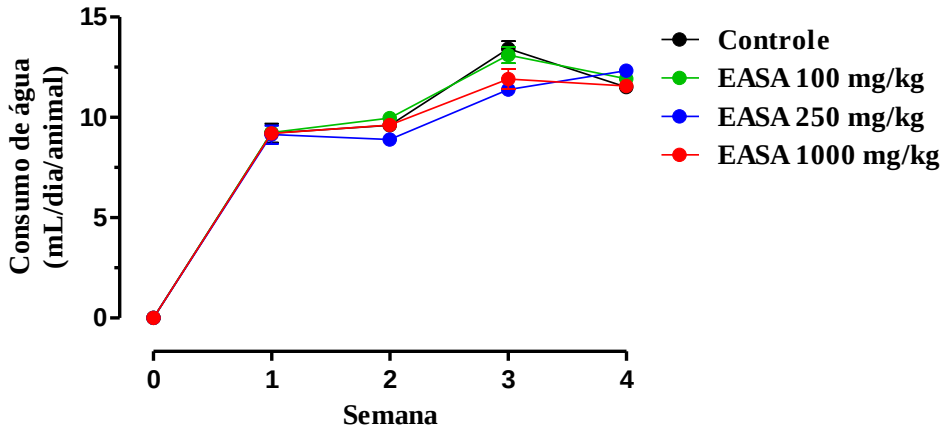

Figura 13: Consumo de água (mL/dia/animal) dos camundongos machos tratados com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 12/grupo).

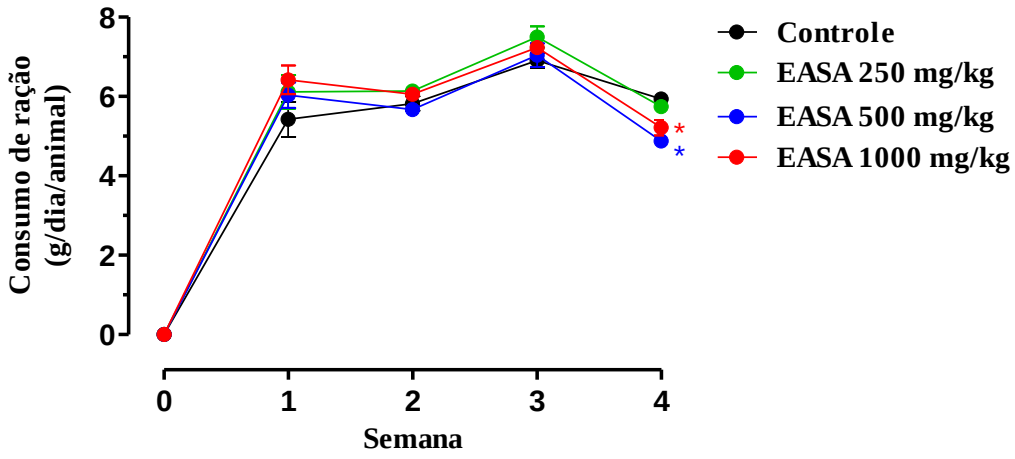

Figura 14: Consumo de ração (g/dia/animal) dos camundongos machos tratados com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 12/grupo). * Estatisticamente diferente do controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

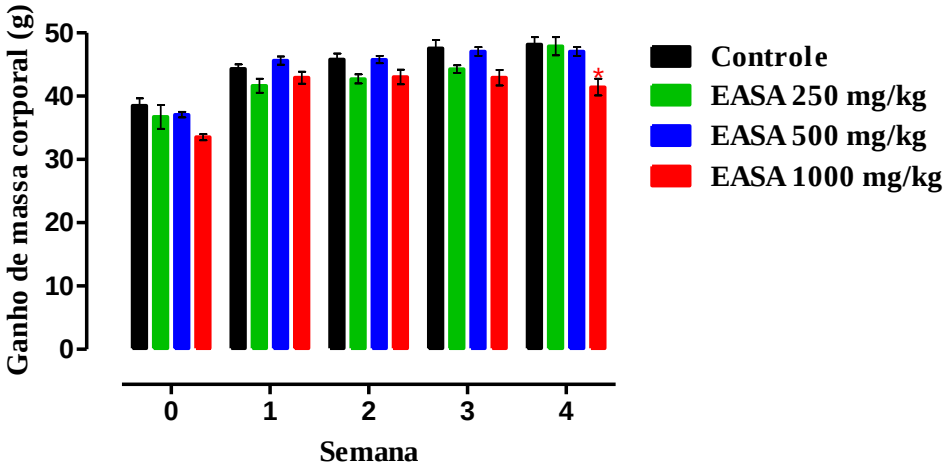

Figura 15: Ganho de massa corporal (g) dos camundongos machos tratados com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 12/grupo). * Estatisticamente diferente do controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

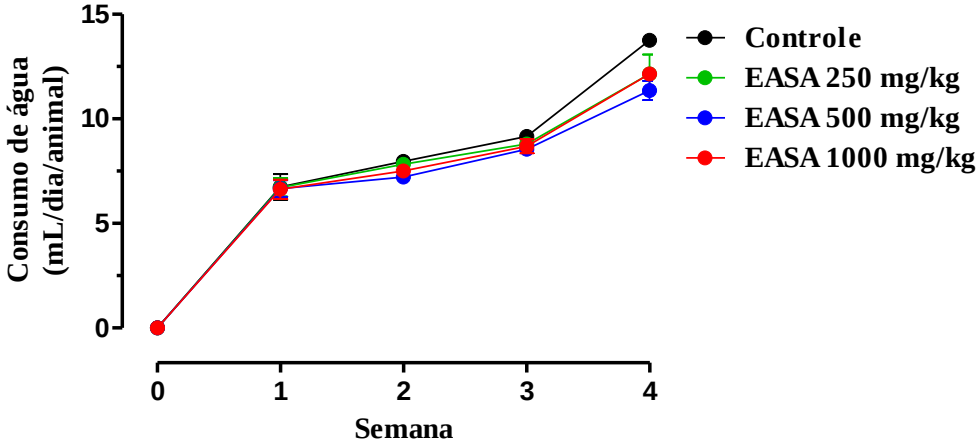

Figura 16: Consumo de água (mL/dia/animal) dos camundongos fêmeas tratadas com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 12/grupo).

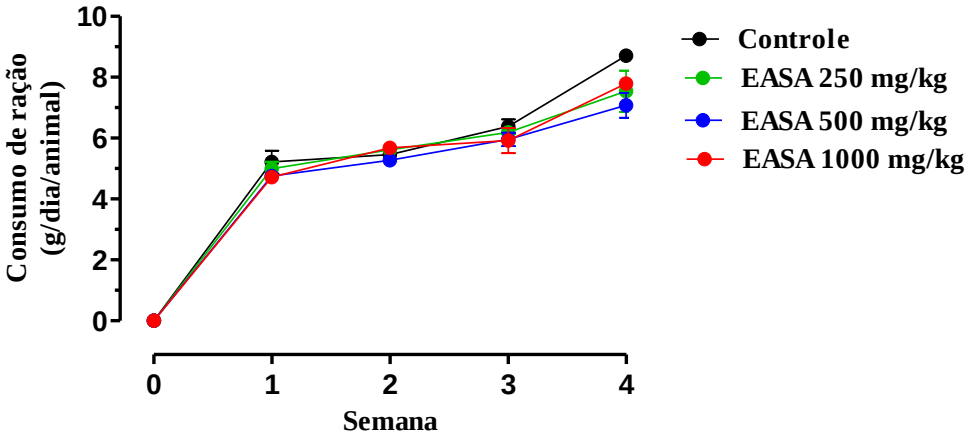

Figura 17: Consumo de ração (g/dia/animal) dos camundongos fêmeas tratadas com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 12/grupo).

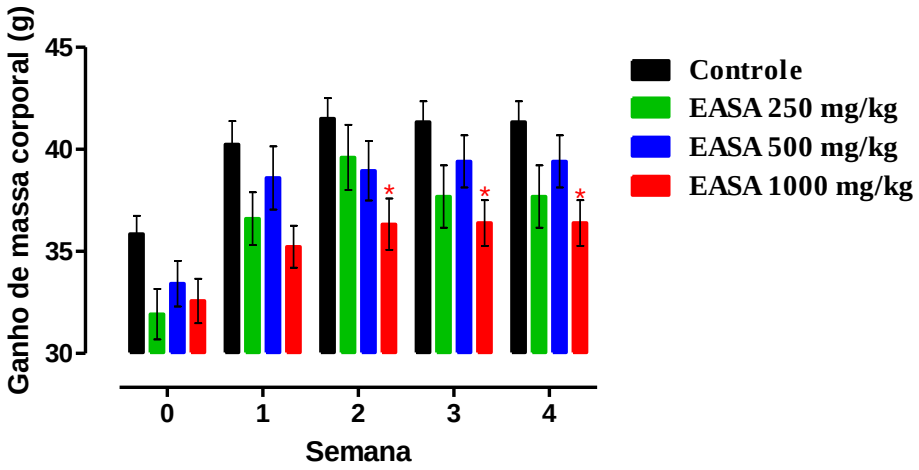

Figura 18: Ganho de massa corporal (g) dos camundongos fêmeas tratadas com o EASA (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) durante 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 12/grupo). * Estatisticamente diferente do controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5.5.2.1 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Não houve alterações significativas na maioria dos parâmetros hematológicos avaliados para ambos os sexos. Os machos e as fêmeas quando tratados com a maior dose do extrato apresentaram leucocitose (tabela 5) e aumento do RDW (tabela 6), respectivamente, quando comparados ao controle.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, o tratamento dos machos com todas as doses do EASA elevou significativamente os níveis séricos das proteínas totais e albumina comparados ao controle. Aumentos significativos também foram observados nos níveis de FA e BT nos animais tratados com as doses de 500 e 1000 mg/kg (tabela 7). Já as fêmeas tratadas com essas mesmas doses apresentaram hiperuricemia, além da hipertrigliceridemia verificada apenas nas tratadas com a dose de 1000 mg/kg do EASA (tabela 8).

5.5.2.2 Estudo morfológico

As massas absoluta e relativa dos órgãos dos machos e das fêmeas, tabelas 9 e 10 respectivamene, não foram alteradas pelo tratamento com nenhuma das doses do EASA quando comparadas às do controle. A análise macroscópica desses mesmos órgãos não apresentou mudanças significantes na cor ou textura quando comparados ao controle.

Entretanto, a análise histológica evidenciou discreto infiltrado linfocitário no coração dos machos tratados com a maior dose (figura 19) e discreta esteatose hepática nas fêmeas tratadas com as doses de 500 e 1000 mg/kg do EASA (figura 20). Para ambos os sexos tratados com a maior dose houve aumento do espaço da cápsula de Bowman (figura 21) e hipertrofia dos espongiócitos da adrenal (figura 22).

Tabela 5: Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre os parâmetros hematológicos de camundongos machos após os 30 dias de tratamento.

Parâmetros hematológicos	Controle	EASA 250 mg/kg	EASA 500 mg/kg	EASA 1000 mg/kg
Eritrócitos (10^6/mm^3)	9,32 ± 0,21	8,66 ± 0,47	9,87 ± 0,17	9,82 ± 0,26
Hemoglobina (g/dL)	15,39 ± 0,34	16,01 ± 0,62	16,23 ± 0,25	15,98 ± 0,47
Hematócrito (%)	44,65 ± 1,07	41,33 ± 1,96	47,75 ± 0,68	46,14 ± 1,13
VCM (µm^3)	47,67 ± 0,33	47,83 ± 1,22	48,33 ± 0,33	47,00 ± 0,32
HCM (pg)	16,50 ± 0,13	16,13 ± 0,36	16,43 ± 0,05	16,27 ± 0,09
CHCM (g/dL)	34,46 ± 0,15	33,69 ± 0,29	33,97 ± 0,21	34,63 ± 0,22
RDW (%)	17,68 ± 0,36	18,17 ± 0,76	16,25 ± 0,28	17,12 ± 0,23
Plaquetas (10^3/mm^3)	882,30 ± 32,65	913,30 ± 89,43	833,00 ± 39,05	787,40 ± 75,45
VMP (µm^3)	5,60 ± 0,07	5,43 ± 0,05	5,65 ± 0,08	5,74 ± 0,21
GB (10^3/mm^3)	5,83 ± 0,10	5,00 ± 0,78	7,95 ± 0,96	10,54 ± 1,16*
Neutrófilos (%)	7,68 ± 0,89	12,32 ± 1,89	9,98 ± 1,99	7,36 ± 1,20
Eosinófilos (%)	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,05	0,03 ± 0,02	0,06 ± 0,02
Basófilos (%)	0,22 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,18 ± 0,06
Linfócitos (%)	90,50 ± 1,25	85,53 ± 1,61	88,88 ± 2,07	91,54 ± 1,17
Monócitos (%)	1,58 ± 0,52	1,92 ± 0,55	0,98 ± 0,11	0,86 ± 0,02

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 12/grupo). VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: *red cell distribution width* – variação do tamanho das hemácias; GB: góbulos brancos; VMP: volume médio das plaquetas. *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela 6: Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre os parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas após os 30 dias de tratamento.

Parâmetros hematológicos	Controle	EASA 250 mg/kg	EASA 500 mg/kg	EASA 1000 mg/kg
Eritrócitos (10^6/mm^3)	10,51 ± 0,86	8,66 ± 0.47	11,70 ± 1,61	11,00 ± 0,98
Hemoglobina (g/dL)	16,77 ± 0,91	16,58 ± 0,14	18,46 ± 2,20	18,64 ± 1,65
Hematócrito (%)	44,65 ± 1,07	41,33 ± 1,96	47,75 ± 0,68	46,14 ± 1,13
VCM (µm^3)	46,67 ± 0,33	47,80 ± 0,37	47,20 ± 0,49	47,50 ± 0,22
HCM (pg)	16,45 ± 0,21	16,55 ± 0,47	16,05 ± 0,58	16,93 ± 0,10
CHCM (g/dL)	34,56 ± 0,79	35,65 ± 0,16	34,00 ± 1,05	35,61 ± 0,20
RDW (%)	14,67 ± 0,16	14,54 ± 0,32	15,20 ± 0,39	16,38 ± 0,23*
Plaquetas (10^3/mm^3)	780,20 ± 43,59	754,40 ± 15,89	882,20 ± 104,40	781,30 ± 31,15
VMP (µm^3)	6,10 ± 0,10	6,04 ± 0,10	6,30 ± 0,24	6,25 ± 0,21
GB (10^3/mm^3)	9867 ± 1636	12020 ± 1201	9920 ± 1941	12067 ± 1599
Neutrófilos (%)	4,90 ± 0,72	3,96 ± 1,04	5,66 ± 1,04	3,53 ± 0,98
Eosinófilos (%)	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Basófilos (%)	0,20 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02
Linfócitos (%)	93,98 ± 0,92	95,10 ± 1,25	93,40 ± 1,71	95,50 ± 1,21
Monócitos (%)	0,88 ± 0,36	0,78 ± 0,25	0,80 ± 0,33	0,82 ± 0,27

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 12/grupo). VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: *red cell distribution width* – variação do tamanho das hemácias; GB: globules brancos; VMP: volume médio das plaquetas. *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela 7: Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos machos após os 30 dias de tratamento.

Parâmetros bioquímicos	Controle	EASA 250 mg/kg	EASA 500 mg/kg	EASA 1000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	121,20 ± 10,71	142,00 ± 14,02	144,00 ± 17,22	146,20 ± 14,79
Uréia (mg/dL)	34,42 ± 3,36	44,45 ± 1,59	27,58 ± 2,92	42,54 ± 2,64
Creatinina (mg/dL)	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Ácido úrico (mg/dL)	1,83 ± 0,17	2,16 ± 0,12	2,15 ± 0,18	2,12 ± 0,05
AST (U/L)	116,70 ± 10,05	89,20 ± 12,74	116,80 ± 20,84	215,20 ± 54,31
ALT (U/L)	55,50 ± 2,77	51,20 ± 3,27	50,50 ± 2,66	72,17 ± 10,64
FA (U/L)	68,83 ± 6,07	90,80 ± 9,53	127,70 ± 28,43*	114,70 ± 9,20*
BT (mg/dL)	0,25 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,45 ± 0,03*	0,42 ± 0,02*
BD (mg/dL)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
BI (mg/dL)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
LDH (U/L)	1142,00 ± 147,20	870,80 ± 112,20	1067,00 ± 174,70	1228,00 ± 212,90
Colesterol total (mg/dL)	102,70 ± 6,07	94,20 ± 3,07	96,25 ± 3,75	106,20 ± 2,70
Triglicerídeos (mg/dL)	115,00 ± 10,01	138,80 ± 14,97	110,80 ± 10,76	101,60 ± 7,05
Proteínas totais (g/dL)	4,25 ± 0,16	4,84 ± 0,08*	4,97 ± 0,22*	5,54 ± 0,13*
Albumina (g/dL)	1,85 ± 0,09	2,12 ± 0,09*	2,37 ± 0,12*	2,66 ± 0,07*

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 12/grupo). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; GGT, gama-glutamiltranspeptidase; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: lactato desidrogenase. *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela 8: Efeitos do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas após os 30 dias de tratamento.

Parâmetros bioquímicos	Controle	EASA 250 mg/kg	EASA 500 mg/kg	EASA 1000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	168,50 ± 6,89	157,70 ± 4,17	146,80 ± 11,59	144,70 ± 13,47
Uréia (mg/dL)	45,13 ± 1,81	40,92 ± 1,90	40,68 ± 0,66	40,32 ± 4,72
Creatinina (mg/dL)	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,00
Ácido úrico (mg/dL)	0,82 ± 0,14	1,05 ± 0,14	1,30 ± 0,11*	1,57 ± 0,08*
AST (U/L)	97,00 ± 7,21	94,67 ± 16,22	184,80 ± 60,58	70,20 ± 5,46
ALT (U/L)	48,67 ± 0,66	48,67 ± 7,86	58,60 ± 6,29	45,50 ± 2,32
FA (U/L)	127,70 ± 6,88	155,00 ± 11,85	133,30 ± 13,69	113,40 ± 2,62
BT (mg/dL)	0,25 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,32 ± 0,05	0,44 ± 0,02
BD (mg/dL)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
BI (mg/dL)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
LDH (U/L)	854,00 ± 89,64	974,00 ± 149,30	1401,00 ± 339,40	643,00 ± 30,01
Colesterol total (mg/dL)	83,00 ± 4,55	79,50 ± 11,50	101,00 ± 9,00	75,50 ± 5,04
Triglicerídeos (mg/dL)	103,80 ± 13,54	163,00 ± 3,00	110,00 ± 10,00	181,50 ± 13,88*
Proteínas totais (g/dL)	5,66 ± 0,09	5,76 ± 0,08	5,46 ± 0,07	5,33 ± 0,13
Albumina (g/dL)	2,90 ± 0,06	2,87 ± 0,06	2,70 ± 0,07	2,85 ± 0,08

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 12/grupo). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: lactato desidrogenase. *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela 9: Efeito do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre as massas dos órgãos de camundongos machos após os 30 dias de tratamento.

Órgãos	Controle	EASA 250 mg/kg	EASA 500 mg/kg	EASA 1000 mg/kg
Coração (g)	0,21 ± 0,006	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,02
(g/100 g)	0,08 ± 0,004	0,04 ± 0,009	0,10 ± 0,008	0,07 ± 0,004
Pulmão (g)	0,22 ± 0,006	0,24 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,23 ± 0,02
(g/100g)	0,09 ± 0,006	0,05 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Fígado (g)	1,88 ± 0,06	1,74 ± 0,07	1,79 ± 0,08	1,70 ± 0,08
(g/100 g)	0,77 ± 0,06	0,59 ± 0,06	0,79 ± 0,06	0,75 ± 0,06
Estômago (g)	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,02
(g/100 g)	0,10 ± 0,008	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Rins (g)	0,49 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,48 ± 0,03
(g/100 g)	0,19 ± 0,005	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Adrenais (g)	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,002	0,022 ± 0,007	0,005 ± 0,001
(g/100 g)	0,0020 ± 0,0003	0,0016 ± 0,0005	0,0104 ± 0,0025	0,0025 ± 0,0003
Baço (g)	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,02
(g/100 g)	0,058 ± 0,007	0,057 ± 0,009	0,056 ± 0,005	0,047 ± 0,007
Testículo (g)	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,02
(g/100 g)	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Epidídimo (g)	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,02
(g/100 g)	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Vesícula seminal (g)	0,23 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,24 ± 0,06
(g/100 g)	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,03

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 12/grupo).

Tabela 10: Efeito do EASA (250, 500 e 1000 mg/kg) sobre as massas dos órgãos de camundongos fêmeas após os 30 dias de tratamento.

Órgãos	Controle	EASA 250 mg/kg	EASA 500 mg/kg	EASA 1000 mg/kg
Coração (g)	0,17 ± 0,005	0,16 ± 0,008	0,17 ± 0,004	0,16 ± 0,006
(g/100 g)	0,08 ± 0,005	0,06 ± 0,005	0,06 ± 0,005	0,06 ± 0,005
Pulmão (g)	0,23 ± 0,009	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,007
(g/100g)	0,10 ± 0,006	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,008	0,07 ± 0,004
Fígado (g)	1,76 ± 0,05	1,44 ± 0,11	1,58 ± 0,07	1,59 ± 0,08
(g/100 g)	0,81 ± 0,04	0,60 ± 0,06	0,62 ± 0,05	0,62 ± 0,05
Estômago (g)	0,32 ± 0,008	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,007	0,31 ± 0,01
(g/100 g)	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,007	0,17 ± 0,006
Rins (g)	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,40 ± 0,009	0,39 ± 0,01
(g/100 g)	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,008
Adrenais (g)	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,003
(g/100 g)	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,002
Baço (g)	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,01
(g/100 g)	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Útero (g)	0,17 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,02
(g/100 g)	0,07 ± 0,007	0,06 ± 0,005	0,07 ± 0,006	0,07 ± 0,008
Ovários (g)	0,06 ± 0,007	0,04 ± 0,005	0,06 ± 0,009	0,06 ± 0,004
(g/100 g)	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,03 ± 0,006	0,02 ± 0,002

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 12/grupo).

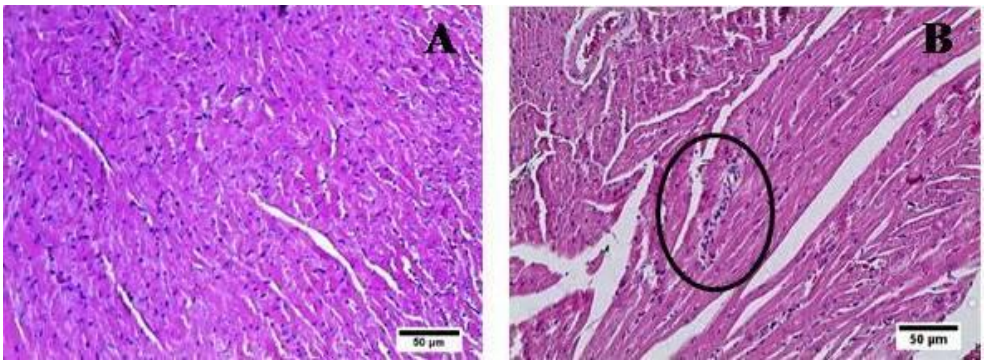

Figura 19: Cortes histológicos (HE) do coração de camundongos machos tratados com o EASA durante 30 dias consecutivos. **A –** controle; **B -** animais tratados com o EASA 1000 mg/kg. O círculo indica o discreto infiltrado inflamatório.

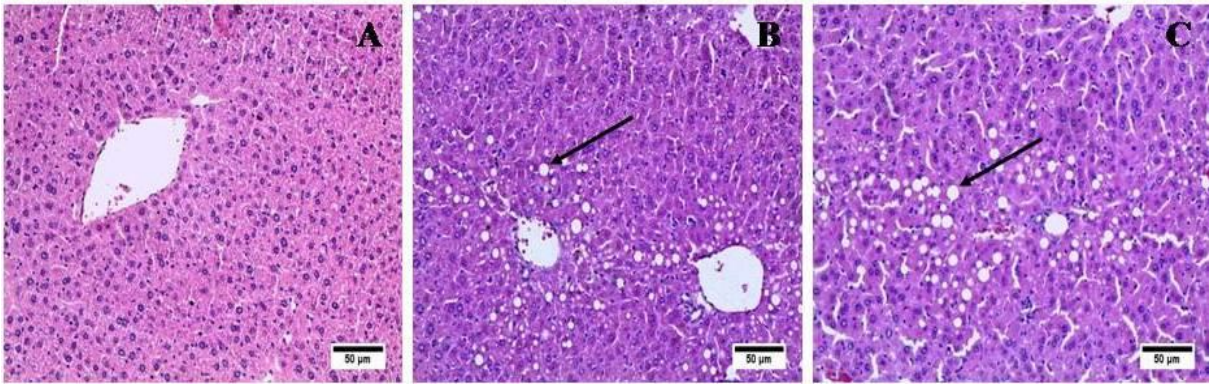

Figura 20: Cortes histológicos (HE) do fígado de camundongos fêmeas tratadas com o EASA durante 30 dias consecutivos. **A –** controle; **B -** animais tratados com o EASA 500 mg/kg; **C -** animais tratados com o EASA 1000 mg/kg. As setas indicam discreta esteatose.

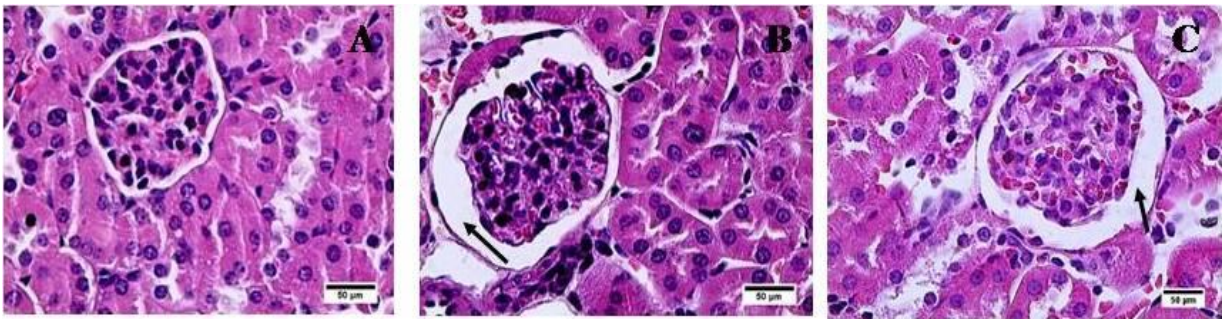

Figura 21: Cortes histológicos (HE) da cápsula de Bowman dos rins de camundongos tratados com o EASA durante 30 dias consecutivos. **A –** controle; **B -** machos tratados com o EASA 1000 mg/kg; **C -** fêmeas tratadas com o EASA 1000 mg/kg. As setas indicam aumento do espaço capsular.

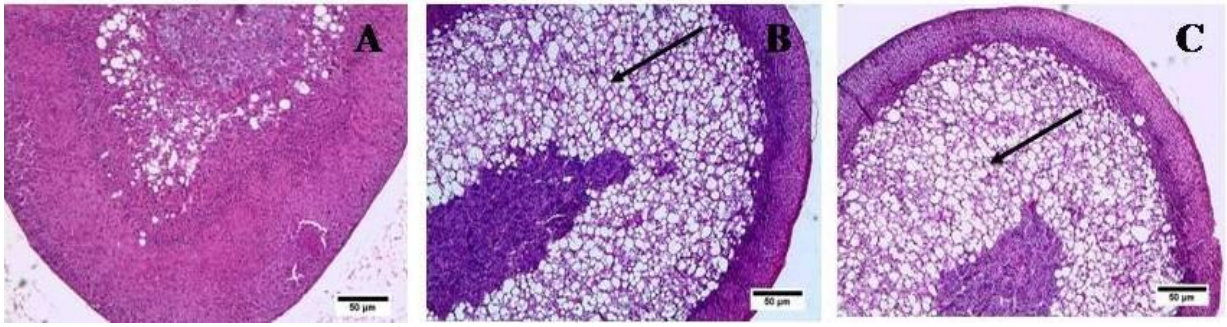

Figura 22: Cortes histológicos (HE) da glândula adrenal de camundongos tratados com o EASA durante 30 dias consecutivos. **A –** controle; **B -** machos tratados com o EASA 1000 mg/kg; **C -** fêmeas tratadas com o EASA 1000 mg/kg. As setas indicam hipertrofia dos espongiócitos.

DISCUSSÃO

6. Discussão

A decocção da casca do caule de *Simarouba amara* tem sido popularmente usada na medicina tradicional de muitos países ao longo dos anos. No entanto, praticamente não há registros científicos de estudos que respaldem as propriedades etnomedicinais já descritas para *Simarouba amara* como também de pesquisas que investiguem novas ações farmacológicas para essa espécie.

As informações relativas à composição fitoquímica da casca do caule de *Simarouba amara* remetem-se às presenças de alcalóides, triterpenos e quassinóides (POLONSKY, 1978; GROSVENOR et al., 2006), além de taninos (COIMBRA, 1994). No entanto, dentre os metabólitos já identificados na espécie, apenas os taninos e traços de quassinóides foram verificados por CCD na amostra em estudo. A presença de traços de quassinóides poderia ser esperada, uma vez que a sua freqüência em *S. amara* é a menor encontrada dentre as espécies da família (ALMEIDA et al., 2007).

Os dados obtidoss pela CCD permitiram selecionar os padrões que seriam utilizados na CLAE. Assim, foram identificados e quantificados na solução extrativa de *S. amara* picos condizentes com o ácido clorogênico (um fenilpropanóide derivado do ácido caféico), taninos condensados (catequina e epicatequina) e hidrolisáveis (ácidos gálico e elágico). Sendo as catequinas os constituintes majoritários quantificados na solução extrativa. Os taninos consistem num grupo de compostos polifenólicos largamente distribuídos nas plantas (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1989).

Estudos prévios têm atribuído às diferentes classes de taninos diversas propriedades farmacológicas como anti-inflamatória (PAN et al., 2000), antioxidante (CHEN et al., 2004), antibacteriana (KAMIJO et al., 2008), antitumoral (OKUDA et al., 2009) e antidiabética (VASCONCELOS et al., 2011). Assim, a ação desses metabólitos provavelmente está relacionada com as atividades farmacológicas observadas nesse estudo.

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo animal bem estabelecido para avaliar a ação anti-inflamatória de produtos naturais e sintéticos (MAITY et al., 1998). A resposta inflamatória produzida pela carragenina é bifásica. A primeira fase (0 - 2,5h), caracterizada pelo edema não-fagocítico, está associada à ação de mediadores como serotonina, cininas (TNF, IL-1β, IL-2 and INFγ) e principalmente histamina (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2007). A histamina é responsável pela dor local, ativação do sistema complemento e das células endoteliais, recrutamento de leucócitos e formação do edema no local da inflamação (PAULA et al., 2006). Já a segunda fase (2,5 - 4h) está relacionada às

presenças de prostaglandinas, cicloxigenase e migração leucocitária para a área inflamada (PANTHONG et al., 2007).

No modelo experimental induzido por carragenina, a fase incial da inflamação foi inibida pelo tratamento com todas as doses do EASA, o que sugere um provável efeito do extrato sobre os primeiros mediadores inflamatórios liberados por esse composto. Resultado similar do padrão de inibição foi obtido quando se utilizou a histamina (um dos primeiros mediadores inflamatórios liberados) como agente álgico, particularmente na primeira hora de edema. Kim et al. (2006) já demonstraram que o ácido gálico foi capaz de bloquear a liberação de histamina dos mastócitos nas reações alérgicas inflamatórias e inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e Yamada et al. (2012) verificaram que os taninos hidrolisáveis de *Carpinus Tschonoskii* preveniram reações alérgicas tipo I ao impedir a liberação de histamina por bloquear a ligação da IgE ao seu receptor nas células dos mastócitos. Dados do nosso grupo mostraram que espécies contendo taninos como compostos majoritários possui provável atividade antagonista sobre o receptor de histamina H_1, o que de certa forma se correlaciona com os dados obtidos nesse estudo. Porém, estudos posteriores devem ser conduzidos para tal comprovação.

O EASA também foi efetivo frente aos diferentes modelos de úlcera aplicados. O tratamento foi capaz de prevenir o dano na mucosa gástrica induzido pelo etanol 70% e indometacina assim como auxiliou o processo de cicatrização na úlcera crônica. Agentes necróticos como o etanol lesionam a mucosa gástrica por meio de mecanismos que envolvem estase sanguínea, formação de radicais livres, peroxidação lipídica, inibição da síntese de PG com conseqüente diminuição na produção de muco (ABDEL-SALAM et al., 2001; ANDREO et al., 2006).

Khennouf et al. (2003) analisaram os efeitos gastroprotetores dos extrato acetônico de *Quercus suber* e *Quercus coccifera* e dos taninos purificados oriundos dos mesmos sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos e coelhos. Verificaram que tanto os extratos quanto os taninos purificados inibiram a secreção gástrica e a formação de lesões estomacais assim como reduziu significativamente a peroxidação lipídica em homogenato de cérebro de coelhos. Murakami et al. (1991) já comprovaram que o ácido elágico é um potente inibidor competitivo da bomba H^+-K^+-ATPase e age ao competir com o ATP pelo seu local de hidrólise e, assim, inibir significativamente a secreção de HCl.

Já a supressão da síntese de prostaglandinas induzida pela indometacina aumentou a susceptibilidade de lesões na mucosa gástrica dos animais do controle. O EASA reduziu o dano na mucosa em todas as doses testadas em relação ao referido grupo, sugerindo um

possível envolvimento das prostaglandinas na resposta gastroprotetora. Além dessa suposição, Mitjavila et al. (1977) verificaram que baixas doses de ácido tânico adicionadas à dieta de ratos também eram capazes de aumentar o volume do muco gástrico.

O modelo de úlcera crônica induzido por ácido acético é semelhante à úlcera gástrica humana não só pelas características patogênicas, mas também pelos mecanismos cicatrizantes e o tempo requerido para a cicatrização (OKABE; AMAGASE, 2005). O tratamento com o EASA 500 mg/kg foi capaz de promover a reepitelização e restabelecer a camada glandular que havia sido destruída com a administração do agente ulcerogênico. De acordo com Vasconcelos et al. (2008), os taninos precipitam microproteínas no local da úlcera péptica formando uma película protetora que impede a absorção de substâncias tóxicas e promove resistência à ação de enzimas proteolíticas, fazendo com que a cicatrização ocorra naturalmente.

Além desse mecanismo facilitador do processo curativo, os experimentos demonstraram que a cicatrização da úlcera também foi auxiliada pelo aumento da proliferação das células estomacais nos animais tratados com o EASA, confirmada pela intensa imunorreatividade ao PCNA quando comparado ao controle. O PCNA é uma proteína auxiliar das polimerases *delta* e *ipsilon* envolvidas na replicação e reparo do DNA. Ele é utilizado como um indicador de proliferação celular (ALVES; BACCHI; VASSALO, 1999), pois é expressa na fase G_1 tardia e durante a fase S do ciclo celular (ARISAWA et al., 1999). A diminuição significativa nos níveis de LDH nos animais tratados com o EASA também foi sugestiva de reparo tecidual, uma vez que níveis séricos elevados dessa enzima são observados em casos de lesão e morte celular (MOTTA, 2009).

Outras informações fornecidas por esse modelo experimental foram relativas a alguns indicadores de efeitos tóxicos registrados durante as duas semanas consecutivas de tratamento, como o ganho de massa corporal e os consumos de água e ração. Os resultados demonstraram que o tratamento com o EASA não promoveu redução desses parâmetros quando comparados ao controle.

A última atividade farmacológica investigada foi a hepatoprotetora. A toxicidade hepática induzida pelo CCl_4 consiste num método experimental muito utilizado para se estudar o efeito hepatoprotetor de produtos naturais e de drogas (RECKNAGEL et al., 1989).

O primeiro passo no metabolismo de CCl_4 é a redução de um elétron, catalisada pelo citocromo P_{450}, produzindo o radical livre triclorometil ($\bullet CCl_3$), altamente reativo (HANZLIK, 1981). Na presença de oxigênio molecular, a maior parte dos radicais $\bullet CCl_3$ gerados reage para formar o radical livre peroxi-triclorometil ($\bullet OOCCl_3$) (SLATER, 1982).

Ambos os radicais são capazes de formar ligações covalentes com proteínas ou lipídeos, levando a peroxidação lipídica da membrana e, finalmente, morte celular (BRATTIN; GLENDE; RECKNAGEL, 1985; RECKNAGEL et al., 1989).

Peróxidos, hidroperóxidos e produtos de degradação de lipídeos gerados nesse processo também constituem agentes oxidantes ativos. Consequentemente, as estruturas da membrana celular e as estruturas de membrana das organelas intracelulares são completamente quebradas e danos estruturais são propagados (CENGIZ et al., 2013). Postula-se que a peroxidação lipídica aumentada esteja associada à iniciação do estresse oxidativo que ocasiona várias lesões teciduais e morte celular, contribuindo para a progressão de muitas doenças agudas e crônicas (HALLIWELL, 1997; BRATTIN; GLENDE; RECKNAGEL, 1985).

A peroxidação lipídica gera uma variedade de produtos tóxicos mais ou menos estáveis. Muitos desses compostos são aldeídos. Eles poderiam, em teoria, migrar dos locais de peroxidação lipídica na membrana, próximo ao citocromo P_{450}, e causar alterações patológicas em outras partes da célula (BRATTIN; GLENDE; RECKNAGEL, 1985). Uma abordagem para a detecção de lesões hepáticas envolve a medição dos peróxidos lipídicos, tais como o malondialdeído (MDA) (KHAN; AHMED, 2009). O MDA é um dos principais aldeídos reativos que aparece durante a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados da membrana biológica. Níveis elevados de MDA no fígado sugere aumento da peroxidação com consequente dano tecidual e ocasiona insuficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes, o que evitaria a formação excessiva de radicais livres (NAIK; PANDA, 2007).

A administração do CCl_4 gerou estresse oxidativo no fígado dos animais do controle, constatado por meio dos níveis aumentados de MDA. No entanto, o pré-tratamento com todas as doses do EASA impediu essa elevação. Esses dados estão de acordo com os estudos de Hsu et al. (2008) e Cengiz et al. (2013), que demonstraram que o tratamento com óleo de gergelim ou com o extrato de *Dunaliella salina* também reverteram o estresse oxidativo hepático induzido pelo CCl_4.

O sistema antioxidante é crítico para a desintoxicação de radicais livres. A superóxido dismutase (SOD) reduz a concentração de radicais superóxido altamente reativos ($\bullet\ O_2^-$) convertendo-os a H_2O_2, enquanto a catalase (CAT) decompõe o H_2O_2 e protege os tecidos dos radicais hidroxila ($\bullet$ OH) extremamente reativos. Essas enzimas antioxidantes são facilmente inativadas pelo peróxidos lipídicos ou espécies reativas de oxigênio, o que resulta na diminuição da sua atividade na toxicidade induzida pelo CCl_4 (YANG et al., 2008 ; HSU et al., 2008).

O fato de não ter havido uma diminuição nas atividades das enzimas SOD e CAT, induzida pelo CCl_4 nos animais do controle, deveu-se provavelmente a um mecanismo de adaptação do organismo frente ao estresse (LIMA et al., 2012). Entretanto, o pré-tratamento com EASA nas doses de 250 e 500 mg/kg foi capaz de aumentar os níveis de catalase, o que poderia contribuir para a prevenção do dano oxidativo induzido pelo CCl_4.

A estimativa das enzimas séricas, tais como aspartato e alanina aminotransferases e lactato desidrogenase, é útil para verificar a extensão e o tipo de dano hepatocelular. Aumentos nos níveis séricos dessas enzimas estão relacionados aos danos na integridade estrutural do fígado, uma vez que elas são liberadas na circulação após destruição autolítica ou necrose celular dos hepatócitos (KHAN; AHMED, 2009). A desintegração da membrana dos hepatócitos com posterior liberação AST, ALT e LDH, entre outras, é uma das conseqüências da peroxidação lipídica induzida pelo CCl_4 (SINGH et al., 2008). Na presente investigação , a administração de CCl_4 em ratos resultou em elevação acentuada dos níveis séricos de ALT, AST, LDH e bilirrubina corroborando com os estudos de Asha et al. (2007), Hsu et al. (2008) e Cengiz et al. (2013). O pré-tratamento com o EASA preveniu o aumento dos níveis dessas enzimas, indicando que o mesmo protege o hepatócito ao evitar a perda da sua integridade funcional.

Tem sido mostrado que a injúria hepática induzida pelo CCl_4 é significativamente reduzida pelo tratamento com taninos, provavelmente devido ao seu efeito antioxidante (OKUDA, 2005). As propriedades antioxidantes e de captação de radicais livres são as ações biológicas mais reconhecidas das catequinas (SUTHERLAND et al., 2005), metabólito majoritário presente na solução extrativa de *S. amara.* Nossa hipótese, no entanto, é que as catequinas presentes no EASA seriam as responsáveis pela atividade antioxidante verificada e, conseqüentemente, pela hepatoproteção resultante.

Além disso, o tratamento com EASA estimulou a proliferação dos hepatócitos, como verificado através da intensa imunorreatividade ao PCNA. Essa análise revelou um grande número de células em proliferação nos fígados dos animais tratados com EASA quando comparado ao grupo controle. Majumdar e Moudgal (1994) verificaram que o ácido tânico preveniu danos ao DNA das células hepáticas e renais de galinhas adultas por meio de um mecanismo antioxidante. Desse modo, além de prevenir, o EASA poderia reverter uma injúria estabelecida no fígado por intermédio da estimulação da proliferação celular.

Esse estudo ainda realizou ensaios de segurança de uso (toxicidade aguda e de doses repetidas) com o EASA. A toxicidade aguda refere-se àqueles efeitos adversos que ocorrem logo após a adminsitração oral de dose única de uma substância ou múltiplas doses dadas

dentro de um período de 24 h (OECD, 2001). Os resultados da toxicidade aguda mostraram que a dose de 2000 mg/kg não produziu sinais de toxicidade ou morte dos animais, sugerindo uma DL_{50} maior que a referida dose pela via oral. Ainda de acordo com a OECD (2001), substâncias que apresentam valores de DL_{50} maiores que a referida dose, pela via oral, podem ser consideradas praticamente não-tóxicas. Do mesmo modo, os ensaios de toxicidade de doses repetidas com o EASA durante os 30 dias consecutivos não ocasionaram morte ou sinais clínicos de toxicidade.

Apesar de não ter havido diminuição no consumo de ração nas fêmeas durante os 30 dias de tratamento e, nos machos, esse fato ter ocorrido apenas na última semana para as doses de 500 e 1000 mg/kg, ambos os sexos tratados com a maior dose apresentaram diminuição significativa no ganho de massa corporal. McRae and Kennedy (2011) já demonstraram que os tannnos interagem com as proteínas salivares e com àquelas associadas à mucosa produzindo adstringência que é refletida na diminuição do consumo de alimentos e da digestibilidade dos mesmos. Entretanto, estudos indicam que os maiores efeitos dos taninos não estão relacionados à inibição do consumo, mas à eficiência diminuída na conversão dos nutrientes digeridos (AKANDE et al., 2010).

Porém, vale ressaltar que os machos tratados com todas as doses do EASA apresentaram proteinemia e albuminemia. Apesar da porcentagem de absorção a partir do intestino está reduzida nos animais tratados com a maior dose, Waghorn (1990) verificou que os taninos condensados presentes em baixas concentrações na forragem ingerida por ovelhas foi capaz de melhorar o valor nutritivo da planta ao ligar-se às suas proteínas e protegê-las da degradação excessiva no rúmen, aumentando em 20-50% a quantidade de aminoácidos essenciais absorvidos quando comparado à ingestão de forragem sem taninos condensados.

Em contraste a isso, ainda de acordo Waghorn (1990), altas concentrações de taninos adminstradas por longos períodos pode produzir alterações histológicas na mucosa intestinal do gado incluindo anormalidades na estrutura das vilosidades e ruptura da rede de comunicação intestinal.

O exato mecanismo pelo qual os constituintes de *S. amara* poderiam danificar órgãos vitais do corpo não pode ser derivada da presente investigação, mas o prejuízo para determinados órgãos e tecidos possivelmente poderá ser refletido com a análise das enzimas séricas. Os níveis aumentados de FA e BT nos machos tratados com as doses de 500 e 1000 mg/kg do EASA refletem, provavelmente, um comprometimento do fluxo biliar para o intestino, uma vez que estudos em ratos demonstraram a excreção biliar de algumas catequinas do chá verde como epigalocatequina-galato, epigalocatequina e epicatequina

(CLIFFORD, VAN DER HOOFT; CROZIER, 2013). Apesar da FA pertencer a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas, ela também está localizada nas membranas de revestimento dos canalículos biliares e pode ser regurgitada para a circulação quando há impedimento da excreção de bilirrubina, com consequente hiperbilirrubinemia (MOTTA, 2009).

Apesar dos níveis de RDW estarem elevados nas fêmeas tratadas com a maior dose do EASA em relação ao controle, os valores estavam dentro dos limites de referência para a espécie de acordo com Restel (2012).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, as fêmeas tratadas com as doses de 500 e 1000 mg/kg apresentaram hiperuricemia e as tratadas apenas com a maior dose hipertrigliceridemia. Esse fato poderia estar relacionado com uma questão hormonal, uma vez que os machos não exibiram alterações nesses parâmetros. Entretanto essa é apenas uma suposição que requer novos estudos.

No entanto, de acordo com Yahyaoui, Esteva e Haro-Mora (2008), o estrógeno é uricosúrico o que diminuiria os níveis séricos de ácido úrico e uma diminuição nos níveis deste hormônio poderia justificar a hiperuricemia. Apesar de não ter sido quantificado, os níveis de estrógeno poderiam ser considerados dentro da normalidade, incialmente, uma vez que o aumento na síntese de triglicerídeos faz parte das funções fisiológicas do hormônio (CHEN et al., 2009).

Os nossos achados ainda contrariam os resultados encontrados por Ho et al. (2012) cuja atividade da xantina-oxidase, enzima responsável pela conversão da hipoxantina à xantina e dessa à ácido úrico, foi inbida levando à hipouricemia em camundongos machos tratados com a fração acetato de etila do extrato de *Balanophora laxiflora* assim como pelos taninos hidrolisáveis derivados da mesma. Assim, a explicação para a hiperuricemia apresentada em nossos resultados requer maior investigação em estudos posteriores.

A hipertrigliceridemia apresentada por essas fêmeas, além da influência hormonal como mencionado, também poderia ser resultado da maior incorporação intestinal de lipídeos pelos quilomícrons que ocorreria em função do tratamento. Arhelger, Brom e Boler (1965) verificaram maior captação hepática de quilomícrons em coelhos tratados com dose única de uma solução de ácido tânico a 40%. A hipertrigliceridemia, no entanto, poderia estar relacionada à discreta esteatose hepática apresentada por esses animais não como decorrência de carência protéica que reduziria a formação de lipoproteínas no fígado e a excreção de triglicerídeos, mas devido a uma ingestão calórica deficiente, com conseqüente mobilização

de lipídeos do tecido adiposo, aumentando o aporte de ácidos graxos para o fígado (BOGLIOLO, 2013).

Apesar de não ter havido uma ingestão calórica deficiente nas fêmeas tratadas com a maior dose comparadas ao controle, pois não houve diferença significante no consumo de ração entre os grupos experimentais, a diminuição no ganho de massa corporal das mesmas desde a 2ª semana de tratamento, já reflete uma privação calórica, provavelmente por algum um comprometimento na absorção de nutrientes.

O discreto infiltrado linfocitário apresentado no coração dos machos tratados com as doses de 500 e 1000 mg/kg do EASA poderia ser resultante dos efeitos dos taninos. Melo et al. (2008) verificaram que o tratamento de camundongos Swiss fêmeas com frações enriquecidas com taninos a partir do extrato aquoso de *Mascagnia rigida* Griseb. causaram alterações no perfil enzimático-muscular do coração com aumentos significativos da enzima miocárdica CK-MB (creatinoquinase fração MB), que é liberada pelo tecido miocárdico lesado. Esse processo de lesão e inflamação poderia estar relacionada com a leucocitose apresentada por esses animais.

Entretanto, os efeitos renais do tratamento foram os mais pronunciados, uma vez que ocorreram de forma semelhante em ambos os sexos. O aumento do espaço da cápsula de Bowman verificado nos machos e fêmeas tratados com a maior dose pode ser consequência do efeito diurético dos taninos. Estudos experimentais têm mostrado que os taninos são dotados de ações diuréticas e vasodilatadoras (HERRERA et al., 2008), fatores que contribuem para uma excreção urinária aumentada (PANTOJA et al., 1993). A excreção urinária aumentada poderia ser resultado de um aumento da pressão de filtração total nos glomérulos, o que forçaria um grande volume de fluido para o espaço capsular (TORTORA; DERRICKSON, 2010), o que possivelmente explicaria o aumento observado.

A hipertrofia dos espongiócitos, células localizadas na zona fasciculada das glândulas adrenais, foi verificada em machos e fêmeas tratados com a maior dose e poderia estar relacionada aos taninos. Tem sido mostrado que a deficiência de Na^+ é exacerbada pela presença de taninos na dieta de herbívoros (FREELAND; CALCOTT; GEISS et al., 1985). Hastins et al. (1991) mostraram que a inclusão de ácido tânico na dieta de camundongos dosméticos machos (*Mus dosmesticus*) aumentou os sintomas de estresse pela diminuição do Na^+ tais como a morfologia alterada da glândula adrenal. Brient-Johnson and Christian (1998) demonstraram que o tamanho da zona fascicular e reticular da adrenal foram significativamente maiores em ratazanas alimentadas com dietas contendo 1,5% de ácido tânico.

Desse modo, os ensaios de toxicidade de doses repetidas produziram algumas alterações histológicas principalmente nos animais tratados com dose de 1000 mg/kg do EASA. Entretanto, essa maior dose empregada corresponde a cinco vezes a quantidade de extrato bruto utilizada na medicina tradicional (TAYLOR, 2005), quando calculado a partir do seu rendimento. Assim, estudos posteriores em animais de maior porte como rato, coelho ou cão deverão ser conduzidos a fim de elucidar como o tratamento ao longo prazo comprometeria esses órgãos-alvo.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

O conjunto dos resultados sugere que o extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* possui ações anti-inflamatória, gastro e hepatoprotetora, inicialmente atribuída a presença de taninos e é seguro por via oral.

- Os taninos foram os principais metabólitos presentes na casca do caule de *Simarouba amara*, sendo as catequinas os constituintes majoritários quantificados na solução extrativa da mesma. Atribuindo-se, principalmente aos taninos, as atividades farmacológicas verificadas nesse estudo;

- O EASA apresentou ação anti-inflamatória ao inibir a formação do edema na pata de ratos Wistar. Provavelmente, por uma ação inibitória atribuída inicialmente ao mediador histamina, mas sem descartar sua possível ação sobre outros mediadores inflamatórios, que deve ser posteriormente investigado.

- O EASA preveniu o dano induzido por etanol ou indometacina na mucosa gástrica, assim como, auxiliou o processo de cicatrização na úlcera crônica, atuando de forma preventiva e curativa, caracterizando dessa forma uma ação gastroprotetora;

- O EASA demonstrou ser um agente hepatoprotetor antioxidante, pois reduziu os níveis de peroxidação lipídica e das enzimas séricas e aumentou a expressão da catalase e a proliferação dos hepatócitos;

- O ensaio de toxicidade aguda, por via oral, com o EASA na dose de 2000 mg/kg não produziu sinais de toxicidade ou morte nos animais, sugerindo uma DL_{50} maior que a referida dose, sendo considerado praticamente não tóxico por essa via de admnistração. Enquanto que a administração de doses repetidas do EASA, durante os 30 dias consecutivos, produziu alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas pontuais. Contudo, estudos posteriores em animais de maior porte deverão ser conduzidos a fim de elucidar como essas alterações poderiam comprometer a funcionalidade e a integridade dos órgãos-alvos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M. E.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology**, n. 95, p. 105–127, 2001.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 34, p. 414-420, 2010.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, n. 105, p. 121-126, 1984.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, p. 114-140, 2007.

AKANDE, K. E.; DOMA, U. D.; AGU, H. O.; ADAMU, H. M. Major antinutrients found in plant protein sources: their effect on nutrition. **Pakistan Journal of Nutrition,** n. 9, p. 827-832, 2010.

ALMEIDA, E. S. S.; FILHO, V. C.; NIERO, R.; KLASEN, B. K.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. O. Pharmacological mechanisms underlying the anti-ulcer activity of methanol extract and canthin-6-one of *Simaba ferruginea* A. St-Hil. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 134, p. 630-636, 2011.

ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.

ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de imunohistoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 9p.

ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M.; BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Effect of Mouriripusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 107, p. 431–441, 2006.

ARHELGER, R. B.; BROOM, J. S.; BOLER, R. K. Ultrastructural hepatic alterations following tannic acid administration to rabbits. **American Journal of Pathology**, n. 3, p. 409-434, 1964.

ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E.; ROCHA, R. F.; ALMEIDA, J. D. Biologicalmarkers: PCNA and Ki-67. **Revista da Faculdade de Odontologia,** n. 2, p. 54-60, 1999.

ARRIAGA, A. M. C.; MESQUITA, A. C.; POULIQUEN, Y. B. M.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; SIQUEIRA, J. A.; ALEGRIO, L. V.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 73, n. 3, p. 415-424, 2002.

ASHA, V. V.; SHEEBA, M. S.; SURESH, V.; WILLIS, P. J. Hepatoprotection of *Phyllantus maderaspatensis* against experimentally induced liver injury in rats. **Phytotherapy,** n. 78, p. 134-141, 2007.

BARNES, D. G.; DOURSON, M. Reference dose: description and use in health risk assessments. **Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 471-486, 1988.

BELAICHE, J.; BURETTE, A.; DE VOS, M.; LOUIS, E.; HUYBRECHTS, M.; DELTENRE, M. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. **Acta Gastroenterology Belgium**, n. 65, p. 65–73, 2002.

BOGLIOLO, L. Patologia geral. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 463p.

BONTÉ, F.; BARRET, P.; PINGUET, P.; DUSSER, I.; DUMAS, M.; MEYBEC, A. *Simarouba amara* extract increases human skin keratinocyte differentiation. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 53, p. 65-74, 1996.

BORG, D.C.; SCHAICH, K. M. Iron and iron-derived radicals. In: Halliwell B (ed): **Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of a Brook Lodge Symposium.** Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, 1988. p. 20-26.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The Plant Kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, n. 14, p. 581–591, 2000.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Projeto básico de revisão das monografias da farmacopéia brasileira.** Brasília: Anvisa, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº. 90 de 16 de Março de 2004**. Guia para a realização de** e**studos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Brasília-DF, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde, Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº. 10 de 09 de Março de 2010**. Notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providênicas**. Brasília-DF, 2010.

BRATTIN, W. J.; GLENDE, E. A.; RECKNAGEL, R. O. Pathological Mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine,** n. 1, p. 27-38, 1985.

BRIENT-JOHNSON, H. L.; CHRISTIAN, D. P. Lack of tannic acido n sodium balance in *Microtus pennylvanicus*. **Journal of Mammalogy**, n. 3, p. 992-998, 1998.

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

CACERES, A. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 55-73, 1990.

CENGIZ, N.; KAVAK, S.; GUZEL, A.; OZBEK, H.; BEKTAS¸ H.; HIM, A.; ERDOGAN, E.; BALAHOROGLU, R. Investigation of the hepatoprotective effects of Sesame (*Sesamum indicum* L.) in carbon tetrachloride-induced liver toxicity. **Journal of Membrane Biology**, n. 246, p. 1–6, 2013.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Biochemistry**. 3ª edição, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 534p.

CHEN, C. H.; LIU, T. Z.; KUO, T. C.; LU, F. J.; CHEN, Y.C.; CHANG-CHIEN, Y. W.; LIN, C. C. Casuarinin protects cultured MDCK cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA oxidative damage. **Planta Medica**, n. 70, p. 1022–1026, 2004.

CHEN, J. H.; CHUANG, S. Y.; CHEN, H. J.; YEH, W. T.; PAN, W. H. Serum uric acid as an independent risk factor for all-cause, cardiovascular, and ischemic stroke mortality: a Chinese cohort study. **Arthritis Care and Research,** n. 2, p. 225-232, 2009.

CLIFFORD, M. N.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; CROZIER, A. Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. American Journal of Clinical Nutrition, n. 6, p. 1619S-1630S, 2013.

COIMBRA, R. **Manual de Fitoterapia.** 2ª edição, Belém: Cejup, 1994. 335p.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins – Patologia Estrutural e Funcional.** 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 295p.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química,** v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos molecuares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata sprengel* e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DA CUNHA, A. P. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 3ª edição, Lisboa: Fundação Calouste Gilbenkian, 2008. 701p.

DAUD, A.; HABIB, N.; RIERA, A. S. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of extracts of *Phrygilanthus acutifolius* flowers. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 108, p. 198-203, 2006.

DAY, C. P. Alcohol and the liver. **Medicine**, n. 35, p. 22–25, 2007.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; PALACIOS-ESPINOSA, J. F.; REYES-RAMÍREZ, A.; MATA, R. Antinociceptive and anti-infammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 114, p. 161–168, 2007.

DJAHANGURI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, n. 4, p. 265 - 267, 1969.

EMIM, J. A. S. **Atividades farmacológicas de um inibidor seletivo da calicreína tecidual em processos nociceptivos e antiinflamatórios de camundongos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.

ESPINAL, T.; SIGIFREDO, L. **Arboles de Antioquia**. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 1986. 251p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Métodos gerais, 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FREELAND, W. J.; CALCOTT, P. H.; GEISS, D. P. Allelochemicals, minerals and herbivore population size. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 13, p. 195-206, 1985.

GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI C. Membrane lipid peroxidation: pulse and γ-radiolysis in oxyradical research. In: Vigo- Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. First edition. Santa Clara: CRC Press, 1991. p. 2-30.

GONZALES, F.; DIAZ, J. N.; LOWY, P. **Flora Ilustrada de San Andrés y Providencia.** Colômbia: Sena/Universidad nacional, 1995. 242p.

GROSVENOR, S. N. J. ; MASCOLL, K.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. S.; TINTO, W. S. Tirucallane, Apotirucallane and Octanorapotirucallane Triterpenes of *Simarouba amara.* **Journal of Natural Products**, n. 69, p. 1315-1318, 2006.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation: some problems and concepts. In: Halliwell B (ed): O**xygen radicals and tissue injury. Proceedings of a Brook Lodge Symposium.** Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, 1988. p. 9-19.

HALL, I. H.; LEE, K. H.; IMAKURA, Y.; OKANO, M.; JOHNSON, A. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 72, p. 1280-1282, 1983.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Reviews,** n. 55, p. 44–52, 1997.

HANZLIK, R. P. Reactivity and toxicity among halogenated methanes and related compounds. **Biochemical Pharmacology**, n. 30, p. 3027-3030, 1981.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods.** 3rd. edition. London: Chapman & Hall, 1998.

HASTINGS, J. J.; CHRISTIAN, D. P.; MANNING, T. E.; HARTH, C.J. Sodium and Potassium effects on adrenal gland indices of mineral balance in meadow voles. **Journal of Mammalogy**, n. 72, p. 641-651, 1991.

HERRERA, D. M.; ABDALA, S.; BENJUMEA, D.; LUIS, J. G: Diuretic activity of some *Withania aristata* Ait fractions. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 117, p. 496-499, 2008.

HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminary in Hematology**, n. 26, p. 277-285, 1989.

HO, S.; TANG, Y.; HUANG, C.; KUO, C.; LIN, C.; YANG, S.; WU1, J. The Hypouricemic effect of *Balanophora laxiflora* extracts and derived phytochemicals in hyperuricemic mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, n. 2012, p.1-7, 2012.

HSU, Y. W.; TSAI, C. F.; CHANG, W. H.; HO, Y. C.; CHEN, W. K.; LU, F. J. Protective effects of *Dunaliella salina* – A carotenoids-rich alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 3311–3317, 2008.

KABIR, M. H.; NASAN, N. H.; RAHMAN, M. M; RAHMAN, M. A.; KHAN, J. A.; HOQUE, N. T.; BHUIYAN, M. R. Q.; MOU, S. M.; JAHAN, R.; RAHMATULLAH, M. A survey of medicinal plants used by the Debbarma clan of the Tripura tribe of Moulvibazar district, Bangladesh. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine,** n. 10, p. 2-28, 2014.

KALE, M.; MISAR, A. V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUNDAR, A. M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 300-304, 2007.

KAMIJO, M.; KANAZAWA, T.; FUNAKI, M.; NISHIZAWA, M.; YAMAGISHI, T. Effects of rosa rugosa petals on intestinal bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, n. 72, p. 773–777, 2008.

KANAAN, S.; GARCIA M. A. T. Bioquímica Clínica. 2ª edição, Niterói: Atheneu, 2014. 425p.

KELLER, A. G. **Garcia d'Orta: Dictionary of Scientific Biography**. New York: Press, 1974. 238p.

KHAN, H. A. Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, p. 89 -95, 2004.

KHAN, M. R.; AHMED, D. Protective effects of *Digera muricata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. **Food and Chemical Toxicology**, n. 47, p. 1393-1399, 2009.

KHENNOUF, S.; BENABDALLAH, H.; GHARZOULI, K.; AMIRA, S.; ITO, H.; KIM, T.; YOSHIDA, T.; GHARZOULI, A. Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 51**,** p. 1469-1473, 2003.

KIM, S.H.; JUN, C.D.; SUK, K.; CHOI, B.J.; LIM, H.; PARK, S.S.; LEE, H.; SHIN, H.Y.; KIM, D.K.; SHIN, T.Y. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicological Sciences,** n. 91, p.123–131, 2006.

LARINI, L.; OLIVEIRA, G. H. **Avaliação toxicológica**. 2ª edição, São Paulo: Manole, 1993. 54p.

LEMOS, A. H. Controle e prevenção de doenças pela medicina natural e ortomolecular. São Paulo: Atheneu, 2006. 331p.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, M. A.; GUIMARAES, P. L.; BATISTA, L. R.; NELSON, D. L. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** n. 89, p. 523-528, 2012.

LOGUERCIO, C., TARANTO, D., BENEDUCE, F., BALANCE, V. V., VINCENTIS, A. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfydryl compounds in humans. **Gut,** n. 34, p.161-165, 1993.

LOOMIS, M. D.; HAYNES, A. W. **Essentials of Toxicology**. 4ª edição, Califórnia: Academic Press, 1996. 215p.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology,** v. 76, n. 4, p. 495-506, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova,** n. 3, p. 429-438, 2002.

MADDREY, W. C. Drug-induced hepatotoxicity. **Journal of Gastroenterology**, v. 39, p. S83-S89, 2005.

MAITY, T. K.; MANDAL, S. C.; MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; DAS, J.; PAL, M.; SAHA, B. Studies on antiinflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (fam. Leguminosae). **Phytotherapy Research,** v. 12, n. 3, p. 221-223, 1998.

MAJUMDAR, S.; MOUDGAL, R. P. Effect of tannic acid on activities of certain digestive enzymes and alkaline phosphatase in intestine and glucose absorption in adult chickens. **Journal of Applied Animal Research**., n. 6, p. 105–112, 1994.

MALONE, R.A. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: Warner, H., Wolf, P. (Eds.), **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 24–53.

MANDA, G.; NECHIFOR, M. T.; NEAGU, T. M. Reactive oxygen species, cancer, and anti-cancer therapies. **Current Chemical Biology,** n. 3, p. 22-46, 2009.

MARTINELLI, A. L. C. Icterícia. **Medicina**, n. 37, p. 246-252, 2004.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 344p.

MAUSS, S.; WEDEMEYER, H. Treatment of chronic hepatitis B and the implications of viral resistance to therapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, n. 2, p. 191-199, 2008.

McRAE, J. M.; KENNEDY, J. A. Wine and grape tannin interaction with salivary protein and their impact on astringency: a review of current research. **Molecules**, n. 3, p. 2358-2364, 2011.

MELANCHAUSKI, L. S.; BROTO, A. P. G. S.; MORAES, T. M.; NASSER, A. L. M.; SAID, A.; HAWAS, U. W.; RASHED, K.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gastroprotective and antisecretory effects of *Alianthus excelsa* (Roxb). **Journal of Natural Medicine**, n. 64, p. 109-113, 2010.

MELO, M. M.; VERÇOSA JÚNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCO, R.; PAES, P. R. O. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 3, p. 631-640, 2008.

MENGUE, S. S; MENTZ, L. A.; SHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.

METZ, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations. **Naturwissenschaften**, n. 48, p. 569-570, 1961.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry,** n. 247, p. 3170-3175, 1972.

MITJAVILA, S.; LACOMBE, C.; CARRERA, G.; DERACHE, R. Tannic Acid and Oxidized Tannic Acid on the Functional State of Rat Intestinal Epithelium. **Journal of Nutrition**, n. 107, p. 2113-2121, 1977.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. 5ª edição, São Paulo: Medbook, 2009. 419p.

MURAKAMI, S.; ISOBE, Y.; KIJIMA, H.; NAGAI, H.; MURAMATU, M.; OTOMU, S. Inhibition of gastric H^+,K^+-ATPase and acid secretion by ellagicacid. **Planta Medica**, n. 57, p. 305-308, 1991.

NAIK, S. R.; PANDA, V. S. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Ginkgo biloba* phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. **Liver International**, n. 27, p. 393-399, 2007.

NEU, R. A New reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. **Naturswissenschaften,** n. 43, p. 82, 1956.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 227-240, 2009.

NOVELLO, C. R.; BARBOSA BAZOTTE, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; MARQUES, L. C.; CORTEZ, D. A. G. Toxicological and Pharmacological Studies of *Picrasma crenata* (Vell.) Engler (Simaroubaceae) in mice and rats. **Latin American Journal of Pharmacy,** v. 27, n. 3, p. 345-348, 2008.

O'NEILL, M. J.; BRAY, D. H.; BOARDMAN, P.; WRIGHT, C. W.; PHILLIPSON, J. D.; WARHURST, D. C.; GUPTA, M. P.; CORREYA, M.; SOLIS, P. Plants as sources of antimalarial drugs, Part 6: Activities of *Simarouba amara* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p.183–190, 1988.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **Guidelines for Testing of Chemicals, Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. N. 407, Paris: OECD, 1995.

OECD (Organization of Economic for Cooperation and Development). **Guideline for Testing of Chemical: Acute Oral Toxicity - Up–and–Down Procedure**. n. 425, Paris: OECD, 2001.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n. 28, p. 1321–1341, 2005.

OKABE, S.; PFEIFFER, C. Chronicity of acetic acid in the rat stomach. **Digestive Diseases and Sciencs**, n. 7, p. 619–629, 1972.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012–2031, 2005.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of ana- lyzing tannins. **Journal of Natural Products,** n. 52, p. 1–31, 1989.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. Ellagitannins renewed the concept of tannins. In: Quideau S (ed) **Chemistry and biology of ellagitannins**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2009. p. 40–54.

OLSZEWER, E. **Clínica Ortomolecular**. 2ª edição, São Paulo: Rocca, 2008. 544p.

PAN, M. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; HO, C. T.; LIN, J. H.; LIN, J. K. Sup- pression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor- kappaB activity by theaflavin-3, 30-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of Ikap- paB kinase activity in macrophages. **Biochemical Pharmacology**, n. 59, p.357–367, 2000.

PANTHONG, A.; SUPRADITAPORN, W.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; REUTRAKUL, V. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 110, p. 264–270, 2007.

PAULA, L.; SANTOS, W. F.; MALHEIRO, A.; CARLOS, D.; FACCIOLI, L. H.. Differential modulation of celle recruitment and acute edema in a modelo of *Polybia paulista* venom-induced inflammation. **International Immunopharmacology**, n. 6, p. 182–189, 2006.

POLONSKY, J.; VARON, Z.; JACQUEMIN, H.; PETTIT, G. R. The isolation and structure of 13,18-dehydroglaucarubinone, a new antineoplastic quassinoid from *Simarouba amara.* **Experientia**, n. 34, p. 1122-1123, 1978.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE, E. A.; DOLAK, J. A.; WALLER, R. L. Mechanisms of Carbon Tetrachloride Toxicity. **Pharmacology & Therapeutics,** n. 43, p. 139-154, 1989.

RESTEL, T. I. **Avaliação ponderal, hematólogica e bioquímica em camundongos *Mus musculus*, linhagem *Swiss*, machos e fêmeas de diferentes idades, do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS**. Dissertação de Mestrado, 2012.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SXHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 51 – 62, 2002.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology.** Baltimore: Willians & Wilkins, 1996. 14p.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, n. 77, p. 433–443, 1979.

ROBERTS, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** n. 8, p. 72-80, 1957.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor of Reviews,** v. 21, n. 1, p. 61-65, 2010.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1st edition. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.151-70.

SAIRAM, K. Antiulceratogenic effect of methanolic extract of *Emblica officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.82, p.1-9, 2002.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; BOURDON, D. M.; STERN, M. K.; CURRIE, M. G.; MANNING, P. T. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. **European Journal of Pharmacology**, n. 303, p. 217–220, 1996.

SAMONINA, G. E., KOPYLOVA, G. N., LUKJANZEVA, G.V., ZHUYKOVA, S.E., SMIRNOVA, E.A., GERMAN, S.V., GUSEVA, A.A. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology**, n. 11, p. 1-6, 2004.

SHAHIDI, F.; HO, C. **Antioxidant Measurement and Applications: An Overview.** New York: American Chemical Society, 2007. 956p.

SILVA, N. C. B.; ESQUIBEL, M. A.; ALVES, I. M.; VELOZO, E. S.; ALMEIDA, M. Z.; SANTOS, E. S., CAMPOS-BUZZI, F., MEIRA, A.V., CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpos* (B.A. Gomes) Barneby & J. W. Grimes (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 19, p. 46–50, 2009.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A.; DOURADO, P. S. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMILE, M. M.; BANI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; FEO, F. 5'- methylthioadensine administration prevents lipid peroxidation and fibrinogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. **Journal of Hepatology**, n. 34, p. 386-394, 2001.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª edição. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004. 1102p.

SINGH, N.; KAMATH, V.; NARASIMHAMURTHY, K.; RAJINI, P.S. Protective effects of potato peel extract against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n. 26, p. 241-146, 2008.

SINTOX – Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <http://www.fiocruz.br/sintox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home> acesso em: 10 de Jan. de 2014.

SLATER, T. F. Biochemical implications of current studies on vitamin E. **Annals of the New York Academy of Sciencs**, n. 393, p. 496-500, 1982.

SOUZA, W. J. M.; OLIVEIRA, J. F. F.; NICOLETE, R. Plantas medicinais com potencial atividade anti-inflamatória utilizadas pela população: um guia prático e ilustrativo. **Florence**, n.1, p. 1-23, 2011.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 3, p. 435-440, 2010.

SUTHERLAND, B. A.; SHAW, O. M.; CLARKSON, A. N.; JACKSON, D. N.; SAMMUT, I. A.; APPLETON, I. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin gallate following hypoxiaischemia-induced brain damage: novelmechanisms of action. **FASEB Journal**, n. 19, p. 258-260, 2005.

TAYLOR, L: **The healing power of rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinal**. New York: SquareOne publishers, 2005. 520p.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 12ª edição. Rio de Janeiro, 2010.

UPUR, H.; AMAT, N.; BLAZEKOVIC, V.; TALIP, A. Protective effect of Cichorium glandulosum root extract on carbon tetrachloride-induced and galactosamine-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, n. 47, p. 2022-2030, 2009.

VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; BATISTA, T. M.; CARNEIRO, E. M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L. A. L.; SÁ, M. D. C; SOUZA, T. P.; WANDERLEY, A. G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia férrea* Martius stem bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 137, n.3, p. 1533 – 1541, 2011.

VASCONCELOS, P. C. P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R. K.; PELLIZON, C. H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriripusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 115, p. 293-301, 2008.

VEIGA JR., V. F.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, n. 28, p. 519-528, 2005.

VELA, S. M.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T.; LAPA, A. J. Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Starchytarpheta cayannensis*. **Planta Medica**, n. 63, p. 36–39, 1997.

WAGHORN, G. C. Effects of condensed tannin on protein digestion and nutritive value of fresh herbage. **Australian Society of Animal Production**, n. 18, p. 412-415, 1990.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug analysis**. 2ª ed., New York: Springer, 1996. 384p.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?. **Physiological Reviews**, n. 88, p.1547–1565, 2008.

WAYNFORTH, B. H. **Injection techniques:** Experimental and surgical techniques in the rat. London: Academic Press, 1980. 61p.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced paw oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceeding of Society of Experimental Biology and Medicine,** n. 111, p. 544–547, 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Reducing risks, promoting health life**. Geneva, 2002. Disponível em <http://who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf?ua=1>. Acesso em 02 de Fevereiro de 2014.

WRIGHT, C. W.; O'NEILL, M. J.; PHILLIPSON, D.; WARHURST, D. C. Use of microdilution to assess in vitro antiamoebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* stem and a number of quassinoids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 11, p. 1725-1729, 1988.

XAVIER, H. S. *Lavandula stoechas* L. (Lamiaceae): E**tude Botanique, Chimique et Pharmacodynamique.** [Tese]. Monpellier : Université de Monpellier - I; 1988.

YAHYAOUI, R.; ESTEVA, I.; HARO-MORA, J. J. Effect of long-term administration of cross-sex hormone therapy on serum and urinary uric acid in transsexual persons. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 93, p. 2230-2233, 2008.

YAMADA, T.; ONO, T.; SHIGEMORI, H.; HAN, J.; ISODA, H. Inhibitory effect of tannins from galls of *Carpinus tschonoskii* on the degranulation of RBL-2H3 Cells. **Cytotechnology,** n. 64, p. 349-356, 2012.

YANG, Y-S.; AHN, T-H.; LEE, J. C.; MOON, C. J.; KIM, S. H.; JUN, W.; PARK, S. C.; KIM, H. C.; KIM, J-C. Protective effects of Pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, n.46, p. 380–387, 2008.

APÊNDICE

Apêndice A – artigo aceito

Int. Res J Pharm. App Sci., 2014; 4(2):58-66 ISSN: 2277-4149

International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS)
Available online at www.irjpas.com
Int. Res J Pharm. App Sci., 2014; 4(2):58-66

Research Article

GASTROPROTECTIVE EFFECTS OF THE AQUEOUS EXTRACT OF *SIMAROUBAAMARA*AUBLET (SIMAROUBACEAE) STEM BARK ON EXPERIMENTALLY INDUCED GASTRIC ULCERS IN RODENTS

Hélida M. L. Maranhão[1]; Larissa Araújo Rolim[2], Germana F. Rocha Caldas[1], Jacinto da Costa Silva-Neto[3], Almir G. Wanderley[1,4*]

[1]Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, 50740-521, Brazil.
[2]Collegiate of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Vale do São Francisco, Petrolina, 56304-205,Brazil.
[3]Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, Recife, 50670-901, Brazil.
[4]Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, 50760-901, Brazil.

*Corresponding Author: Almir G. Wanderley; Email: almirgw@globo.com

Abstract: *Simaroubaamara*Aublet stem bark decoction has been traditionally used in Brazil to treat malaria, inflammation, fever, abdominal pain, diarrhea, wound and as tonic. The aim of this study was investigate the gastroprotective effects of the aqueous extract of *S. amara*stem bark (SAAE) on different ulcer models induced in rodents. The SAAE was obtained by decoction and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Acute ulcer was induced by ethanol and indomethacin and the chronic model by acetic acid. HPLC analyze quantified condensed and hydrolysable tannins. Oral administration of SAAE (100, 250 and 500 mg/kg) inhibited ethanol and indomethacin induced ulcers. In the chronic model, SAAE (500 mg/kg) promoted re-epithelization, increased cell proliferation and restored glandular secretory activity of the gastric mucosa.The SAAE showed significant gastroprotective effects in the ulcerogenic models induced in rats. It restored glandular secretory activity and probablyprevented the oxidative damage at the same time that increased regenerative and reparative capacities of the gastric mucosa.

Key words: Simaroubaamara, ulcer, tannins, gastroprotection

1. INTRODUCTION

Peptic ulcer is one of the world's major gastro-intestinal disorders, embracing both gastric and duodenal ulcers and affecting 10% of the world population[1]. The patho-physiology of peptic disease is attributed to the imbalance between aggressive factors like acid, pepsin, Helicobacter infection and the local mucosa defenses like bicarbonate secretion, mucus and prostaglandins. *Helicobacter pylori* infection, use of non-steroidal anti-inflammatory drugs-NSAIDs, emotional stress, alcohol abuse and smoking are the principal etiological factors associated with peptic ulcer[2].

Although theacid secretionsuppressorshave beenused as basic therapy forthe healing of ulcer, there has been a growing interest in themechanisms by whichthe ulcerhealsaswell as in the possibility thatthe speed andquality of healingmaybepharmacologicallymodulated. Ulcer healingrequiresangiogenesisin the granulationtissue at the baseof the ulcertogether withepithelialcellsproliferation inthe ulcermarginandsubsequentrestoration ofglandulararchitecture[3].

In traditional medicine, many plantshave been usedto treatgastrointestinal disorders, includinggastric ulcers[4].*Simaroubaamara*Aublet, popularly known as "praíba", "marupá" and "pau - paraíba", is a large tree that reaches up to 40 m height and 0.5 to 0.9 m diameter[5]. The use of *S. amara* has a long history in folk medicine of many countries[6].Ethnopharmacological data refer to use of a cup of *S. amara*stem bark decoction, 2 - 3 times per day, to treat malaria, inflammation, fever, abdominal pain, diarrhea, wound and as tonic[6,7].

Simaroubaamara pharmacological assays showed antimalarial action of its fruits [8], amebicide and bactericidal activities (against *Shigellaflexineri* and *Salmonella typhosa*) of its stem bark and its root bark showed moisturizing action in the human epidermis[7].

In phytochemical screening studies conducted by Polonskyet al.[9] were isolated alkaloids, triterpenes and quassinoids from *S. amara* stem bark. Isolated six new triterpenoids from the *S. amara* stem bark and two other compounds previously known (3-oxotirucalla-7, 24-dien-23-ol and niloticina)[10]. Coimbra[11] has also isolated alkaloids and tannins from the bark of this specie.

Despite the pharmacological properties of *Simaroubaamara* stem bark, its antiulcerogenic effect has not been investigated. Therefore, the present study evaluated the possible gastroprotectivepotencial of the aqueous extract of *Simaroubaamara* stem bark (SAAE) on experimentally induced gastric ulcers in rodents.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Catechin, epicatechin, gallic acid, ellagicacid, chlorogenic acid, pantoprazole and indomethacin were purchased from Sigma - Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, USA). Ethanol and acetic acid (Vetec, Duque de Caxias, Brazil), lactate ehydrogenase (LDH) (BoehringerIngelheim,

Int. Res J Pharm. App Sci., 2014; 4(2):58-66 ISSN: 2277-4149

São Paulo, Brazil) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from Abcam (Cambridge, USA).

2.2 Material plant

The stem barks of *Simaroubaamara*Aublet were collected in São João, Pernambuco, Brazil (08 ° 52 '33 "S and 36 ° 22' 01" The Gr) and identified at the Agronomic Institute of Pernambuco. A voucher specimen was deposited at the Dárdano de Andrade Lima Herbarium under number 85268.

2.3 Extract preparation

The stem barks of *Simaroubaamara* were collected in December 2010. The samples were shade dried for 48 hours and then placed in a circulating air oven at a temperature of 45 ± 2 °C to stabilize the residual moisture. At the end, the barks were ground in a Knives mill. The aqueous extract of *Simaroubaamara* stem bark (SAAE) was obtained from the decoction of the powder (10:100 w/v) using distilled water as extractor solvent for a period of 10 minutes. The aqueous extract was concentrated in lyophilizer. The yield of *Simaroubaamara* dried extract was 12.15 g per liter of the SAAE.

2.4 Phytochemical screening

2.4.1 Thin layer chromatography

The dry extract of *Simaroubaamara* stem bark was analyzed for the presence of hydrolyzable tannins (gallic and ellagic acids), tannins condensed (catechins), flavonoids, saponins, coumarins, phenylpropanoids, cinnamic acid derivatives, alkaloids, triterpenes/steroids, monoterpenes, sesquiterpenes, quassinoids, iridoids and sugars. The phytochemical profile was assessed in silica gel chromatographic plates (Merck ® art. 105553, UV 250 - 366nm) using mobile phases, reagents and appropriate standards[12].

2.4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC conditions: chromatographic analysis to quantify tannins and chlorogenic acid in the extractive solution were conducted in liquid chromatograph Shimadzu® (UFLC, Japan) controlled by software LC Solution 1.0 and consisting of LC-20 AT pump, degasser DGU - 20A5, Sil-20A autosampler and detector diode array (DAD) SPD - M20A. It was used Restek® C18 column (250 mm x 4 mm, 5µm) maintained at 30 °C. The standards and samples were eluted using a mobile phase gradient consisting of methanol (A) and 0.5% acetic acid (pH 3.0) (B). The conditions were: 0 - 50 min (10 - 90% A and 90 - 10% B), 50 - 55 min (90 -10% A and 10 - 90% B), 55-60 min (10% A and 90% B). Flow rate of 0.8 mL / min and injection volume of 20 µL.

Samples preparation: the aqueous solution of dried extract from *Simaroubaamara*stem bark in the concentration of 1.6 mg/mL was used as extractive solution. For standards, it was prepared aqueous solution of catechin (1.6 mg/mL), gallic acid (0.16 mg/mL), ellagic acid (0.16 mg/mL), epicatechin (0.1 mg/mL) and methanolic solution of chlorogenic acid (0.05 mg/mL). The standard concentrations were used to construct their analytical curves. All samples and standards were filtered through membranes of 0.22 µm (Millipore®) and injected in triplicate. The chromatograms were obtained at 290 nm.

2.5 Animals

Male Wistar rats (*Rattusnorvegicus*var. *albinus*) (aged 2 months, weighing 250 – 280 g) were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology at the Federal University of Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brazil. The animals were kept under standard environmental conditions (22 ± 2 °C; 12:12 h dark/light cycle). Water and industrialized dry food (Labina®, Purina, Brazil) were available *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of UFPE (Process n°. 026449), in accordance with the National Institute of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.6. Antiulcerogenic activity

2.6.1. Ethanol-induced gastric ulcer

After 16 h of fasting, the animals were randomly divided into five groups (n = 6/group) and were orally pretreated with the aqueous extract of *Simaroubaamara*stem bark (SAAE) (100, 250 and 500 mg/kg), a vehicle (water) and pantoprazole (40 mg/kg), one hour before administration of the ulcerogenic agent. Gastric lesions were induced using ethanol (70%, 0.5 mL/100 g, p.o). The animals were euthanizedusing thiopental (140 mg/kg, i.p.) one hour after induction of gastric lesions. Their stomachs were removed, by opening them along the greater curvature, the contents removed and the stomach mucosa gently washed with saline (0.9%) and examined for quantification of lesions. The gastric lesion area was measured using planimetry (mm²) in relation to the total area of the gastric corpus[13].

2.6.2. Indomethacin-induced gastric ulcer

After 16 h of fasting, the animals were randomly divided into five groups (n = 6/group) and were orally pretreated with the aqueous extract of *Simaroubaamara*stem bark (SAAE) (100, 250 and 500 mg/kg), a vehicle (water) and pantoprazole (40 mg/kg). Gastric lesions were induced by subcutaneous administration of indomethacin 30 mg/kg, 30 minutes after the treatment[14]. The animals were sacrificed 6 h after indomethacin injection, their stomachs removed and inspected under magnification to determine the gastric lesions produced. The results were expressed as lesions, ulcers and total index, which were obtained from scores determined by various alterations in the gastric mucosa, considering the color, edema and hemorrhage, loss of mucus, petechiae or damage to the mucosa folds, and the number and size of necro-hemorrhagic lesions[15].

2.6.3 Acetic acid-induced gastric ulcer

Chronic ulcer induction was based on described by Takagi et al.[16]with some modifications. The animals were divided into 3 groups (n = 6), given a restricted solid food diet for 24 h and, after this, anesthetized in order to perform surgery to expose the stomach. 0.05 mL of 30% acetic acid was injected into the subserosal layer of the external wall of the stomach. One day after administration of acid, daily treatment began and the animals were treated orally once

Int. Res J Pharm. App Sci., 2014; 4(2):58-66 ISSN: 2277-4149

daily for 14 days with water (control), pantoprazole (40 mg/kg) or SAAE (500 mg/kg). During this period, the possible toxic effects of SAAE were evaluated using such parameters as mortality, changes in body mass and macroscopic analysis of vital organs. On day 15, all groups were sacrificed, the stomachs removed, photographed and the surface area of gastric lesion determined by computerized planimetry (Software ImageJ®) and the data expressed in mm².

At the end of the treatment, the blood was also collected by rectro-orbital puncture for biochemical analyze of lactate dehydrogenase (LDH).

2.6.3.1 Histological analysis:

The stomach lesions induced by acetic acid in rats undergoing different treatments were located, sectioned, and set in 10% buffered formalin. After setting, the samples was washed with water, immersed in 70% ethyl alcohol for 3-4 days and embedded in paraffin. Five-µm thick paraffin sections were taken and stained with hematoxylin/eosin (HE) and Periodic Acid–Schiff (PAS).Histological analysis of the gastric sections was carried out using an automatic microscopy system MICRO DIP® (Kacillinc)[17].

2.6.3.2 Immunohistochemical analysis:

Theimmunohistochemical for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was performed in samples of rats' stomachsembedded in paraffin. Sections of 4 µm were obtained and incubatedfor 30 min withmonoclonal antibody against the anti-PCNA protein. Initially, the samples were deparaffinized in xylene and hydrated. Then antigenic retrievalwas performed in microwave oven at 100 °C, the slideswere cooledtoroom temperaturewandendogenous peroxidasewas blocked by the incubation inperoxidaseblocking solution for 7.5 min. After cooling, the slides were incubated separately with primary antibodiesforPCNA (anti-PCNA antibody[PC10] - ProliferationMarker(ab29) - Mousemonoclonalantibody,Abcaminc), 1:100, 30 min,and with secondary antibody(Nichirei Biosciencesinc.),1:200for 30min and thenwashed withphosphate buffered saline (PBS). After washing, slides were incubate-dwithdiaminobenzidinechromogen solution(DAB), washedin water, counter-stained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Cells reactive for anti-PCNA were identified by the presence of a dark reddish-brown chromogen in the nucleus of epithelial cells. The reactivity was indicated using the following scores: mild, moderate and strong reactivity[17].

2.7 Statistical analysis:

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5.0 software. The difference between groups was assessed by analysis of variance (ANOVA), followed, when necessary, by Newman-Keuls test. The significance level for rejection of the null hypothesis was always ≥ 5%.

3. RESULTS

3.1 Phytochemical screening

3.1.1 Thin layer chromatography

Phytochemical analysis of dry extract from *Simaroubaamara* stem bark demonstrated the presence of hydrolysable tannins (gallic and ellagic acids) and tannins condensed (Leucoanthocyanidins and proanthocyanidins). Leucoanthocyanidins are precursors of proanthocyanidins, class in which is inserted condensed tannins (catechin and epicatechin). Phenylpropanoids and cinnamic acid derivatives (caffeic acid) were also identified as well as traces of saponins, steroids and quassinoids.

3.1.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC analysis of extractive solution revealed the presence of chromatographic peaks consistent with the standards. Standard retention times were 5.78, 17.80, 18.57, 19.15, 32.6 min for gallic acid, chlorogenic acid, catechin, epicatechin and ellagic acid, respectively. For extractive solution were 5.76, 17.90, 18.62, 19.26 and 32.7 min, respectively (figure 1). The concentrations of the mainly metabolites present in the extract were gallic acid (16.47 µg/mL of extractive solution), chlorogenic acid (3.83 µg/mL), catechin (349.96 µg/mL), epicatechin (16.43 µg/mL) and ellagic acid (1.29 µg/mL). Linear regression analysis indicated linearity of the method.

Int. Res J Pharm. App Sci., 2014; 4(2):58-66 ISSN: 2277-4149

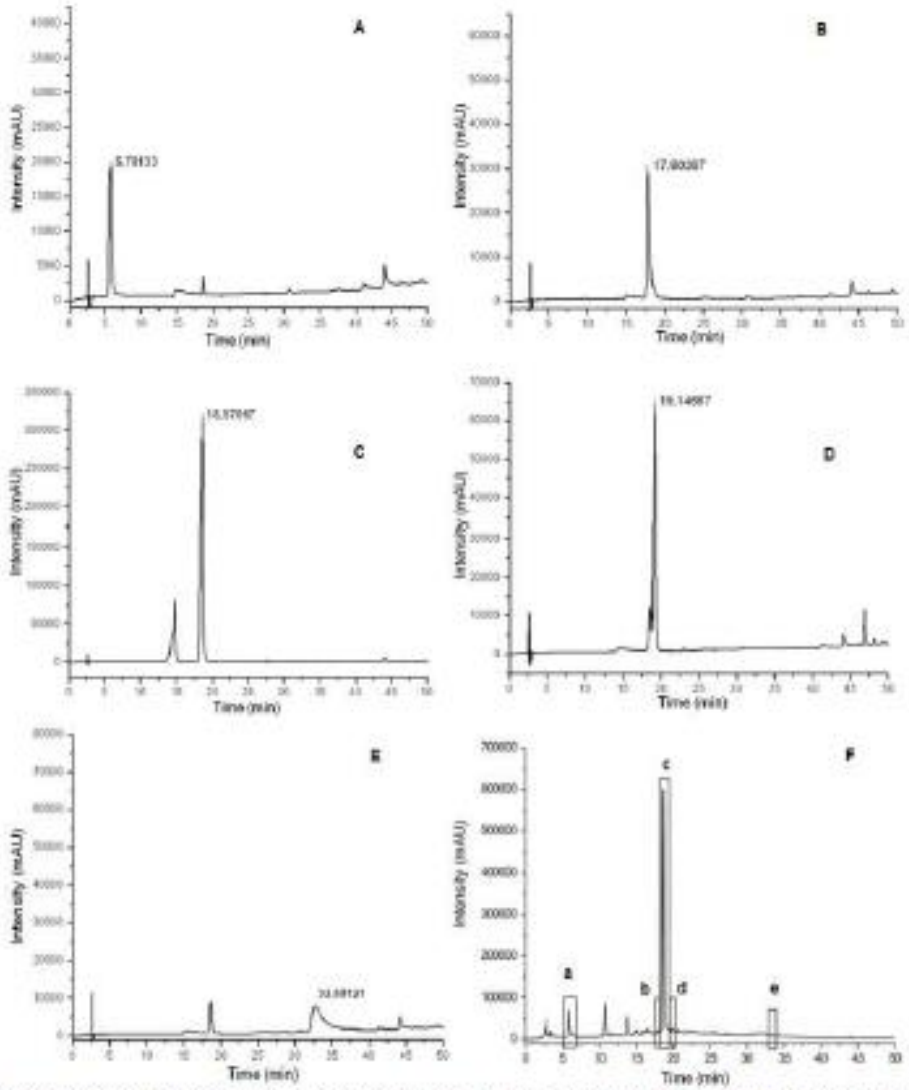

Figure 1: HPLC of standards and extractive solution of *Simaroubaamara*stem bark. A – gallic acid; B – chlorogenic acid; C – catechin; D – epicatechin; E – ellagic acid, F – Extractive solution of *S. amara* (a – gallic acid; b – chlorogenic acid; c – catechin; d – epicatechin; e – ellagic acid).

3.2 Ethanol-induced gastric ulcer

The pretreatment with all doses of the SAAE inhibited the formation ofgastric lesions(mm^2) induced by70% ethanolcompared to control(figure 2). Theinhibition percentage ofulcerwas 66.9, 87.7and 96.3% for doses of 100, 250 and 500 mg/kg, respectively. The inhibition showed by the highest dose wassimilar to pantoprazole (93%).

Int. Res J Pharm. App Sci., 2014; 4(2):58-66 ISSN: 2277-4149

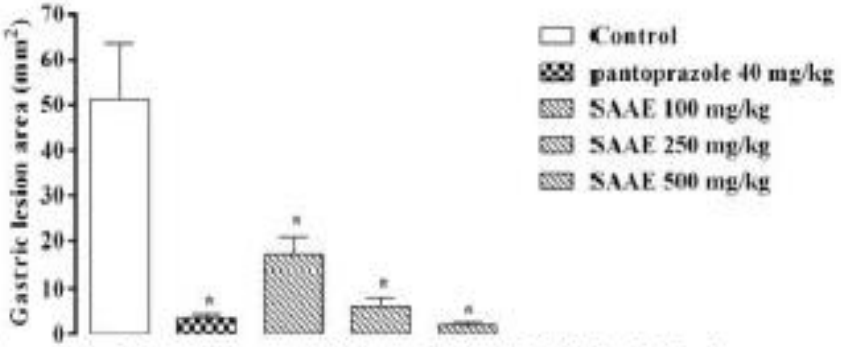

Figure 2: Gastroprotective effect of SAAE on gastric lesions (mm²) induced by 70% ethanol. The values represent mean ± S.E.M (n = 6 / group). * Statistically different from control (ANOVA followed by Newman-Keuls, $p < 0.05$).

3.3 Indomethacin-induced gastric ulcer

Indomethacin (30 mg/kg) produced a gastric lesions index of 3.99 ± 0.16; an ulcer index of 21.77 ± 0.93 and a total index of 25.76 ± 1.03 in the control group. Pretreatment of animals with SAAE at doses of 100, 250 and 500 mg/kg significantly reduced all indices as shown in table 1. The 100 mg/kg dose reduced the incidence of lesions, ulcers and total indices by 62.0, 79.2 and 76.5%, the 250 mg/kg dose by 72.8, 85.4 and 83.4%, and the 500 mg/kg dose by 81.2, 94.8 and 92.7%, respectively. Pantoprazole reduced the lesions, ulcers and total indices by 77.0, 89.3 and 87.4% respectively, when compared with the control group.

Table 1: Gastroprotective effect of SAAE on gastric lesions induced by indomethacin (30 mg/kg, s.c.) in Wistar rats.

Parameters	Control	panto 40	SAAE 100	SAAE 250	SAAE 500
Lesion index	3.99 ± 0.16	0.92 ± 0.12*	1.52 ± 0.13*	1.08 ± 0.15*	0.75 ± 0.12*
Ulcer index	21.77 ± 0.93	2.33 ± 0.18*	4.52 ± 0.41*	3.18 ± 0.31*	1.12 ± 0.22*
Total index	25.76 ± 1.03	3.25 ± 0.71*	6.04 ± 1.50*	4.26 ± 1.05*	1.87 ± 0.18*

Panto 40: pantoprazole 40 mg/kg; SAAE (aqueous extract of *Simaroubaamara*stem bark) at doses 100, 250 and 500 mg/kg. The values represent mean ± S.E.M (n = 6 / group). *Statistically different from control (ANOVA followed by Newman-Keuls, $p < 0.05$).

3.4 Acetic acid-induced gastric ulcer

The SAAE (500 mg/kg) accelerated thehealingof rats gastric ulcerduring the 14days of treatment(figure 3), whose main area of the lesion significantly decreased (1.89 ± 0.56mm²) (95.7%) compared to controlgroup (44.51 ±0.65mm²), however it did not differof the reduction promoted by pantoprazole(2.13 ±0.83mm²) (95.2%).LDH levels (U/L) were also significantly decreasedafter the treatmentof the animals with SAAE (573.70± 6.67) andpantoprazole(522.00 ±8.97) compared to control(988.00±8.97).

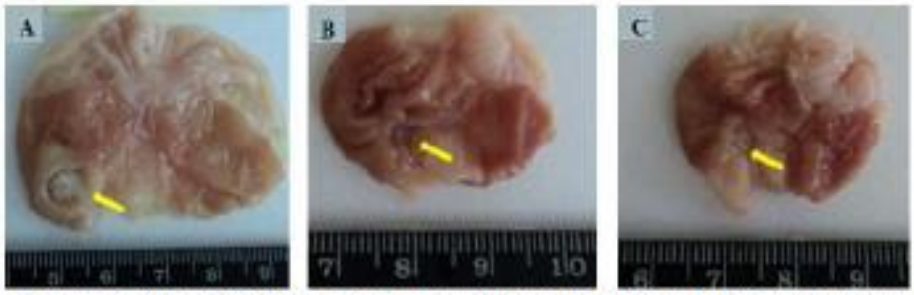

Figure 3: Gastroprotective effect of SAAE on gastric lesions (mm²) induced by 30% acetic acid. The values represent mean ± S.E.M (n = 6 / group). **A** – control; **B** – pantoprazole 40 mg/kg; **C** – SAAE 500 mg/kg.

There were no visible signs of toxicity (diarrhea or changes in behavior or locomotor activity) in animals treated with SAAE and pantoprazole. The animals treated withSAAE500 mg/kgshowedsignificant increasesinbody mass gain(figure 4) andwater intake(figure 5) compared to controlonly on the first week oftreatment.Food intakeremained highfromday 5until theend of treatment(figure 6) when compared to control.

Int. Res J Pharm. App Sci., 2014; 4(2):58-66 ISSN: 2277-4149

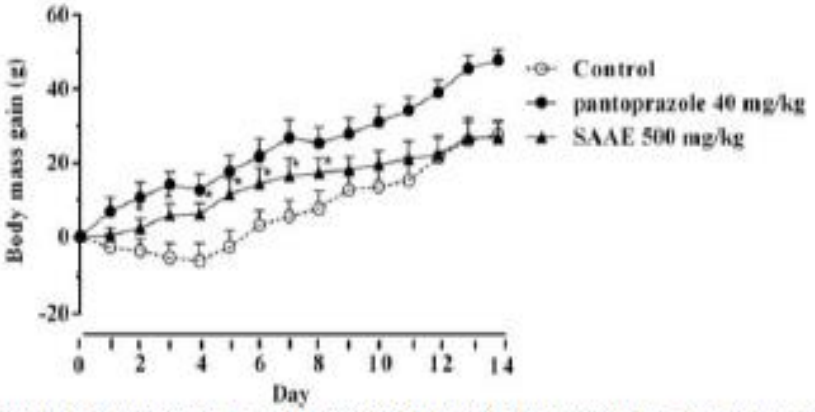

Figure 4: Body mass gain (g) of the animals treated with SAAE 500 mg/kg for 14 consecutive days. The values represent mean ± S.E.M (n = 6 / group). * Statistically different from control (ANOVA followed by Newman-Keuls, $p < 0.05$).

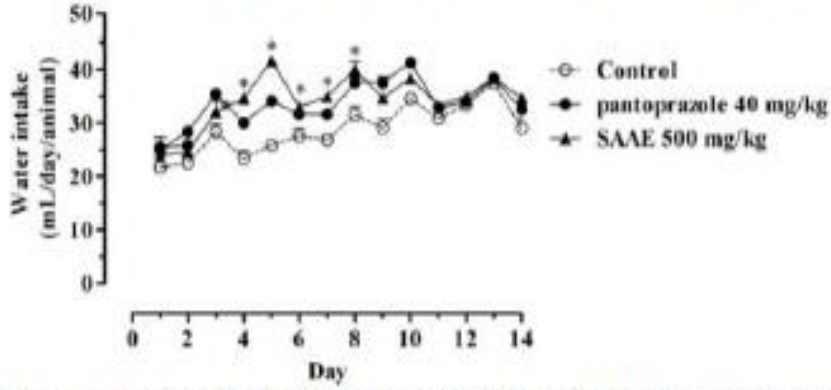

Figure 5: Water intake (mL/day/animal) of the animals treated with SAAE 500 mg/kg for 14 consecutive days. The values represent mean ± S.E.M (n = 6 / group). * Statistically different from control (ANOVA followed by Newman-Keuls, $p < 0.05$).

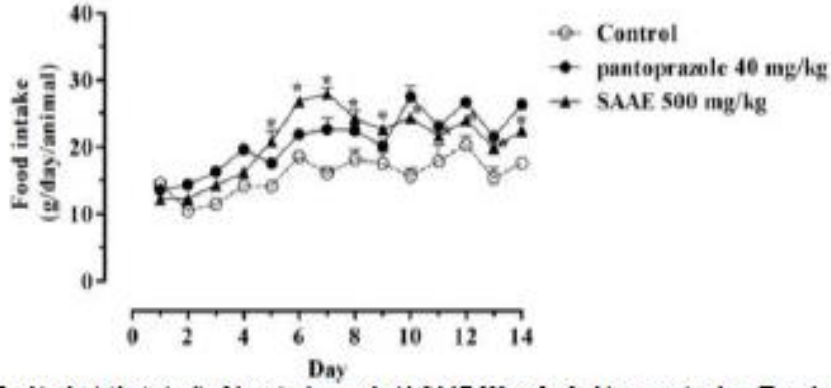

Figure 6: Food intake (g/day/animal) of the animals treated with SAAE 500 mg/kg for 14 consecutive days. The values represent mean ± S.E.M (n = 6 / group). * Statistically different from control (ANOVA followed by Newman-Keuls, $p < 0.05$).

Int. Res J Pharm. App Sci., 2014; 4(2):58-66 ISSN: 2277-4149

3.4.1 Histological analysis:

The HE staining revealed that ulcer induced in the control animals by 30% acetic acid caused destruction ofepithelial, mucosaand submucosa layers withabundantinflammatory infiltrateand confirmed the gastroprotective actions of pantoprazole (40 mg/kg) or SAAE (500 mg/kg) after 14 days of treatment through visualizedre-epithelialization areas. PASstaining also revealed the presence of gastric mucus and the arrangement of intact glands in the groups treated with pantoprazole or SAAE. The secretory activity is evidenced by the intense tone of pink (figure 7).

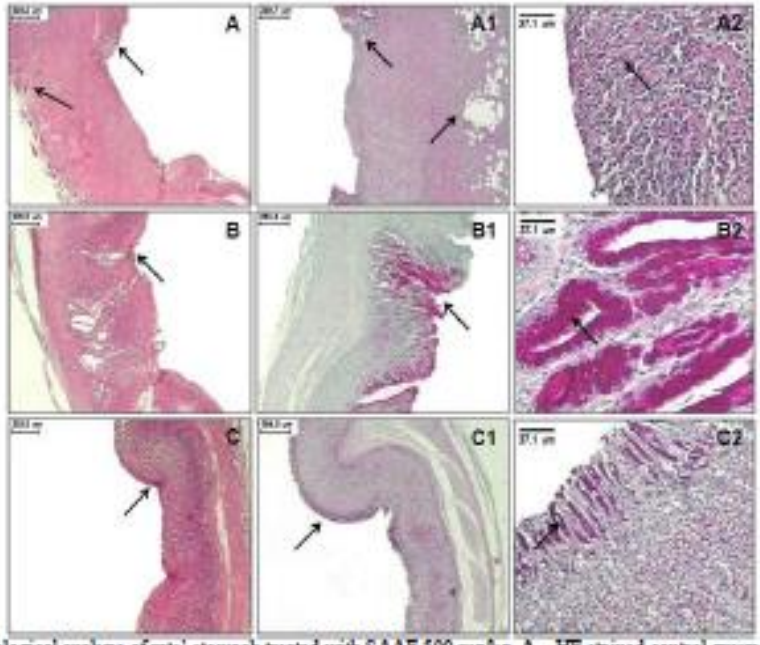

Figure 7: Histological analyze of rats' stomach treated with SAAE 500 mg/kg. **A** – HE stained control group (10x increased) showing destruction ofepithelial, mucosaand submucosa layers (arrows). **A1** e **A2** – PAS stained control with total destruction of the mucosa glandular layer (arrows) (10x increased) and abundantinflammatory infiltrate (arrows) (400x increased), respectively. **B** – HE stained pantoprazole group (10x increased) showing re-epithelialization areas (arrows). **B1** e **B2** – PAS stained pantoprazole with re-epithelialization areas and glandular scretory activity (arrows) (10x and 400x increased, respectively). **C** – HE stained SAAE 500 mg/kg group (10x increased) with re-epithelialization areas (arrows). **C1** e **C2** - PAS stained SAAE 500 mg/kg with re-epithelialization areas and glandular secretory activity (arrows) (10x and 400x increased, respectively).

3.4.2 Immunohistochemical analysis:

The gastric tissues obtained in the acetic acid-induced gastric ulcer model were used for immunohistochemical localization of PCNA antibody. The PCNA-positive nuclei are marked by reaction with the color brown. The animals treated with the SAAEshowedintenseimmunoreactivitytoPCNA(>75%) when compared tocontrol. The reaction was similarto pantoprazole. Thecontrolsampleshowedintenselymphocytic infiltrateand a weakimmunoreactivitytoPCNA(<50%) that was observed only in theremainingepithelial cells nuclei in the layer adjacent to the ulcer (figure 8).

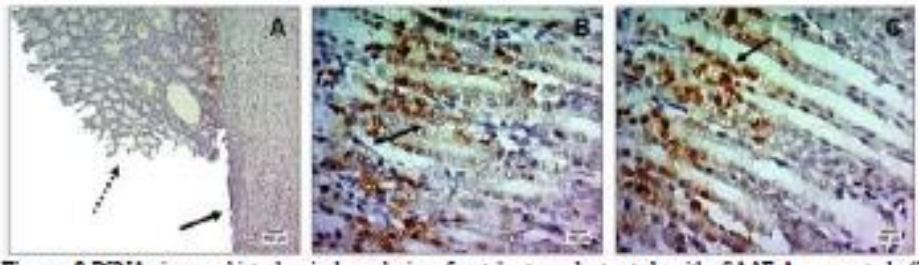

Figure 8:PCNA immunohistochemical analysis of rats' stomach treated with SAAE.**A** – control (200x increased): intenselymphocytic infiltrateand a weakimmunoreactivitytoPCNA(<50%) in theremainingepithelial cells nuclei (arrows); **B** – pantoprazole (500x increased): intense immunoreactivitytoPCNA(> 75%); **C** – SAAE 500 mg/kg (500x increased): intense immunoreactivitytoPCNA(> 75%).

4. DISCUSSION

Several plants extracts have been established as antiulcerogenics. However, this was the first study that investigated the gastroprotective properties of the aqueous extract of *Simaroubaamara* stem bark (SAAE) and verified its antiulcerogenic action.

The HPLC analysis quantified the main metabolites observed in the preliminar phytochemical screening and the catechins were the major components quantified in the extractive solution. Complementary phytochemical data were provided in this study as the presences of hydrolysable and condensed tannins and chlorogenic acid derivate (caffeic acid). According to Kushimoet al.[18], phenolic compounds, which include the above cited, are apparently related to the interesting anti-inflammatory, wound healing, antioxidant and antiulcerogenic properties.

Plants rich in tannins have been traditionally used for their medicinal effects and several studies have demonstrated their anti-ulcer effects[19]. Studies showed that many tannins act as radical scavengers, intercepting active free radicals[20]and probably the SAAE would exert itsgastroprotectiveeffect due to tannins antioxidant actions[21].

The treatment with SAAE wasable toprevent gastric mucosa injury induced by70% ethanol andindomethacinas well as accelerated the healing processin the chroniculcer. Necroticagentssuch as ethanolinjuredgastricmucosathrough of mechanisms that involve blood stasis, formation of freeradicals, lipid peroxidation, prostaglandins synthesisinhibition with consequent decreasein mucus production[22].

Khamoufet al[23]analyzed the gastroprotective effectsofacetone extract of *Quercussuber*and *Quercuscoccifera* and their purified tanninsonethanol-inducedgastric lesions in miceand rabbits. Bothextractsand the purifiedtanninsinhibitedgastric secretionand the stomach lesionsformation as well assignificantlyreduced lipidperoxidation inrabbits' brainhomogenate. The authors suggested that the gastroprotective effects were also related to their anti-lipoperoxidant properties.Murakamiet al.[24]showed that theellagicacidwas a potentcompetitive inhibitor ofK+-H+-ATPase pumpand actedby competingwith ATPhydrolysislocal, thussignificantly inhibited the HClsecretion.

The prostaglandins synthesis suppressioninduced byindomethacinincreased the susceptibilityofgastricmucosa lesions in the control group. All doses tested ofSAAEreducedmucosadamage, suggesting a possible involvement ofprostaglandins in the gastroprotectiveresponse. Mitjavilaetal.[25]showed that low doses oftannic acidadded torat dietwasalso able toincrease the amount of gastricmucus.

The chronic ulcer model induced by acetic acid is similar to human gastric ulcer not only by pathogenic characteristics but also by mechanisms and required time for healing[26]. The SAAE (500 mg/kg) was able to promote re-epithelialization and restore the glandular layer that had been destroyed by acetic acid administration. According to Vasconcelloset al.[27], the tannins precipitate microproteins at the peptic ulcer site forming a protective film which prevents the toxic substances absorption and the proteolytic enzymes action, promoting the healing natural process.

Besides this mechanism, our results showed that ulcer healing was also accelerated by increased proliferation of gastric cells in the SAAE treated animals viewed by PCNA intense immunoreactivity when compared to the control. PCNA is an auxiliary protein of *delta* and *ipsilon* polymerases involved in DNA replication and repair. It is used as a cell proliferation marker[28]. It is expressed in the G1 late phase and during S phase of the cellular cycle[29]. A significant decrease in the LDH levels in the SAAE treated animals was also suggestive of tissue repair, since increased serum levels of this enzyme are observed in cases of cell injury and death[30].

Other informationprovided bythis experimentalmodel wasrelated tosomatotoxicological parameters recordedduringtwo consecutiveweeks of treatment, such asbody mass gainand food and water intakes.The results showedthat theSAAEdid not compromisethese parameterswhen compared to control.

5. CONCLUSION

The SAAE showed significant gastroprotective effects in the ulcerogenic models induced in rats. It restored glandular secretory activity and probablyprevented the oxidative damage at the same time that increased regenerative and reparative capacities of the gastric mucosa.

Acknowledgments

The authors thank Drugs Technology Laboratory (UFPE) for technical assistance and Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe) for financial support.

REFERENCES

1. Zapata-Colindres JC, Zepeda-Gomez S, Montano-Loza A, Vazquez-Ballesteros E, Jesus-Villalobos J, Valdovinos-Andraca F. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease, *Can J Gastroenterol*, 2006; 20: 277-280.
2. Jain KS, Shah AK, Bariwal J, Shelke SM, Kale AP, Jagtap JR, Bhosale AV. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders,*BioorgMedChem*,2007; 15: 1181-1205.
3. Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?,*Physiol Rev*,2008; 88: 1547-1565.
4. Silva NCB, Esquibel MA, Alves IM, Velozo ES, Almeida MZ, Santos ES, Campos-Buzzi F, Meira AV, Cechinel-Filho V. Antinociceptiveeffectof*Abaremacochliacarpos* (B.A. Gomes) Barneby& J. W. Grimes (Mimosaceae),*Braz JPharm*,2009; 19: 46-50.
5. Espinal T, Sigifredo L. Arboles de Antioquia, Universidad Nacional de Colombia, Medellin, 1986;208-209.

6. Botsaris AS. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal,*J EthnobiolEthnopharmacol*, 2007;18: 1-8.
7. Bonté F, Barret P, Pinguet P, Dusser I, Dumas M, Meybec A. *Simarouba amara* extract increases human skin keratinocyte differentiation,*J Ethnopharmacol*, 1996; 53: 65-74.
8. O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Wright CW, Phillipson JD, Warhurst DC, Gupta MP, Correya M, Solis P. Plants as sources of antimalarial drugs, Part 6: Activities of *Simaroubaamara*fruits, *J Ethnopharmacol*, 1988;22: 183-190.
9. Polonsky J, Varon Z, Jacquemin H, Pettit GR. The isolation and structure of 13,18-dehydroglaucarubinone, a new antineoplastic quassinoid from *Simaroubaamara*,*Experientia*,1978;32: 1122-1123.
10. Grosvenor SNJ, Mascoll K, McLean S, Reynolds WS, Tinto WS. Tirucallane, Apotirucallane, and OctanorapotirucallaneTriterpenes of *Simaroubaamara*,*J Nat Prod*, 2006;69:1315-1318.
11. Coimbra R. Manual de Fitoterapia, Cejup, Belem, 1994;22-23.
12. Wagner H, Bladt S. Plant Drug analysis, second edition, Springer, New York, 1996;30-40.
13. Robert A, NezamisJE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury,*Gastroenterol*,1979;77: 433-443.
14. DjahanguriB. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat,*Scand JGastroenterol*, 1969; 4: 265-267.
15. Vela SM, Souccar C, Lima-Landman MT, Lapa AJ. Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Starchytarpheta cayennensis*, *Planta Medica*, 1997; 63: 36-39.
16. Takagi K, Okabe S, Saziki R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effects of several drugs on its healing,*Jap J Pharmacol*, 1969;19: 418-426.
17. Caldas GF, Oliveira AR, Araújo AV, Quixabeira DC, Silva-Neto Jda C,Costa-Silva JH,de Menezes IR,Ferreira F,Leite AC,da Costa JG,Wanderley AG.Gastroprotectiveandulcerhealingeffectsofessent ialoilof*Hyptismartiusii*Benth. (Lamiaceae). PlosOne, 2014; 9(1): e84400.
18. Kushima H, Nishijima CM, Rodrigues CM, Rinaldo D, Sassa MF, Baesb TM, Di Stasi LC, Carlos IZ, Souza Brito ARM, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. *Davillaellipica* and *Davillanitida*: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti - *Helicobacter pylori* action, *J Ethnopharmacol*, 2009; 123: 430-438.
19. Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms,*Int J MolSci*, 2012; 13: 3203-3228.
20. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA. Farmacognosia da Planta ao Medicamento, fifthedition, UFRGS, Porto Alegre,2004;615-630.
21. Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants, *Phytochemistry*, 2005;66: 2012-2031.
22. Andreo MA, Ballesteros KVR, Hiruma-Lima CA, Rocha LRM, Souza Brito ARM, Vilegas W. Effect of *Mouriripusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydrylscompouds and nitric oxide in gastroprotection, *J Ethnopharmacol*, 2006;107: 431-441.
23. Khennouf S, Benabdallah H, Gharzouli K, Amira S, Ito H, Kim T, Yoshida T, Gharzouli A. Effect of tannins from *Quercussuber* and *Quercuscocciifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice,*J AgricFood Chem*,2003; 51: 1469-1473.
24. Murakami S, Isobe Y, Kijima H, Nagai H, Muramatu M, Otomo S. Inhibition of gastric H^+,K^+-ATPase and acid secretion by ellagic acid,*PlantaMedica*, 1991; 57: 305-308.
25. Mitjavila S, Lacombe C, Carrera G, Derache R. Tannic Acid and Oxidized Tannic Acid on the Functional State of Rat Intestinal Epithelium,*J Nut*, 1977;107: 2113-2121.
26. Okabe S, Amagase K. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research,*Biol Pharm Bull*, 2005;28: 1321-1341.
27. Vasconcelos PCP, Kushima H, Andreo M, Hiruma-Lima CA, Vilegas W, Takahira RK,Pellizon CH. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriripusa* treatment in acetic acid ulcer model,*J Ethnopharmacol*, 2008; 115: 293-301.
28. Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. Manual de immohistoquimica, Sociedade Brasileira de Patologia, São Paulo, 1999; 1-9.
29. Arisawa EAL, Moraes E, Rocha RF, Almeida JD. Biologicalmarkers: PCNA and Ki-67,*Revista da Faculdade de Odontologia*, 1999; 2: 54-60.
30. Motta VT. Bioquimica clinica para o laboratorio, fourthedition, Medica Missau, São Paulo, 2003;121-122.