



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANDRÉ MENDONÇA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO
GASTROPROTETORA DO EXTRATO METANÓLICO
DAS CASCAS DO CAULE DE *Parahancornia amapa*
(APOCYNACEAE)

MACAPÁ

2013

ANDRÉ MENDONÇA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO
GASTROPROTETORA DO EXTRATO METANÓLICO
DAS CASCAS DO CAULE DE *Parahancornia amapa*
(APOCYNACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde (Área de Concentração: Ensaios Biológicos).

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Azevedo Nascimento

MACAPÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.321
S237a

Santos, André Mendonça dos.

Avaliação da atividade antimicrobiana e investigação do mecanismo de ação gastroprotetora do extrato metanoico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (HUBER) (DUCKE) (APOCYNACEAE) / André Mendonça dos Santos -- Macapá, 2013.
50 f.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Alessandra Azevedo Nascimento

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Apocynaceae. 2. Extratos vegetais. 3. Plantas medicinais – Análise. I. Nascimento, Alessandra Azevedo, oriet. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

ANDRÉ MENDONÇA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO
GASTROPROTETORA DO EXTRATO METANÓLICO
DAS CASCAS DO CAULE DE *Parahancornia amapa*
(APOCYNACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde (Área de Concentração: Ensaios Biológicos).

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alessandra Azevedo Nascimento – UNIFAP
(Presidente)

Prof. Dr. Marcos Tavares Dias – EMBRAPA
(Membro)

Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida – UNIFAP
(Membro)

Profa. Dra. Silvia Maria Mathes Faustino – UNIFAP
(Membro)

MACAPÁ

2013

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Alessandra Azevedo, pelo incentivo, por acreditar na minha capacidade, pela paciência e dedicação constante, principalmente nos momentos difíceis, e por todos os ensinamentos transmitidos;

A Deus, por tudo que tem me concedido;

Aos meus pais, Antonio e Socorro, por sempre estarem ao meu lado, me encorajando e me dando força acima de tudo;

Aos meus colegas e amigos da turma 2011 do PPGCS/UNIFAP, pela companhia e pelos bons momentos;

À Natália Castelo, que me acompanha desde os tempos da graduação em Biomedicina e continua sendo, até hoje, uma grande amiga;

Aos colegas do grupo de pesquisa do LEA, pela ajuda nas práticas laboratoriais;

À UNIFAP, pela oportunidade oferecida, em ser aluno do mestrado;

Aos membros da banca examinadora, que aceitaram o convite para avaliar e colaborar com esta pesquisa;

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

RESUMO

Parahancornia amapa (Huber) Ducke (Apocynaceae) é uma espécie vegetal, popularmente conhecida como “amapa” ou “amapazeiro”, utilizada na medicina tradicional de comunidades amazônicas para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais. Considerando seu uso popular e, principalmente, que o extrato metanólico das cascas do caule de *P. amapa* (EMPA) apresentou efeitos protetores sobre a mucosa gástrica em estudos anteriores, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e as vias ou mecanismos de ação gastroprotetora do EMPA. Diferentes concentrações do extrato (51,2-1,6 µg/mL) foram testadas frente a cepas bacterianas e de fungos, utilizando a técnica de microdiluição, para avaliar sua influência sobre o crescimento microbiano. Ratos Wistar foram utilizados para avaliar o efeito da administração oral de EMPA (500 mg/kg) na secreção gástrica, utilizando o modelo de ligadura do piloro, e a participação do óxido nítrico no seu efeito gastroprotetor. O extrato, nas concentrações utilizadas não foi eficaz de inibir o crescimento das cepas testadas, demonstrando que faz-se necessário o uso de concentrações mais elevadas para do extrato para obtenção do efeito antimicrobiano. Os animais que receberam EMPA (v.o.) apresentaram redução significativa no volume do suco gástrico e na concentração de íons H⁺ (acidez total) semelhante aos tratados com a droga padrão (cimetidina), sugerindo importante efeito antissecretório do extrato.

Palavras-chave: Apocynaceae. *Parahancornia amapa*. Gastroproteção.

ABSTRACT

Parahancornia amapa (Huber) Ducke (Apocynaceae) is a plant species, popularly known as “amapa” or “amapazeiro”, used in the traditional medicine of Amazonian communities for the treatment of respiratory and gastrointestinal diseases. Considering its popular use, and especially that the methanol extract of the stem bark of *P. amapa* (EMPA) showed protective effects on the gastric mucosa in previous studies, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity and the pathways or mechanisms of the gastroprotective action of EMPA. Different concentrations of the extract (from 51.2 to 1.6 µg/mL) were tested against bacterial and fungal strains by microdilution to assess its influence on microbial growth. Wistar rats were used to evaluate the effect of oral administration of EMPA (500 mg/kg) on gastric secretion using the pylorus ligation model, and the involvement of nitric oxide in its gastroprotective effect. The extract, at the concentrations used, was not effective in inhibiting the growth of the strains tested, demonstrating that it is necessary to use higher concentrations to demonstrate antimicrobial effect. Animals that received EMPA (p.o.) showed significant reduction in the volume of gastric juice and concentration of H⁺ ions (total acidity) similar to those treated with the standard drug (cimetidine), suggesting an important antisecretory effect of the extract.

Keywords: Apocynaceae. *Parahancornia amapa*. Gastroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Parahancornia amapa</i> encontrada no Estado do Amapá, Brasil	16
Figura 2 – Anatomia fisiológica do estômago	19
Figura 3 – Lista de microrganismos utilizados nos ensaios microbiológicos	29
Figura 4 – <i>Rattus norvegicus</i>	30
Figura 5 – Obtenção do extrato metanólico das cascas do caule de <i>P. amapa</i> (EMPA)	32
Figura 6 – EMPA em pó e misturado ao veículo (solução alcóolica 10%)	36
Figura 7 – Placa com 96 poços demonstrando o crescimento microbiano após 24 horas de incubação a 37°C	37
Figura 8 – Volume da secreção gástrica (mL) de ratos Wistar submetidos a diferentes tratamentos	38
Figura 9 – Acidez livre (pH) da secreção gástrica de ratos Wistar submetidos a diferentes tratamentos	39
Figura 10 – Acidez total [H ⁺] de ratos Wistar submetidos a diferentes tratamentos	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da secreção ácida de ratos submetidos a diferentes tratamentos	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ANOVA	Análise de variância
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
CBX	Carbenoxolona
CCK	Colecistocinina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DAINE	Droga antiinflamatória não-esteroidal
DAP	Diâmetro a altura do peito
EMPA	Extrato metanólico das cascas do caule de <i>Parahancornia amapa</i>
GMPc	Guanosina 3',5' monofosfato cíclico
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IBP	Inibidor de bomba de prótons
i.p.	intraperitoneal
IC	Índice de cura
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
ILU	Índice de lesão ulcerativa
K ⁺ /H ⁺ -ATPase	Bomba de prótons
L-NAME	Cloridrato de N-omega-nitro-L-arginina metil éster
LACEN/AP	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá
LEA	Laboratório de Experimentação Animal
NOS _e	Sintase do óxido nítrico endotelial
NOS _i	Sintase do óxido nítrico induzível
NOS _n	Sintase do óxido nítrico neuronal
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. amapa</i>	<i>Parahancornia amapa</i>
PKG	Proteína quinase G
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGE ₃	Prostaglandina E ₃
SUS	Sistema Único de Saúde
T1	Lesão ulcerativa tipo 1

T2	Lesão ulcerativa tipo 2
T3	Lesão ulcerativa tipo 3
TGI	Trato Gastrointestinal
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
v.o.	via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	12
2.1 GERAIS	12
2.2 ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	13
3.2 <i>Parahancornia amapa</i> (HUBER) DUCKE (APOCYNACEAE)	16
3.3 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO ESTÔMAGO	18
3.4 ÚLCERAS PÉPTICAS	20
3.4.1 Etiologia	21
3.4.2 Epidemiologia	22
3.4.3 Fatores protetores da mucosa gástrica	23
3.4.4 Fatores agressores da mucosa gástrica	26
3.4.4.1 <i>Helicobacter pylori</i>	26
3.5 TERAPÊUTICA ATUAL	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 MATERIAL	28
4.1.1 Material botânico	28
4.1.2 Microrganismos	29
4.1.3 Meios de cultura	29
4.1.4 Animais	30
4.1.5 Drogas, reagentes, solventes e sais	30
4.1.6 Equipamentos	31
4.2 MÉTODOS	31
4.2.1 Obtenção do extrato metanólico de <i>P. amapa</i> (EMPA)	31
4.2.1.1 Secagem e pulverização	31
4.2.1.2 Maceração, filtração e concentração	31
4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	32
4.2.2.1 Preparação dos inóculos	32
4.2.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição	32
4.2.3 Avaliação da secreção ácida	33
4.2.4 Análise estatística	35

4.2.5 Considerações éticas.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 PROPRIEDADES FÍSICAS DO EMPA E RENDIMENTO.....	36
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EMPA.....	37
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EMPA SOBRE A SECREÇÃO ÁCIDA.....	38
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO.....	56

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais é uma prática comum no combate a problemas de saúde desde os primórdios da humanidade. A fitoterapia é uma forma de tratamento medicinal que vem recebendo bastante atenção nas últimas décadas. Desde 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incentiva os investimentos públicos para o estudo e desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais (YUNES et al., 2001; OLIVEIRA, 2008).

Segundo a OMS, estima-se que 80% das populações que vivem em países em desenvolvimento recorrem a medicina popular para o tratamento de diversas doenças. No Brasil, aproximadamente 85% da terapêutica empregada na medicina popular envolve o uso de plantas ou extratos vegetais (BRASIL, 2006). Porém, apenas 5-10% das quase 500.000 espécies vegetais existentes no planeta foram investigadas quanto à constituição química e possíveis atividades biológicas (LIMA et al., 2006).

As abordagens científicas sobre as plantas medicinais são múltiplas, sendo estas definidas, de acordo com a OMS, como “todo e qualquer vegetal que possua, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (CALIXTO, 2001). Em todo o Brasil, um vasto número de plantas são utilizadas na forma de extratos brutos, infusões ou emplastros com o objetivo de tratar infecções comuns (TOMAZZONI et al., 2006).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais é motivada por vários fatores, tais como a dificuldade econômica, que impede o acesso aos medicamentos produzidos pela indústria farmacêutica, assistência médica e farmacêutica precária e preferência por produtos de origem natural, por grande parte da população em geral (SILVEIRA et al., 2008). O conhecimento tradicional ou popular é o principal determinante para o uso de determinada espécie vegetal (MACIEL et al., 2002).

Todavia, a ausência de descrição de inúmeras espécies de plantas em códigos oficiais, como formulários e farmacopeias, ainda constitui um importante fator limitante para a ampla utilização terapêutica. Estudos científicos realizados ao longo do tempo demonstraram que a administração destes produtos pode causar prejuízos à saúde da população, desmistificando a crença de que aquilo que é natural não faz mal (EVANS, 2002).

A Amazônia, com suas 60.000 espécies vegetais, tem sido o centro das atenções mundiais em virtude da riqueza de sua biodiversidade, sendo berço da descoberta de importantes substâncias farmacologicamente ativas. Apesar do Brasil possuir a maior

diversidade vegetal do mundo, somente 8% das espécies foram utilizadas em pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies tiveram suas propriedades medicinais avaliadas (GUERRA et al., 2007).

Plantas e extratos vegetais representam fonte importante de substâncias ativadas que servirão como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos ou medicamentos feitos exclusivamente com eles, os chamados fitoterápicos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é considerado fitoterápico todo medicamento obtido exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais. Os fitoterápicos, como todos os demais medicamentos, deve, obrigatoriamente, oferecer garantia de qualidade, apresentar efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança no uso (SCHENLEL, et al. 2001).

No Brasil, os medicamentos fitoterápicos passam por processo de validação científica e, em seguida, são registrados e liberados pela ANVISA. Este processo é caracterizado pelo estudo da eficácia e dos riscos de seu uso, bem como a reprodutibilidade e constância da qualidade. Estas medidas visam garantir a comercialização, em todo o território nacional, de produtos atóxicos, com garantia de eficácia comprovada e rígido controle de qualidade (MALDANER, 2001).

Os fitoterápicos representam uma significativa parcela do mercado farmacêutico. Mundialmente, o setor movimenta cerca de 21,7 bilhões de dólares por ano. No Brasil, o valor estimado gira em torno de 160 milhões de dólares. Estes valores devem aumentar devido as vendas dos fitoterápicos que crescem cerca de 15% ao ano, contra 4% do setor de medicamentos sintéticos (CARVALHO et al., 2008).

O grande interesse em produtos naturais é explicado, em parte, pelo uso indiscriminado de antibióticos que tem selecionado microrganismos multirresistentes, havendo a necessidade de se buscar novas substâncias antimicrobianas. A atividade antimicrobiana é uma característica relevante no estudo de extratos vegetais, dada a importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem os seres humanos (COWAN, 1999). Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato considerado recente, a busca das mesmas recebeu maior importância após a descoberta da penicilina (LIMA, 2001).

O trato gastrointestinal (TGI) é um ambiente dinâmico que permite a entrada de nutrientes, impede a passagem de antígenos, toxinas e microrganismos e responde a agentes potencialmente prejudiciais através do processo de defesa da mucosa (WALLACE; DEVCHAND, 2005). O desequilíbrio entre os fatores agressores da mucosa e a habilidade da

mucosa em defender-se e curar-se ocasiona o surgimento de úlcera péptica (REPETTO; LLESUY, 2002; LU; GRAHAM, 2006).

Os fatores agressores incluem hábitos alimentares inadequados, consumo de bebidas alcoólicas, ingestão excessiva de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (DAINEs), elevada secreção de ácido clorídrico, pepsina, sais biliares, predisposição genética, estresse e infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*. A secreção ácida normal também é capaz de promover ulceração na mucosa sob determinadas condições (PECKENPAUGH, 1997; JAINU; DEVI, 2006; LAINE et al., 2008).

Úlcera péptica é uma área lesada encontrada na mucosa gástrica ou duodenal causada pela ação do suco gástrico. É uma doença crônica e recorrente, sendo o distúrbio gastrointestinal mais comum na prática clínica (BAFNA; BALARAMAN, 2004; GUYTON; HALL, 2006). Considerada uma nova epidemia do século XXI, é uma das doenças crônicas mais comuns em adultos, ocorre em 5% a 10% da população (O'MALLEY, 2003). Embora a chance de cura seja superior a 95%, a chance de reincidência está entre 65% a 80% até um ano após a cura e em torno de 100% até dois anos (FAN et al., 2005).

A úlcera gástrica é considerada um grande fator de morbi-mortalidade, com alto índice de morte em casos extremos, como em úlceras hemorrágicas promovidas pelo estresse, sendo responsável por altos custos com saúde (SONTAJ, 1997; SPIRT, 2004). No Estados Unidos, as estimativas de gastos com hospitalização, cuidados com pacientes e faltas ao trabalho somam mais de 5 bilhões de dólares por ano, excluindo os custos com medicamentos (WALLACE; DEVCHAND, 2005). Cerca de 4 milhões de pessoas foram diagnosticadas com úlceras pépticas, sendo que a cada ano, 350 mil novos casos são identificados, 100 mil pacientes são hospitalizados e, no mínimo, 3000 pessoas morrem em decorrência da doença (CRAWFORD, 2000). No Brasil, não existem números oficiais, mas de acordo com dados do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, calcula-se que 10% da população brasileira tem, teve ou terá úlcera péptica (EISIG; LAUDANNA, 2001).

Parahancornia amapa (Huber) Ducke é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada por comunidades tradicionais que habitam a região amazônica brasileira. Considerada endêmica no Estado do Amapá, é popularmente conhecida como “amapa”, “amapazeiro” ou “mapá”. Seu látex, denominado “leite de amapa” é empregado no tratamento de cicatrizes e hematomas na forma de emplastro, sendo também consumido misturado com mel de abelha (em partes iguais) para tratamento de doenças respiratórias, tais como asma e bronquite e fraqueza física. O látex é utilizado por comunidades quilombolas para o

tratamento de distúrbios gastrointestinais. Tanto as cascas quanto as demais partes desta planta são conhecidas por seu potencial cicatrizante, analgésico, anti-inflamatório (VAN DEN BERG, 1982; MONTELES; PINHEIRO, 2007; OLIVEIRA, 2008).

Apesar do uso bem estabelecido na medicina popular, a escassez de estudos científicos (toxicológicos, farmacológicos, etc.) sobre a *P. amapa* dificulta a administração eficaz e segura. Toda e qualquer substância pode se tornar um agente tóxico, dependendo do tempo e frequência de exposição, bem como das vias pelas quais é administrada (OGA, 2003).

Estudos recentes em roedores revelaram que o extrato metanólico das cascas do caule de *P. amapa* (EMPA) possui baixa toxicidade aguda e significativa atividade gastroprotetora (antiulcerogênica) dose-dependente em diferentes modelos de indução de lesões gástricas, tais como indução por etanol acidificado, indometacina, estresse e úlcera crônica por ácido acético, o que reforça a indicação popular. Apesar disso, as vias ou mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção proporcionada por este extrato permanecem desconhecidos (SILVA, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico das cascas do caule de *P. amapa* (EMPA) e investigar os mecanismos de ação envolvidos na ação gastroprotetora do extrato em ratos Wistar.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar qualitativamente a ação antimicrobiana *in vitro* do EMPA frente a diferentes microrganismos (bactérias e fungos);
- Avaliar a atividade antissecretória *in vivo* do EMPA utilizando o modelo de ligadura de piloro;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Durante séculos os produtos naturais foram amplamente empregados no tratamento, cura e/ou prevenção de doenças. As plantas medicinais recebem destaque nessa categoria desde os primórdios da humanidade. Os primeiros registros históricos datam de 5.000 anos atrás descrevendo a utilização do louro e o tomilho pelos sumérios (BIAZZI, 2004). O primeiro tratado médico aceito e respeitado pela comunidade científica, que inclui o uso de plantas medicinais, é de aproximadamente 1.500 a.C., um papiro decifrado pelo egiptólogo alemão Georg Ebers em 1873 (CUNHA, 2003).

No século XIX, esta prática foi suplantada pela medicina químico-experimental. A partir da segunda metade do século XX, um novo enfoque surgiu: a química das plantas. Inúmeras espécies têm sido fonte imensurável de novos fármacos ou protótipos experimentalmente comprovados e seguros para o uso humano e veterinário (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; VIEGAS JR et al., 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Nas últimas décadas, a fitoterapia recebeu grande impulso, a despeito do crescimento da indústria farmacêutica, influenciada por fatores como o crescente custo dos medicamentos sintéticos, efeitos colaterais destes remédios, ampla divulgação dos ideais naturalistas, dentre outros. Ao mesmo tempo, o oneroso custo para a síntese de fármacos inovadores e o sucesso de vendas de alguns fitoterápicos e fitofármacos despertaram o interesse da indústria farmacêutica em pesquisar e desenvolver novos medicamentos a partir de drogas vegetais (MARQUES, 2001; BALUNAS, KINGHORN, 2005; SANTOS et al., 2007).

A literatura indica três principais formas de seleção de espécies vegetais para estudos científicos. A primeira é a abordagem randômica, baseada na disponibilidade da planta. A segunda é feita levando em consideração a ocorrência de metabólitos secundários pré-determinados em dado gênero ou espécie (abordagem quimiotaxonômica ou filogenética). E a terceira é a abordagem etnofarmacológica, pautada em informações cedidas por uma determinada população, sendo considerada mais eficaz haja vista que o histórico da planta e sua eficácia no tratamento de alguma doença, relatada pelos usuários, contribuem para economia de tempo e recursos financeiros empregados na busca por matéria-prima para novos medicamentos (MACIEL et al., 2002). Grande parte das drogas derivadas de plantas foram descobertas através da investigação das curas tradicionais e conhecimentos populares (GILANI, 2005).

Cerca de 25% dos medicamentos prescritos durante a prática clínica foram identificados, inicialmente, em plantas superiores. Aproximadamente 70% dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer e os antibióticos foram produzidos a partir de moléculas oriundas ou derivados de compostos naturais (BIGHETTI et al., 2005; McCHESNEY et al., 2007).

As plantas medicinais fornecem substrato para a produção de compostos biologicamente ativos ou compostos passíveis de modificações e otimizações estruturais que dão origem às entidades químicas. Considerando os diversos metabólitos secundários presentes nas plantas, as principais categorias de medicamentos derivados de plantas são os terpenoides, glicosídeos, alcaloides e flavonoides (LAPA et al., 2001).

O sucesso da fitoterapia depende de vários aspectos, dentre eles, destacam-se a qualidade das plantas utilizadas e a garantia de atendimento constante da demanda. É indispensável o controle rigoroso desde o cultivo, coleta, armazenamento e pré-tratamento do material vegetal, assim como dos procedimentos de extração, padronização e acondicionamento (BRASIL, 2006).

De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor de Fitoterápicos, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA) - considerada a principal associação nacional do setor - o mercado brasileiro de fitoterápicos é dimensionado a partir de um faturamento de aproximadamente R\$ 660,5 milhões, em 2007, com 37,3 milhões de unidades vendidas, correspondendo a cerca de 3% do mercado farmacêutico (ABIFISA, 2009).

No Brasil, políticas nacionais foram criadas para padronizar e regulamentar a produção de fitoterápicos, com o objetivo de garantir a qualidade adequada destes produtos, bem como sua disponibilidade e utilização por parte da população que não possui acesso aos tratamentos de saúde convencionais. A Resolução nº. 48, de 16 de março de 2004 (Brasil, 2004), dispõe sobre o registro de fitoterápicos, enquanto o Decreto nº. 5813, de 22 de junho de 2006 (Brasil, 2006), institui a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que incentiva a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico com base na biodiversidade brasileira. Em 2010, a ANVISA publicou a Resolução nº. 10, de 10 de março, com o objetivo de regulamentar a notificação de drogas vegetais, que poderão ter alegações terapêuticas baseadas no uso tradicional. O documento apresenta uma lista de 66 espécies vegetais selecionadas com base no uso popular. Para cada espécie foram padronizadas indicações terapêuticas, forma de uso, quantidade a ser administrada e os cuidados e restrições a serem observados antes do uso (BRASIL, 2010).

Os efeitos colaterais desencadeados pelos fármacos antiulcerogênicos atuais é um dos fatores que estimulam o crescente interesse em terapias alternativas como a utilização de produtos naturais, principalmente os derivados de plantas (RATES, 2001; SCHMEDA-HIRSCHMANN; YESILADA, 2005). Vários compostos isolados a partir de plantas medicinais apresentam atividade gastroprotetora, o que incentiva pesquisas que buscam a descoberta de novas terapias para o tratamento das úlceras pépticas (HIRUMA-LIMA et al., 2006). A maioria dos fármacos derivados de plantas reduz os fatores agressores da mucosa gástrica e é segura, clinicamente eficaz, mais tolerável para o paciente, relativamente barata e globalmente competitiva (GOEL; SAIRAM, 2002).

3.2 *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae)

A família Apocynaceae apresenta cerca de 3700 espécies, distribuídas entre aproximadamente 335 gêneros, que podem ser encontradas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, foram catalogadas mais de 400 espécies e 41 gêneros de apocináceas, sendo 32 apenas na Amazônia (SALES, 1993). Espécies pertencentes a esta família são conhecidas como bioprodutoras de alcaloides, terpenoides, iridoides e, com menor frequência, flavonoides glicosilados (VANDERLEI et al., 1991; BARRETO et al., 1998; CARVALHAES et al., 2002).

Dentro desta família, destaca-se a espécie *Parahancornia amapa*, uma árvore frutífera endêmica no Estado do Amapá, localizado na região amazônica, e popularmente conhecida como “amapa” ou “amapazeiro” (Figura 1). Distribuída em planaltos e florestas inundadas da Amazônia, é considerada de grande porte, podendo atingir entre 40 e 50 metros de altura, e seus frutos (grandes e comestíveis) servem de alimento para espécies de macacos que habitam as copas das árvores (MORAIS et al., 1995).

Figura 1 – *Parahancornia amapa* encontrada no Estado do Amapá, Brasil.



Fonte: SILVA, 2012.

Os frutos de *P. amapa* são globosos e carnudos, apresentando polpa comestível (sabor doce) e numerosas sementes achatadas. Estes apresentam cerca de 8 cm de diâmetro, espessura entre 1 cm e 1,5 cm e pericarpo roxo-escuro quando maduros. A madeira desta espécie é utilizada na construção civil e marcenaria, enquanto, o látex é empregado na produção de celulose e papel (LOUREIRO; SILVA, 1968; CAVALCANTE, 1996).

Comunidades locais utilizam o látex (Figura 2), conhecido como “leite do amapá”, para diversas finalidades: (a) tratamento de cicatrizes e hematomas (emplastro); (b) combate a problemas respiratórios como asma e bronquite (misturado com mel-de-abelha); (c) diminuição da fraqueza física; (d) tratamento de distúrbios gastrointestinais; (e) tônico; (f) anti-sífilis, entre outras (VAN DEN BERG, 1982; MONTELES; PINHEIRO, 2007; OLIVEIRA, 2008).

Estudos fitoquímicos realizados com a *P. amapa* revelaram a presença de vários compostos (metabólitos secundários) que podem ser encontrados em diversas partes da planta, como raízes, cascas e látex. Das raízes, foram isolados e identificados 19 ésteres (conhecidos e novos) 3b-*O*-acil lupeóis, esteroides b-sitosterol, stigmasterol e b-sitosterona, triterpenos b-

amirina, a-amirina, lupeol e seus derivados (CARVALHO et al., 2001). Das cascas, substâncias como os triterpenos pentacíclicos lupeol, β -amirina e α -amirina, seus derivados acetilados, ácidos alifáticos e outros ésteres 3-O-acil-lupeol foram observadas (SOBRINHO et al., 1991). Do látex, foram obtidas misturas de 3-O-acillupeol e triterpenos, além de metilmioinositol e derivados de feniletanoides, tendo como principal constituinte o cornosídeo (CARVALHO et al., 2008).

Experimentos realizados por Silva (2012) demonstraram a atividade farmacológica *in vivo* de extratos de *P. amapa*, o que contribui para a validação das informações etnofarmacológicas desta espécie. O EMPA foi atóxico frente às larvas de *Artemia salina*; e não apresentou efeito tóxico agudo frente a análises (comportamental, evolução ponderal, consumo de água e ração, morfologia e histologia de órgãos vitais, e parâmetros bioquímicos e hematológicos) realizadas em roedores. O EMPA apresentou atividade gastroprotetora de maneira dose-dependente em diferentes modelos de indução de lesões gástricas (etanol acidificado, etanol absoluto, indometacina, estresse e ácido acético) confirmando sua indicação popular. Independentemente do estímulo indutor, o EMPA foi capaz de prevenir lesões ulcerativas e demonstrou atividade cicatrizante em úlceras profundas no modelo de indução de úlcera crônica, apresentando resultados melhores que os controles positivos (lansoprazol e cimetidina).

Diante das informações anteriormente expostas e apesar da existência do uso tradicional desta planta, cuja constituição química ainda é pouco conhecida, estudos farmacológicos também são necessários para investigar e elucidar os mecanismos de ação de seus compostos e garantir, acima de tudo, sua segurança e eficácia enquanto medicamento. Além disso, a avaliação da atividade antimicrobiana de *P. amapa* constitui uma prática indispensável para a descoberta de novas substâncias capazes de combater agentes etiológicos de doenças comuns, como a diarreia, e outros problemas gastrointestinais de maior importância, como as úlceras peptídicas.

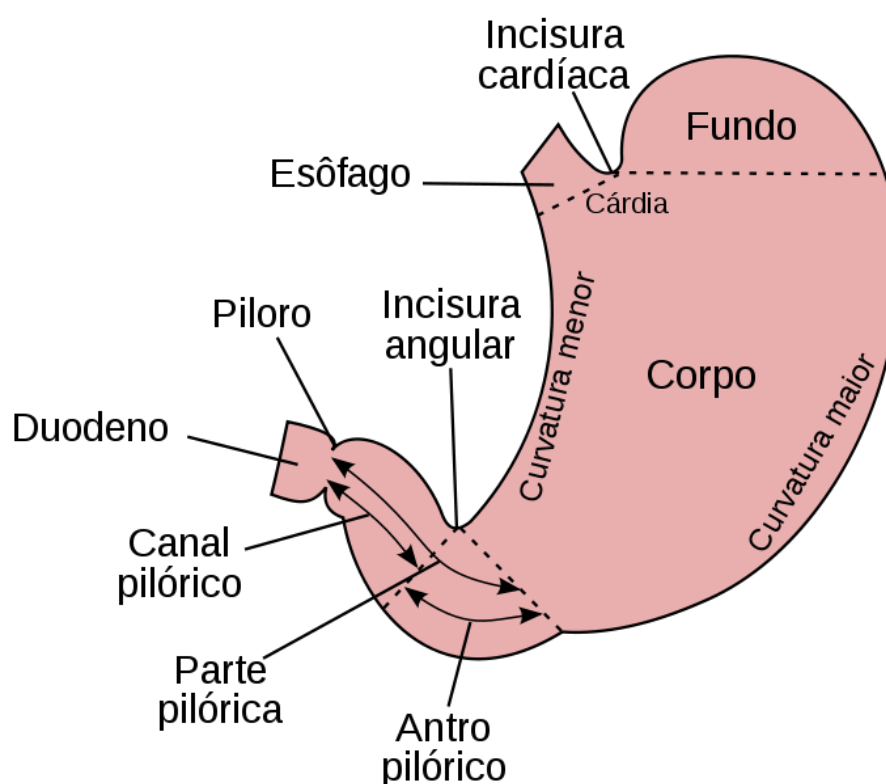
3.3 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO ESTÔMAGO

O trato alimentar abastece o corpo com um suprimento contínuo de água, eletrólitos e nutrientes. Isto requer (1) movimentação do alimento pelo trato alimentar; (2) secreção de soluções digestivas e digestão dos alimentos; (3) absorção de água, diversos eletrólitos e produtos da digestão; (4) circulação de sangue através dos órgãos gastrointestinais para

transporte das substâncias absorvidas; e (5) controle de todas essas funções pelos sistemas nervoso e hormonal locais (GUYTON; HALL, 2006).

O estômago é um órgão visceral, oco, com paredes estratificadas, e pode ser visto como uma dilatação do canal alimentar que se segue ao esôfago e é continuado pelo intestino delgado. Está situado logo abaixo do diafragma, com sua maior porção à esquerda do plano mediano. Apresenta dois orifícios: um, proximal, de comunicação com o esôfago, o óstio cárdico, e outro distal, o óstio pilórico, que se comunica com a porção inicial do intestino delgado denominado duodeno. Neste nível, ocorre uma condensação de feixes musculares longitudinais e circulares que constituem um mecanismo de abertura e fechamento do óstio pilórico para regular o trânsito do bolo alimentar na sua passagem do estômago para o duodeno. Este dispositivo é chamado piloro. Um dispositivo com função semelhante foi descrito para a junção esofagogastrica, no nível do óstio cárdico (DANGELO; FATTINI, 2007).

Figura 2 – Anatomia fisiológica do estômago.



Fonte: portalsaofrancisco.com.br.

A forma e a disposição do estômago variam de acordo com idade, tipo constitucional, tipo de alimentação, posição do indivíduo e estado fisiológico do órgão. As duas margens do estômago são denominadas curvatura maior, à esquerda, e curvatura menor, à direita. Descrevem-se no estômago as seguintes partes (Figura 2) (DANGELO; FATTINI, 2007):

- a) cárdia: corresponde à junção com o esôfago;
- b) fundo: situada superiormente a um plano horizontal que tangencia a junção esofagogástrica;
- c) corpo gástrico: corresponde à maior parte do órgão;
- d) parte pilórica: porção terminal, continuada pelo duodeno; a porção proximal da parte pilórica é denominada antro pilórico, à qual se segue uma porção mais estreitada, o canal pilórico, e finalmente o piloro, que corresponde à transição entre o estômago e o duodeno.

Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em 2 regiões glandulares: a mucosa oxíntica e a mucosa antral. A mucosa oxíntica é mais extensa, ocupando o corpo e o fundo, sendo o sítio de secreção de ácido clorídrico. É formada por glândulas oxínticas, constituídas por células parietais (ou oxínticas), células principais (ou pépticas), células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL). No colo glandular, existe grande quantidade de células produtoras de muco, que protege a mucosa gástrica da ação corrosiva das secreções produzidas pela glândula (LUCEY; YAMADA, 1989; CHUANG et al., 1991; SUNDLER et al., 1991). As glândulas da mucosa antral possuem os mesmos tipos celulares das glândulas oxínticas, exceto as células parietais (HOGBEN et al., 1974).

A inervação do estômago é composta por fibras extrínsecas e intrínsecas. A inervação intrínseca é formada por 2 plexos principais: o plexo mioentérico, que inerva as camadas musculares e regula a função motora; e o plexo submucoso, que inerva a mucosa e regula a absorção e as secreções gastrointestinais (SCHUBERT; SHAMBUK, 1990). Ambos os plexos apresentam neurônios que recebem aferências do sistema nervoso central através de fibras do sistema nervoso simpático e parassimpático, e de outros neurônios entéricos (neurônios sensoriais e interneurônios). Estes circuitos neuronais permitem a regulação de funções motoras e secretoras do tubo digestivo (COSTA, 1994).

3.4 ÚLCERAS PÉPTICAS

A úlcera é uma lesão encontrada na mucosa do trato digestivo, que se estende através do tecido da mucosa até a submucosa, podendo atingir camadas mais profundas, destruindo componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos. Embora as úlceras possam ocorrer em qualquer região do tubo gastrointestinal, as mais frequentes são as úlceras pépticas (gástricas e duodenais) (WALLACE; GRANGER, 1996; MILANI; CALABRO, 2001).

As úlceras surgem com maior frequência no duodeno, sendo que 90% estão localizadas a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago, as lesões se localizam, principalmente, no antro (60%) e na junção do antro com o corpo, na pequena curvatura (25%). A incidência é maior nos homens em relação às mulheres e, apesar de ocorrer em qualquer idade, a úlcera duodenal surge com maior frequência em pessoas na faixa dos 30-55 anos, enquanto a úlcera gástrica na faixa dos 50-70 anos (ABITBOL, 2005).

3.4.1 Etiologia

A úlcera péptica apresenta patogênese multifatorial (EASTWOOD, 1997; BIRDANE et al., 2007). As causas mais comuns de lesão celular ou tecidual são: (1) hipóxia e isquemia (diminuição de fluxo sanguíneo, hemoglobina ou enzimas antioxidantes); (2) agentes químicos (drogas sintéticas, etanol, etc.); (3) agentes biológicos como bactérias e fungos, que desencadeiam reações imunológicas, gerando radicais livres tóxicos; (4) fatores físicos (estresse, temperaturas extremas, força mecânica); e (5) defeitos genéticos (SZABO, 1991).

O desequilíbrio entre fatores protetores e agressores da mucosa gástrica é o responsável pelo surgimento de úlcera. Os fatores protetores incluem a barreira de muco, bicarbonato, óxido nítrico (NO), fluxo sanguíneo e prostaglandinas. Já os fatores agressores mais comuns são a secreção de ácido, pepsina e radicais livres. Estes últimos fatores originam-se a partir de estímulos endógenos e exógenos como a ingestão de álcool, drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINES), dieta inadequada, tabagismo e a presença local da bactéria *Helicobacter pylori* (BESERRA et al., 2011).

O termo gastrite, literalmente, significa inflamação do estômago, podendo referir-se à gastrite aguda ou crônica, doenças distintas entre si. A gastrite aguda é, normalmente, erosiva, sendo causada por dano tóxico a mucosa do estômago, decorrente da ingestão de álcool ou DAINES. Já a gastrite crônica está associada a evolução da infecção por *H. pylori*, facilitada

pelo estresse que proporciona aumento da produção de ácido gástrico, levando ao surgimento de úlcera péptica. A característica assintomática da infecção favorece o desenvolvimento da inflamação crônica. Outro tipo de gastrite crônica é provocada por refluxo duodenal, caracterizado pelo aparecimento de dor abdominal e vômito contendo bile (LEE et al., 1995; LIPOF et al., 2006).

Durante o processo patológico, ocorre perda circunscrita de tecido da mucosa gástrica, causando lesões crônicas, geralmente recidivantes, diagnosticadas com maior frequência em adultos com meia-idade ou mais velhos, embora também sejam encontradas em indivíduos no início da idade adulta (CALAM; BARON, 2001; WALLACE, 2008; TOLEDO DIAS et al., 2009).

3.4.2 Epidemiologia

No mundo, a incidência de úlcera péptica por ano é estimada em 1.500 a 3.000 a cada 100.000 habitantes. Na Europa, as úlceras pépticas são consideradas responsáveis por cerca de 25.000 mortes por ano (D'ACAMPORA et al., 2008). Nos Estados Unidos, cerca de 4 milhões de indivíduos apresentam úlceras pépticas e, a cada ano, mais 350.000 novos casos são identificados. Aproximadamente 100.000 pessoas são hospitalizadas anualmente, sendo que 3.000 morrem devido a complicações decorrentes das úlceras (COTRAN, 1999). Complicações graves tais como quadros hemorrágicos, perfurações e obstruções gástricas (1 a 6% dos pacientes) que necessitam de intervenção cirúrgica imediata constituem um dos principais riscos desta doença (D'ACAMPORA et al., 2008).

O uso de DAINES e a *H. pylori* são considerados os maiores responsáveis pelo aparecimento de úlceras. Os DAINES aparecem nas listas dos medicamentos mais prescritos no mundo. Na Europa, estima-se que esta classe de medicamentos represente mais de 7% de todas as prescrições médicas. Em 2004, apenas nos Estados Unidos, mais de 110 milhões de prescrições foram registradas (SOSTRES et al., 2010).

Os efeitos adversos relacionados a estas drogas são comuns e afetam, principalmente, o trato gastrointestinal (TGI), provocando a formação de úlceras, hemorragia e obstrução do TGI. Tais problemas afligem cerca de 5% dos pacientes durante o primeiro ano de uso, sendo que o risco de desenvolvimento de complicações mais sérias é 4-5 vezes maior entre usuários de DAINES do que entre não-usuários. Um histórico prévio de distúrbios gástricos e a idade avançada constituem os principais fatores de risco associados ao uso de DAINES (SOSTRES et al., 2010).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a diminuição na incidência de *H. pylori* apresenta relação com a prevalência de úlcera péptica em países desenvolvidos. A erradicação desta bactéria, mesmo não associada a outras medidas, se mostra eficaz no combate a úlceras gástricas e duodenais. Apesar da infecção por *H. pylori* e o uso de DAINes representarem fatores de risco independentes para o aparecimento de úlceras, ambos podem atuar de forma sinérgica, contribuindo para o surgimento de distúrbios gástricos. No estômago, a presença deste microrganismo potencializa o processo hemorrágico induzido por baixas doses de aspirina. Estes dois fatores, juntos, são considerados os responsáveis por cerca de 90% dos casos de doença ulcerosa (YUAN et al., 2006).

3.4.3 Fatores protetores da mucosa gástrica

O processo conhecido como defesa da mucosa engloba vários fatores e componentes que permitem a mucosa permanecer intacta apesar da frequente exposição à substâncias com grande variação de temperatura, pH e osmolaridade, assim como aquelas com ações detergentes ou citotóxicas, e produtos bacterianos capazes de causar reações inflamatórias locais e/ou sistêmicas (WALLACE; GRANGER, 1996; BRZOZOWSKI et al., 2005).

O ácido gástrico é considerado uma linha de defesa da mucosa que reveste o estômago, reduzindo a possibilidade de colonização bacteriana. O epitélio localizado abaixo do muco é capaz de se regenerar rapidamente caso sofra alguma agressão. A difusão de ácidos e toxinas para a mucosa gástrica resulta no aumento do fluxo sanguíneo, que é essencial para limitar os danos e facilitar o processo de reparação celular. O fluxo sanguíneo contribui para a proteção da mucosa através do fornecimento de oxigênio, bicarbonato e nutrientes, da remoção de dióxido de carbono, íons de hidrogênio e difusão de agentes tóxicos presentes no lúmen gástrico (ALLEN et al., 1980; WALLACE; GRANGER, 1996). O sistema imunológico também age como linha de defesa através de várias “células de alarme”, como mastócitos e macrófagos, capazes de reconhecer a presença de invasores na mucosa gástrica e induzir repostas inflamatórias apropriadas (ALICAN et al., 1996).

Este processo de defesa inclui mecanismos locais e neuro-hormonais. Os mecanismos locais mais importantes incluem: a barreira muco-bicarbonato-fosfolipídeos, as células epiteliais de superfície e sua rápida capacidade de regeneração, o fluxo alcalino, a síntese contínua de prostaglandinas E_2 e I_2 (PGE_2 e PGI_2), a microcirculação da mucosa e a liberação de óxido nítrico e compostos sulfidrílicos (PAULA, 2003; BRZOZOWSKI et al., 2005; LAINE et al., 2008). A regulação neuro-hormonal ocorre através de mediadores como a

acetilcolina (ACh), liberada pelo nervo vago, a histamina, liberada pelas células *enterochromaffin-like* (ECL) e a gastrina, liberada pelas células G (AIHARA et al., 2003).

A barreira composta por muco, bicarbonato e fosfolipídeos surfactantes constitui a primeira linha de defesa da mucosa (ALLEN & FLEMSTRÖM, 2005). O muco é produzido por células epiteliais secretoras de muco e células mucosas do colo. Seus principais constituintes são glicoproteínas, mucinas e água. Sua secreção é estimulada por hormônios gastrointestinais (gastrina e secretina), PGI_2 e agentes colinérgicos (MONTROSE et al., 2006; PHILLIPSON et al., 2008). É capaz de reter o bicarbonato secretado por células epiteliais, garantindo pH neutro na superfície das células, o que previne a penetração de pepsina e a proteólise do epitélio (TARNAWSKI et al., 2001; VALCHEVA-KUZMANOVA et al., 2005).

O muco atua como lubrificante para reduzir os danos físicos causados por materiais ingeridos e dificulta o acesso de bactérias ao epitélio. Sua superfície é coberta por uma película de fosfolipídeos surfactantes com fortes propriedades hidrofóbicas, constituindo a única barreira pré-epitelial entre o lúmen e o epitélio. Quando esta barreira é rompida, outros mecanismos protetores entram em ação, incluindo a neutralização intracelular de ácido, rápido reparo epitelial e manutenção e distribuição de fluxo sanguíneo local (BELLEY et al., 1999; LAINE et al., 2008; WALLACE, 2008). Substâncias ulcerogênicas são capazes de dissipar o muco, levando a re-difusão de ácido e, conseqüentemente, dano a mucosa (DARLING et al., 2004).

Células epiteliais de superfície secretam muco e bicarbonato, e produzem prostaglandinas e proteínas *heat-shock*. São hidrofóbicas e capazes de repelir agentes danosos solúveis em ácido ou água devido à presença de fosfolipídeos. Estas células sofrem renovação contínua e formam uma barreira que previne a re-difusão de ácido e pepsina (TARNAWSKI, A., 1998; ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005).

O fluxo alcalino ocorre através das células parietais que secretam ácido clorídrico no lúmen gástrico e, simultaneamente, bicarbonato no interstício e lúmen dos capilares sanguíneos adjacentes. O bicarbonato é transportado para a base das células epiteliais de superfície e para o lúmen, contribuindo para a manutenção da camada muco-bicarbonato (LAINE et al., 2008).

As prostaglandinas, como PGE_2 e PGI_2 , inibem a secreção ácida, estimulam a produção de muco e bicarbonato, aumentam o fluxo sanguíneo e os componentes sulfidrílicos, e aceleram a restituição epitelial (cicatrização) da mucosa (BRZOZOWSKI et al., 2005).

Quando aplicadas exogenamente, previnem danos a mucosa gástrica induzidos por diferentes agentes, como etanol e ácido clorídrico (ROBERT et al., 1979).

A microcirculação da mucosa é imprescindível para o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes, assim como a remoção de substâncias tóxicas. O aumento do fluxo sanguíneo permite remover ou diluir o retorno do ácido gástrico em casos de re-difusão de ácido ou quando a mucosa é exposta a agentes irritantes. Observa-se necrose hemorrágica quando o fluxo sanguíneo da mucosa é interrompido de forma mecânica (LAINE et al., 2008).

O óxido nítrico (NO) é responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo na região da mucosa em resposta à secreção ácida, modulando a microcirculação. Esse mediador é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina e sua produção envolve a ação das sintases do NO, para as quais foram descritas 3 isoformas: 2 constitutivas, a endotelial (NOS_e) e a neuronal (NOS_n), e 1 induzível (NOS_i). No TGI, as isoformas mais importantes são NOS_e e NOS_n. A atividade dessas sintases é regulada por alterações nas concentrações de Ca²⁺ intracelular, que se liga à calmodulina, formando um complexo que ativa as enzimas. O NO liberado ativa a guanilato ciclase solúvel que, conseqüentemente, leva à formação de guanosina 3',5' monofosfato cíclico (GMPc); o GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que através da fosforilação de diversos alvos desencadeia a vasodilatação. NO endógeno ou exógeno protege a mucosa gástrica de lesão por etanol, enquanto a inibição de NO sintase, que provoca queda na síntese de NO, aumenta os danos à mucosa gástrica (KANWAR et al., 1994; TARNAWSKI, 1998; PESKAR, 2001; HOLZER, 2006; TADIC et al., 2008).

Os compostos sulfidrílicos estimulam a formação de muco, participam da síntese de proteínas e ligam-se a espécies reativas de oxigênio (radicais livres). Danos teciduais ocasionados pela ingestão de etanol geram radicais livres que são capazes de neutralizar compostos SH, o que diminui concentração dessas substâncias na região da mucosa (SALIM, 1992; REYES-TREJO et al., 2008).

O sistema nervoso central e fatores hormonais também regulam a defesa da mucosa gástrica. A ACh é um agonista seletivo de receptores muscarínicos, envolvidos no aumento da secreção ácida. A histamina também é capaz de aumentar a secreção ácida através da estimulação dos receptores H₂ presentes no estômago. Vários peptídeos, como gastrina e colecistocinina, apresentam função gastroprotetora (HAM; KAUNITZ, 2007; PESKAR, 2001; LAINE et al., 2008). A gastrina é o principal hormônio estimulante da secreção ácida durante a ingestão de alimento. A colecistocinina é um mediador fisiológico de várias funções, inclusive secreção e esvaziamento gástrico. A somatostatina é outro hormônio

gastrointestinal que inibe diretamente a secreção ácida das células parietais (SUN et al., 2002).

3.4.4 Fatores agressores da mucosa gástrica

Uma série de fatores é capaz de produzir danos a mucosa que reveste a parede interna do estômago, incluindo respostas sistêmicas desencadeadas por estresse térmico ou contato direto com agentes irritantes chamados desestabilizadores da barreira gástrica. O desequilíbrio entre os mecanismos protetores e os agentes gastrotóxicos é responsável pela inflamação aguda (KWIECIEN et al. 2002).

Drogas capazes de suprimir a síntese de PG, como é caso dos DAINES, são conhecidamente ulcerogênicas. Observou-se que aproximadamente 20% dos pacientes que são usuários regulares de DAINE desenvolvem úlcera péptica. Agentes inibidores seletivos de COX-2, fracos inibidores da síntese de PG, são considerados menos ulcerogênicos (WALLACE, 2001).

Alterações no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica podem provocar a formação de úlceras. A diminuição do fornecimento de oxigênio (hipóxia) para a mucosa, resultante da acumulação de H^+ , provoca acidificação do estômago e desenvolvimento de úlcera no local (SORBYE; SVANES, 1994). Espécies reativas de oxigênio, geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico, células musculares lisas, macrófagos e plaquetas, também podem contribuir significativamente para o surgimento de danos na mucosa do estômago (REPETTO; LLESUY, 2002).

O NO, sob condições inflamatórias, via reações de nitração, pode contribuir para o aparecimento de dano celular, gerando peroxinitritos, responsáveis pela nitração de resíduos de tirosina nas proteínas, depleção da reserva energética de mitocôndrias, e por causar quebras nas fitas de DNA (BECKMAN et al., 1996).

3.4.4.1 *Helicobacter pylori*

A bactéria patogênica *H. pylori* é um bastonete gram-negativo, curvilíneo, medindo cerca de 3,5 x 0,5 μm , adaptado ao nicho ecológico gerado pela mucosa gástrica. Com distribuição mundial, estima-se ter infectado cerca de 50% ou mais da população terrestre, sendo considerada uma das infecções mais comuns em todo o mundo (BITTENCOURT et al, 2006; BRUNTON et al., 2006).

Em países desenvolvidos, a infecção é pouco frequente na infância, entretanto, a incidência aumenta com o passar dos anos, sendo que aproximadamente 50% da população acima dos 60 anos apresenta a infecção. Já nos países em desenvolvimento, a infecção ocorre de forma mais precoce, com frequências mais altas em crianças, podendo atingir até 80% dos adultos (PING et al., 2006).

Este microrganismo destaca-se pelo flagelo polar, ausência de esporos e ocorrência de porinas. É capaz de realizar a síntese de uréase, que cliva a ureia endógena transformando-a em amônia, resultando em tamponamento do ácido gástrico, o que confere proteção bacteriana e citotoxicidade para as células que constituem a mucosa gástrica (COTRAN et al., 1999; BRUNTON et al., 2006).

A infecção por *H. pylori* é fortemente associada com a maioria dos casos de úlceras gástricas e duodenais. Estima-se que esta bactéria está presente em cerca de 90% dos casos de gastrite crônica, além de estar associada ao surgimento de carcinomas e linfomas gástricos. A maioria das pessoas infectadas são assintomáticas, o que dificulta a identificação da infecção (BITTENCOURT et al, 2006).

Apesar da associação entre bactéria e doença, a infecção por *H. pylori* não deve ser considerada a única causa por trás do surgimento de úlcera péptica, haja vista que muitas pessoas são infectadas, mas não desenvolvem tais lesões. Estudos indicam que o estresse fisiológico age como co-fator com o *H. pylori* para a formação de úlcera gástrica (LEVENSTEIN, 1998).

3.5 TERAPÊUTICA ATUAL

A terapia antiúlcera visa eliminar a dor, promover a cicatrização e prevenir o aparecimento de úlceras reincidentes. O objetivo da terapia farmacológica é reestabelecer o equilíbrio entre os fatores protetores e agressores, evitando a ação lesiva do suco gástrico sobre a mucosa. (AIHARA et al., 2003). Em caso de infecção por *H. pylori*, acrescenta-se o uso de antibióticos com o intuito de erradicar essa bactéria (BITTENCOURT et al, 2006).

Durante anos o foco da terapia era neutralizar o ácido clorídrico utilizando antiácidos, dieta alimentar ou cirurgia. No início dos anos 70, surgiram os antagonistas seletivos de receptores de histamina H_2 (cimetidina e ranitidina) (BLACK et al., 1972; YUAN et al., 2006). Na década de 80, foram lançados os inibidores de bomba de prótons (IBPs) $H^+/K^+ATPase$ (AIHARA et al., 2003).

Os IBPs (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol) são fármacos extremamente eficazes na inibição da secreção ácida, resultando em aumento nas taxas de cicatrização de úlceras pépticas, sendo os mais utilizados no tratamento e na prevenção de distúrbios ácido-pépticos. Após a descoberta dos IBPs, houve uma acentuada redução no uso de antagonistas de receptores H_2 histaminérgicos. Porém, ambos podem desencadear efeitos adversos quando utilizados cronicamente, devido à supressão do ácido gástrico. Dentre esses efeitos, destacam-se o desenvolvimento de hipergastrinemia e o aumento do risco de infecção bacteriana, principalmente *H. pylori*, dois problemas que podem levar ao surgimento de câncer gástrico (BRUNTON et al., 2006; YUAN et al., 2006).

Apesar da variedade de fármacos, nenhum produz remissão total das úlceras pépticas. Além da resposta limitada em casos crônicos, o aparecimento de efeitos adversos e a recidiva das lesões são comuns (RAGHUNATH et al., 2005; ANDRADE et al., 2008). Geralmente, a doença retorna após a suspensão da terapia medicamentosa porque os fármacos utilizados não são capazes de proporcionar a reconstrução do tecido da mucosa gástrica (cicatrização) durante muito tempo (TOMA et al., 2005).

Embora o surgimento destes fármacos tenha contribuído para a diminuição das taxas de morbi-mortalidade, a atual abordagem farmacológica ainda é insatisfatória, limitando-se a atuar de maneira sintomática e paliativa. Portanto, existe a necessidade de novos fármacos antiulcerogênicos que sejam mais eficazes, menos tóxicos e, principalmente, mais acessíveis para a população em geral (TUNDIS et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material botânico

A espécie foi coletada no município de Macapá, localizado no Estado do Amapá, Brasil. A coleta foi realizada na área do km 9, linha D, no dia 15 de outubro de 2012, às 10h da manhã.

Características da espécie coletada:

- Diâmetro a altura do peito (DAP): 1,80 m;
- Altura: aproximadamente 35 m;

- Folhas simples;
- Cascas avermelhadas (com exsudado).

Após a coleta, a identificação botânica foi realizada por especialista e uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA) para fins referenciais (HAMAB-18350).

4.1.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos ensaios microbiológicos foram fornecidos pelo Laboratório de Microrganismos de Referência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, e pelo Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) conforme a relação a seguir (Figura 3). As bactérias foram mantidas em Ágar Müller-Hinton e as leveduras em Ágar Sabouraud à temperatura de 35°C e 4°C (refrigerador).

Figura 3 – Lista de microrganismos utilizados nos ensaios microbiológicos.

No.	Microrganismos	Fornecedor	História
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	FIOCRUZ	ATCC 13150
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCS/UFPB	ATCC 25923
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCS/UFPB	ATCC 12228
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCS/UFPB	ATCC 9027
5	<i>Escherichia coli</i>	CCS/UFPB	ATCC 10536
6	<i>Candida albicans</i>	CCS/UFPB	ATCC90028
7	<i>Candida albicans</i>	CCS/UFPB	LM 111
8	<i>Candida albicans</i>	CCS/UFPB	LM 109
9	<i>Candida tropicalis</i>	CCS/UFPB	ATCC13803
10	<i>Candida tropicalis</i>	CCS/UFPB	LM 14
11	<i>Candida tropicalis</i>	CCS/UFPB	LM 20

Fonte: Acervo do autor.

4.1.3 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos foram Ágar Müller-Hinton (Merck) para bactérias e Ágar Sabouraud (Merck) para leveduras. A preparação dos mesmos foi realizada conforme instruções do fabricante.

4.1.4 Animais

Para o estudo das vias e/ou mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato de *P. amapa* foram utilizados Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) albinos (machos e fêmeas) com peso entre 150-250 g (Figura 4). Todos provenientes do Centro de Bioterismo do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá “Professor Reinaldo Damasceno” (LACEN/AP).

Os animais foram aclimatados às condições do Laboratório de Experimentação Animal (LEA) por 7 dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclos de claro e escuro de 12 horas. Todos foram alimentados com ração (*pellets* de ração Purina) e água *ad libitum*. Os períodos de jejum aos quais os animais foram submetidos estão de acordo com os preconizados por cada metodologia especificada a seguir. Todos os experimentos foram iniciados no período da manhã.

Figura 4 – *Rattus norvegicus*.



Fonte: ROCHA, 2008.

4.1.5 Drogas, reagentes, solventes e sais

Álcool metílico (Ecibra, Santo Amaro, Brasil), cimetidina (200 mg), cloreto de sódio (0,9%) (Farmax, Divinópolis, Brasil), álcool etílico absoluto P.A. (Nox Solutions, Mauá, SP), éter etílico P.A. (Biotec, São José dos Pinhais, Brasil), fenolftaleína (Êxodo Científica, Hortolândia, Brasil) e hidróxido de sódio P.A. (Alphatec, São Paulo, Brasil).

4.1.6 Equipamentos

Balança analítica (AY220, Shimadzu), centrífuga (Quimis), pipetas automáticas (Eppendorf) e pHmetro digital (PH2, Labmeter).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do extrato metanólico de *P. amapa* (EMPA)

4.2.1.1 Secagem e pulverização

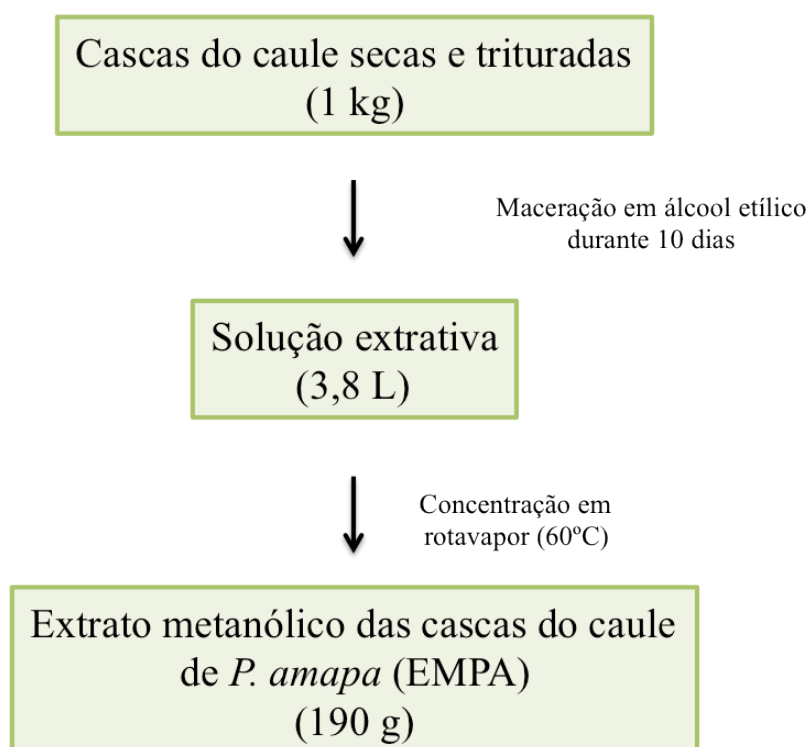
As cascas do caule de *P. amapa* (1,6 kg) foram colocadas em estufa de ar circulante, durante um período de 7 dias até a completa desidratação, sob temperatura de 45°C. Após a secagem, as cascas foram trituradas num moinho de facas, resultando em 1 kg de material.

4.2.1.2 Maceração, filtração e concentração

O material triturado foi submetido a processo de maceração, com álcool metílico (líquido extrator), numa proporção de 1:5 (1 kg de material vegetal/5 L de metanol). Este processo de maceração estática consiste em deixar a droga seca e moída em contato com o solvente em frasco bem fechado, ao abrigo da luz, sob temperatura ambiente. A mistura foi homogeneizada diariamente, durante 10 dias, com objetivo de quebrar as zonas de concentração dentro do frasco, proporcionando melhor contato do solvente com o material vegetal (FERRI, 1996; VINATORU, 2001).

Após o processo de maceração, a solução extrativa foi filtrada a vácuo, resultando em 3,8 L de filtrado. Em seguida, o líquido foi colocado num evaporador rotatório (Q344b2, Quimis) a 78 rpm (60°C) com a finalidade de remover todo o solvente através de sua evaporação, resultando em 190 g de extrato (bruto) metanólico das cascas de *P. amapa* (EMPA) (Figura 5). A massa de extrato concentrado utilizada em cada experimento foi calculada conforme o tipo de estudo e o peso corpóreo dos animais. As doses foram de 500 mg/kg para todos os ensaios.

Figura 5 – Obtenção do extrato metanólico das cascas do caule de *P. amapa* (EMPA).



4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.2.2.1 Preparação dos inóculos

Para o preparo dos inóculos, foram selecionadas colônias isoladas em meio de cultura TSA. As suspensões foram preparadas em tubos de ensaio contendo solução salina (NaCl a 0,85%) até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a um inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (HADACEK; GREGER, 2000; NCCLS, 2004).

4.2.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em placas de poliestireno (TPP/ISSO 9001/Switzerland), com tampas esterilizadas. Nas placas contendo 96 poços em forma de U, colunas de 1 a 12 e linhas de A a H, foi adicionado 100 µL do caldo nutriente duplamente concentrado. Em seguida, foi acrescentado 100 µL de extrato (EMPA) a partir de uma “solução-mãe” de 1024 µg/mL nos poços da linha A e colunas de 1 a 12. Foi

realizada uma diluição seriada, à razão de 2, de EMPA a partir das linhas A até G (concentrações de 51,2-1,6 µg/mL). A linha H foi utilizada para o controle positivo com cloranfenicol (100 µg/mL) para as bactérias e nistatina (100 UI/mL) para as leveduras. Após as diluições, foi inoculado em todas as cavidades da placa 10 µL das suspensões com os inóculos. Estes ensaios foram realizados em duplicata e incubados a 35°C por 24 horas (MANN; MARKHAM, 1998; HADACEK; GREGER, 2000; NCCLS, 2004).

4.2.3 Avaliação da secreção ácida

Para avaliar a influência do extrato (EMPA) na secreção ácida, foram utilizados ratos Wistar machos (n=15) em jejum por um período de 12 horas com livre acesso à água. Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos (n=5):

- 1) O primeiro grupo (controle negativo) recebeu, via oral (gavage), solução alcóolica 10% (veículo) na dose de 10 mL/kg;
- 2) O segundo grupo (controle positivo) recebeu, via oral (gavage), solução aquosa de cimetidina na dose de 100 mg/kg;
- 3) O terceiro grupo (teste) recebeu, via oral (gavage), EMPA diluído no veículo, na dose de 500 mg/kg (SILVA, 2012).

Após 30 minutos, os animais foram anestesiados, com cetamina + xilazina (injetável) e éter (via inalatória) quando necessário, para realização de tricotomia, incisão abdominal e ligadura do piloro com fio de sutura. O abdome foi então suturado e, após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As incisões foram reabertas e os estômagos removidos. Cada órgão retirado foi lavado com água destilada, secado com gaze e aberto através da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaios para centrifugação (3000 rpm por 15 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico foi quantificado em proveta. A determinação do pH foi realizada com o auxílio de pHmetro (pH2, Labmeter) e a concentração de íons H⁺ (mEq/mL/4h) através de titulação simples com solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 N) e fenolftaleína (2%) como indicador ácido-base (SHAY et al., 1945).

4.2.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças foram determinadas utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste do tipo Bonferroni ou Dunnett. As análises foram feitas com o auxílio dos programas GraphPad InStat e GraphPad Prism 4.0 e 6.0. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$.

4.2.7 Considerações éticas

Os animais (ratos Wistar) foram submetidos à eutanásia para a remoção dos estômagos. Por definição, eutanásia é uma forma de abreviar a vida de um ser vivo, sem dor ou sofrimento. O método escolhido para todos os experimentos foi o método físico conhecido como concussão/deslocamento cervical, considerado aceitável para esta espécie de roedor devido ao tamanho e peso dos animais (FIOCRUZ, 2005).

As condições de tratamento que foram aplicadas aos animais não infringem os artigos da Lei Nº 11.794 de 08 de Outubro de 2008 - que institui o código de proteção aos animais submetidos à experimentação laboratorial - uma vez que os ratos não foram submetidos a situações de maus tratos e/ou dor induzida (BRASIL, 2008). O projeto foi protocolado, com o número 002/2013, junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) de acordo com o que preconiza a Resolução Nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, sendo certificado e aprovado (ANEXO).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROPRIEDADES FÍSICAS E RENDIMENTO DO EMPA

O extrato de *P. amapa* apresentou cor marrom-avermelhado (Figura 6). A partir de 1,6 kg de cascas de *P. amapa* foi obtido 1 kg de pó que gerou 3,8 L de filtrado. Após concentrado, resultou em 190 g de extrato bruto, o que representa 19% de rendimento (Tabela 1).

Figura 6 – EMPA em pó e misturado ao veículo (solução alcóolica 10%).



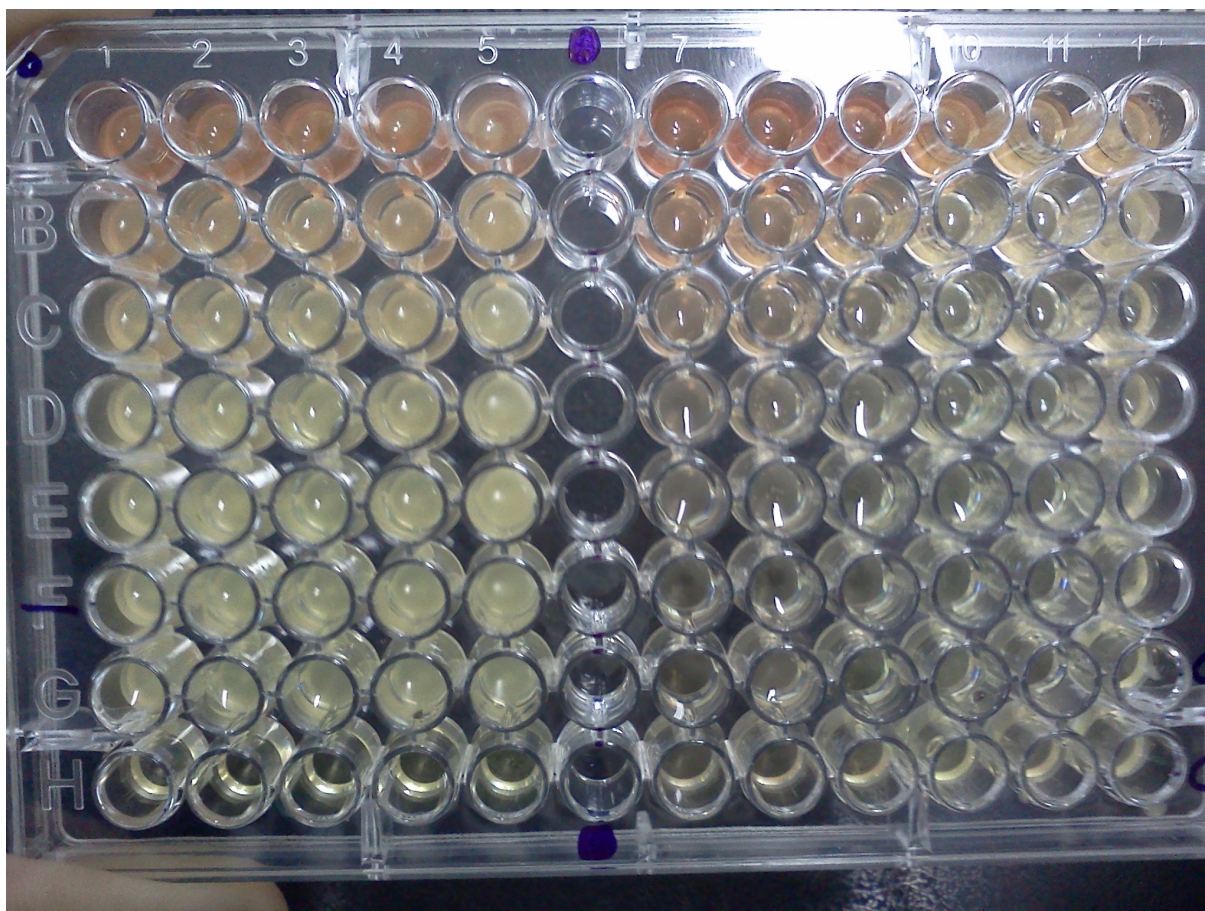
Fonte: Acervo do autor.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EMPA

O extrato de *P. amapa* (nas concentrações de 51,2 a 1,6 $\mu\text{g/mL}$) foi incapaz de inibir o crescimento microbiano como pode ser evidenciado na Figura 7 (abaixo) pelo grau de turbidez apresentado pelas colunas de 1 a 5 (bactérias) e de 7 a 12 (leveduras) em relação aos respectivos controles presentes na última linha (H) da placa, contendo cloranfenicol e nistatina, respectivamente.

Porém, tais resultados não excluem a possibilidade do EMPA agir como antimicrobiano, pois as concentrações utilizadas são consideradas baixas, por não ser uma substância isolada e sim um extrato bruto, que é um conjunto de diversas substâncias, incluindo metabólitos primários inativos e metabólitos secundários bioativos de *P. amapa*.

Figura 7 – Placa com 96 poços demonstrando o crescimento microbiano após 24 horas de incubação a 37°C.



Fonte: Acervo do autor.

Coluna 1 – *Staphylococcus aureus* (FIOCRUZ/ATCC 13150)
 Coluna 2 – *Staphylococcus aureus* (CCS/UFPB/ATCC 25923)
 Coluna 3 – *Staphylococcus epidermidis* (CCS/UFPB/ATCC 12228)
 Coluna 4 – *Pseudomonas aeruginosa* (CCS/UFPB/ATCC 9027)
 Coluna 5 – *Escherichia coli* (CCS/UFPB/ATCC 10536)
 Coluna 7 – *Candida albicans* (CCS/UFPB/ATCC 90028)
 Coluna 8 – *Candida albicans* (CCS/UFPB/LM 111)
 Coluna 9 – *Candida albicans* (CCS/UFPB/LM 109)
 Coluna 10 – *Candida tropicalis* (CCS/UFPB/ATCC 13803)
 Coluna 11 – *Candida tropicalis* (CCS/UFPB/LM 14)
 Coluna 12 – *Candida tropicalis* (CCS/UFPB/LM 20)

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EMPA SOBRE A SECREÇÃO ÁCIDA

A atividade gastroprotetora do EMPA mostrou-se dose-dependente (100, 250 e 500 mg/kg) em diferentes modelos de indução de lesões gástricas, inclusive indução por etanol absoluto (SILVA, 2012). A maior dose utilizada nesses estudos (500 mg/kg) foi a escolhida para os experimentos farmacológicos realizados neste trabalho com o objetivo de evidenciar

os melhores resultados possíveis, levando em consideração o número limitado de animais experimentais disponíveis.

Para verificar se o EMPA influencia a atividade secretória foi utilizado o modelo de ligadura de piloro, onde ocorre acúmulo de secreção gástrica (ALMEIDA et al., 2012). Neste experimento, a cimetidina foi utilizada como controle positivo por ser uma droga padrão - antagonista de receptor H_2 - amplamente utilizada como agente antissecretório gástrico, que produz seus efeitos, principalmente, por meio da inibição da secreção ácida, atuando na prevenção e tratamento de úlceras gástricas (DIAS et al., 2000; GUSTAFSON; WELLING, 2010).

Os animais do grupo controle positivo (cimetidina) e do EMPA demonstraram alterações no volume do suco gástrico, acidez livre (pH) e concentração de íons H^+ (acidez total) quando comparados com os animais que receberam apenas o veículo (controle negativo) (Tabela 1). Tanto o EMPA quanto a cimetidina causaram diminuição significativa no volume do suco gástrico (Figura 8) e na acidez total (Figura 10). A acidez livre mostrou-se significativamente reduzida apenas nos animais tratados com cimetidina (figura 9).

Tabela 1 – Avaliação da secreção ácida de ratos submetidos a diferentes tratamentos.

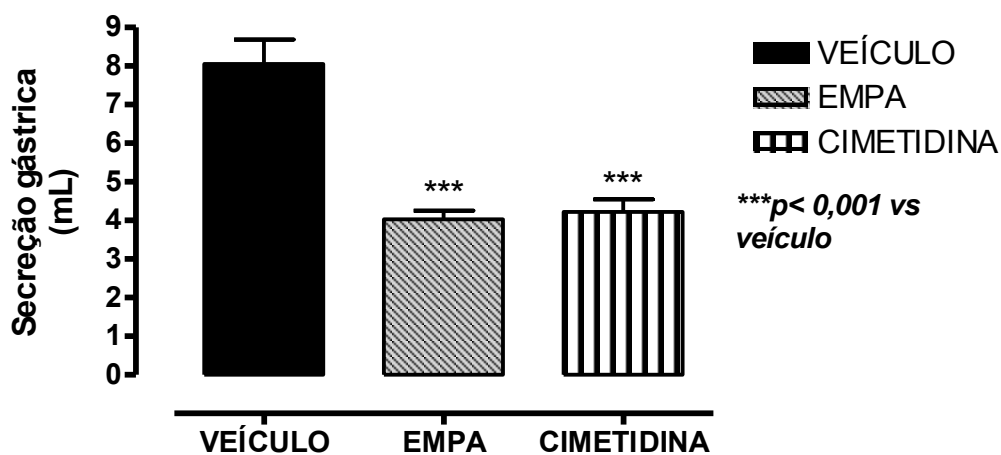
Tratamento (v.o.)	Dose (mg/kg)	Volume do suco gástrico (mL)	pH	[H ⁺] (mEq/mL/4h)
Veículo	-	8,05 ± 0,62	1,36 ± 0,01	4,68 ± 0,64
Cimetidina	100	4,22 ± 0,31***	4,37 ± 0,56**	0,18 ± 0,03***
EMPA	500	4,03 ± 0,21***	2,72 ± 0,04	0,31 ± 0,08***

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média.

p<0,01, *p<0,001 vs controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

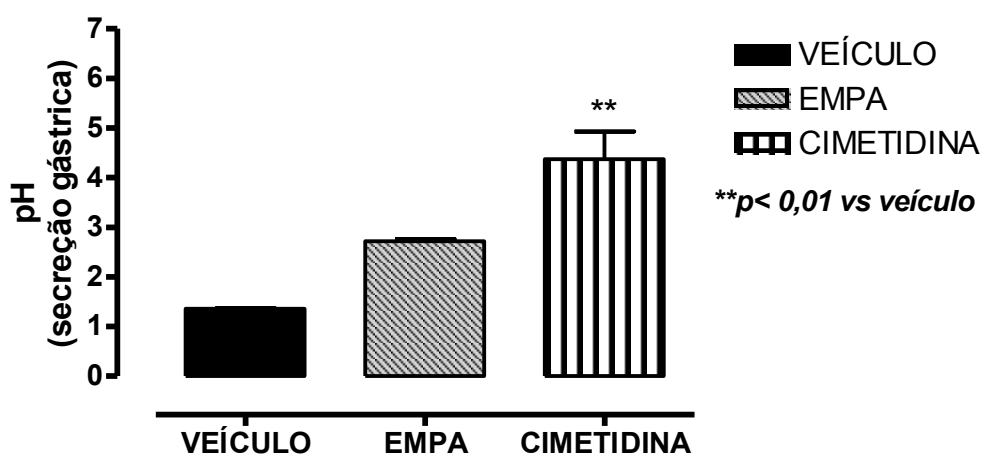
A administração via oral de EMPA (500 mg/kg) diminuiu o volume e a acidez total do suco gástrico de ratos Wistar de maneira semelhante a droga padrão (cimetidina), evidenciando importante atividade antissecretória, que traz benefícios no combate a úlcera. Apesar de ter aumentado o pH, tornando o suco gástrico menos ácido, o EMPA não foi capaz de fazê-lo de maneira significativa. A acidez livre nem sempre reflete a acidez total (concentração de íons H^+) devido a fatores como a presença de proteínas e outras secreções no conteúdo gástrico.

Figura 8 – Volume da secreção gástrica (mL) de ratos Wistar submetidos a diferentes tratamentos.



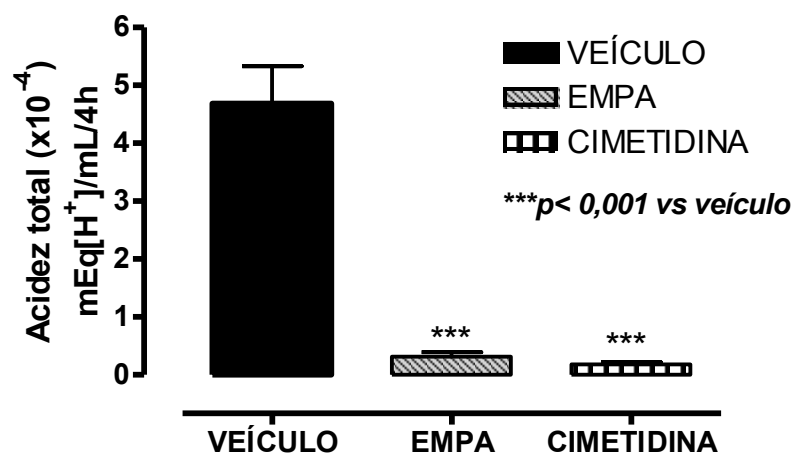
Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média.
A comparação estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni.
*** $p < 0,001$ vs controle (veículo).

Figura 9 – Acidez livre (pH) da secreção gástrica de ratos Wistar submetidos a diferentes tratamentos.



Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média.
A comparação estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni.
** $p < 0,01$ vs controle (veículo).

Figura 10 – Acidez total [H^+] da secreção gástrica de ratos Wistar submetidos a diferentes tratamentos.



Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média.
A comparação estatística foi realizada utilizando ANOVA
de uma via seguida do teste de Bonferroni.
*** $p < 0,001$ vs controle (veículo).

6 CONCLUSÃO

- O EMPA não exerce ação antimicrobiana. Portanto, faz-se necessária a utilização de maiores concentrações do extrato para melhor avaliar seu efeito, bem como o uso de outras cepas, em especial de *H. pylori*, bactéria associada a úlceras gástricas.
- 500 mg/kg de EMPA inibiu a secreção ácida de maneira similar a droga padrão cimetidina (100 mg/kg), efeito que pode contribuir para a redução das lesões da mucosa gástrica provocadas por excesso de ácido intragástrico.

REFERÊNCIAS

- ABIFISA – Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. **Informações sobre os fitoterápicos brasileiros**, 2004. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 05 jul. 2013.
- ABITBOL, R. A. **Doença ulcerosa péptica**. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <<http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>>. Acesso em: 23 fev. 2005.
- AIHARA, T. et al. **Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future**. *Pharmacology & Therapeutics*, 98:109-127, 2003.
- ALICAN, I. et al. **A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction**. *The American Journal of Physiology*, v. 270, p. 225-237, 1996.
- ALLEN A. et al. **Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection**. *Gut*, v. 21, p. 249-262, 1980.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. **Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin**. *Am. J. Cell Physiol.*, 288:C1-C19, 2005.
- ALMEIDA, A. B. et al. **Anti-ulcerogenic mechanisms of the Sesquiterpene Lactone Onopordopicrin-Enriched Fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): role of somatostatin, gastrin, and endogenous sulfhydryls and nitric oxide**. *J. Med. Food*, 78:112-117, 2012.
- ANDRADE, S. F. et al. **Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15-dioxo-21-hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae)**. *Archives of Pharmaceutical Research*, v. 31, n.1, p. 41-46, 2008.
- ANDREWS, F. J. et al. **Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators**. *Dig. Dis. Sci.*, v. 39, p. 366-73, 1994.
- BAFNA, P. A.; BALARAMAN, R. **Anti-ulcer and antioxidante activity of DHC-1, a herbal formulation**. *J. Ethnopharmacol.*, 90:123-127, 2004.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. **Drug discovery from medicinal plants**. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos**. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARRETO, A. S. et al. **Chemical constituents from *Himatanthus articulata***. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 9, p. 430-434, 1998.
- BECKMAN, J. et al. **Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly**. *The American J. Physiol.*, v. 271, p. 1424-1437, 1996.

BELLEY, A. et al. **Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 60(4):10-15, 1999.

BESSERA, A. M. S. S. et al. **Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rat.** J. Agri. Food Chem. 59:6957-6965, 2011.

BIAZZI, E. **O maravilhoso poder das plantas.** 18. ed. Tatui: Casa Brasileira, SP, 2004.

BIGHETTI, A. E. et al. **Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Phytomedicine, v. 12, p. 72-77, 2005.

BIRDANE, F. M. et al. **Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats.** W. J. Gastroen., v. 13, p. 607-611, 2007.

BITTENCOURT, P. F. S. et al. **Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents (Úlcera péptica e *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes).** Jornal de Pediatria, v. 82, n. 5, 2006.

BLACK, J. W. et al. **Definition and antagonism of histamine H₂-receptors.** Nature, v. 236, n. 5347, p. 385-390, 1972.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. **Resolução – RE nº. 90, de 16 de março de 2004.** Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10242>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. **Resolução RDC nº. 10, de 10 de março 2010.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BROWN, J. F. et al. **Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach.** Eur. J. Pharmacol., v 223, p. 103-4, 1992.

BRUNTON, L. et al. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2006.

BRZOZOWSKI, T. et al. **Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation.** J. Physiol. Pharmacol., 56(5):33-55, 2005.

BULUT, R. et al. **Nitric oxide-mediated regulation of gastric H⁺, K⁺-ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanol-induced injury in rats.** Dig. Dis. Sci., v. 7, p. 1417-22, 1999.

CALAM, J.; BARON, J. H. **Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer.** British Medical Journal, v. 323, p. 980-982, 2001.

CALATAYUD, S. et al. **Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat.** British Journal of Pharmacology, v. 127, p. 1111-18, 1999.

CALIXTO, J. B. **Medicamentos Fitoterápicos**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001. p. 297-315.

CARVALHAES, S. F. et al. **Alternative extraction of alkaloid anticarcinogens from Brazilian “vinca rósea” using long exchange chromatography**. Rev. Bras. Farmacogn., v. 12, p. 83-84, 2002.

CARVALHO, M. G. et al. **Esteres from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae)**. J. Braz. Chem. Soc., v. 12, n. 4, p. 556-559, 2001.

CARVALHO, M. G. et al. **Cornoside and other constituents from the látex of *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern Brazil**. J. Braz. Chem. Soc., v. 18, p. 667-669, 2008.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. CNPQ – Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém, 1996, p. 279.

CHUANG, C. N. et al. **Gastrin-histamine interections: direct and paracrine elements**. Scand. J. Gastroenterol., v. 26, p. 95-103, 1991.

COSTA, M. **The enteric nervous system**. Am. J. Gastroenterol., v. 89, p. S129-S137, 1994.

COTRAN, R. S. et al. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6^a ed. EUA: Sanders Company, 1999.

COWAN, M. M. **Plant products as antimicrobial agents**. Clin. Microbiol. Rev., v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.

CRAWFORD, J. M. **O trato gastrointestinal**. In: Cotran, R. S. et al. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 697-758, 2000.

CUNHA, A. P. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Caloste Gulbenkiam, 2003.

D’ACAMPORA, A. J. **Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perfurada atendidos no centro cirúrgico do hospital de Florianópolis**. Rev. Med. Res. Vol. 10 (4): 138, 2008.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

DARLING, R. L. et al. **The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surfasse hydrophobicity, and prostaglandin metabolismo in cyclooxygenase knockout mice**. Gastroenterol., 127:94-104, 2004.

DAS, D.; BANERJEE, R. K. **Effect of stress on the antioxidante enymes and gastric ulceration**. Mol Cell Biochem. 1993; 125(2):115-25.

DIAS, P. C. et al. **Antiulcerogenic activity of crude hidroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L.** J. Ethnopharmacol. 2000; 69(1):57-62.

EASTWOOD, G. L. **Is smoking still important in the pathogenesis of peptic ulcer disease?** J. Clin. Gastroenterol., v. 25, 1997.

EISIG, J. N.; LAUDANNA, A. A. **Úlcera péptica**. Programa de saúde da família, 2001.

Disponível em:

<http://www.ids.saude.uol.com.br/psf/medicina/tema5/texto81_definicao.asp>. Acesso em: 25 nov. 2012.

EVANS, W. C. **Pharmacognosy**. 15. ed. Toronto: W. B. Saunders, 2002.

FAN, T. Y. et al. **Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer**. World J. Gastroenterol., 11(8):1204-1209, 2005.

FERRI, P. H. **Química de produtos naturais: métodos gerais**. In: DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, p. 129-56, 1996.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador, 2005.

FREITAS, F. F. B. P. et al. **Gastroprotective activity of Zanthoxylum rhoifolium Lam. in animal models**. J. Ethnopharmacol., 137:700-708, 2011.

GILANI, A. H. **Trends in ethnopharmacology**. J. Ethnopharmacol. v. 100, p. 43-49, 2005.

GOEL, R. K.; SAIRAM, K. **Antiulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasna*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale***. Indian J. Pharmacol., 34:100-110, 2002.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 15.

GUSTAFSON, J.; WELLING, D. **“No acid, no ulcer”-100 years later: a review of the history of peptic ulcer disease**. J. A. College of Surgeons [S.I.], v. 210, n. 1, p. 110-116, jan. 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia dos Distúrbios Gastrointestinais**. In: Tratado de Fisiologia Médica, 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HADACEK, F.; GREGER, H. **Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice**. Phytochemical Analysis, v. 11, p. 137-147, 200.

HIRUMA-LIMA, C. A. et al. **Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae)**. J. Ethnopharmacol. v. 122, p. 406-409, 2009.

HOGBEN, C. A. M. et al. **Quantitative histology of gastric mucosa: man, dog cat, guinea pig, and frog**. Gastroenterol., v. 67, p. 1143-54, 1974.

HOLZER, P. **Neural regulation of gastrointestinal blood flow**. In: Johnson L. R., ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 4. ed. New York: Academic Press, 817-839, 2006.

HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J. **Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico**. In: Hardman JG & Limbird LE. Goodman & Gilman, *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

JAINU, M.; DEVI, C. S. S. **Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation**. *J. Ethnopharmacol.*, 104:156-163, 2006.

KANWAR, S. et al. **Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells**. *American J. Physiol.*, v. 266, p. 222-229, 1994.

KUSAYAMA, T. et al. **Flow dependence of nitric oxide-mediated pressure change in rat mesenteric beds with different tonus**. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 312, p. 301-07, 1996.

KWIECIEN, S. et al. **Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury**. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 53, p. 39-50, 2002.

LAINE, L. et al. **Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside**. *Gastroenterology*, 135:41-60, 2008.

LAPA, A. J. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Simões, C. M. O. (Ed.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999, p. 181-196.

LEE, A. et al. **Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease**. *European J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 7, p. 461-465, 1995.

LEVENSTEIN, S. **Stress and peptic ulcer: life beyond *Helicobacter***. *BMJ*, v. 316, n. 7130, p. 538-541, 1998.

LEWIS, D. A. HANSON, P. J. **Anti-ulcer drugs of plant origin**. *Prog Med Chem*. 1991; 28:201-31.

LIMA, E. O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). *Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna*. Chapecó: ARGOS, 2001. P. 483-501.

LIMA, M. R. F. et al. **The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants**. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.16, n. 3, p. 300-306, Jul./Set. 2006.

LIPOF, T. et al. **Surgical perspectives in peptic ulcer disease and gastritis**. *World J. Gastroenterol.*, v. 20, p. 3248-3252, 2006.

LOPEZ-BELMONTE, J. et al. **The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa**. *Br. J. Pharmacol.*, v. 108, p. 73-8, 1993.

- LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F. **Catálogo das madeiras da Amazônia**. SUDAM, Belém, 1968, 433 p.
- LU, H.; GRAHAM, D. Y. **New development in the mechanistic understanding of peptic ulcer diseases**. Drug Discov. Today, 3(4):431-437, 2006.
- LUCEY, M. R.; YAMADA, T. **Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin**. Dig. Dis. Sci., v. 34, p. 5S-13S, 1989.
- MACIEL, M. A. M.; ANGELO, C. P.; VEIGA, V. F. J. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Quim. Nova, 25 (3): 429-438, 2002.
- MALAIRAJAN, P. et al. **Anti-ulcer activity of crude alcoholic extract of Toona ciliate Roemer (heart wood)**. J. Ethnopharmacol. [S.I.], v. 110, n. 2, p. 348-35, mar. 2007.
- MALDANER, C. **Adoção à brasileira: fitoterapia investindo na saúde**. Senado, Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.senado.gov.br/web/senador/casmalda/fitoterapia.htm>>. Acesso em: 22 jul. 2012.
- MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. **A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils**. J. Applied Microbiology, v. 84, p. 538-544, 1998.
- MARQUES, L. C. **Adoção à brasileira: fitoterapia**. Altavista, São Paulo. Disponível em: <<http://altavista.com.br/cienciafitoterapia>>. Acesso em: 15 maio 2012.
- MATSUDA, T. et al. **Gastroprotection of escins Ia, Ib, Iia, and Ilib on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats**. Eur. J. Pharmacol., v. 373, p. 63-70, 1999.
- MCCHESENEY, J. D. et al. **Plant natural products: Back to the future or into extinction**. Phytochemistry, v. 68, p. 2015-2022, 2007.
- MINCIS, M. et al. **Etanol e o trato gastrointestinal**. Arquivos de gastroenterologia, v. 32, p. 131-139, 1995.
- MILANI, S.; CALABRO, A. **Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing**. Microscopy Research and Technique, v. 53, p. 360-71, 2001.
- MORAIS, P. B. et al. **Yeast succession in the amazona fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp.** Applied and environmental microbiology, v. 61, n. 12, p. 4351-4257, 1995.
- MONTELES, R.; PINHEIRO, C. U. B. **Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica**. Rev. Bio. Ciênc. da Terra, v. 7, n. 2 – 2º Semestre, p. 38-48, 2007.
- MONTROSE, M. H. et al. **Gastroduodenal mucosal defense**. In: Johnson, L. R. Physiology of the gastrointestinal tract. 4. ed. New York: Academic Press, p. 1259-1291, 2006.
- NCCLS. 2004. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing**. Fourteenth informational supplement. NCCLS document M100-514. NCCLS, Wayne, Pa.

O'MALLEY, P. **Gastric ulcers and GERD: the new “plagues” of the 21st century update for the clinical nurse specialist.** Clin. Nurse Spec., 17(6):286-289, 2003.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

OLIVEIRA, M. F. S. **Bebendo na raiz: um estudo de caso sobre saberes e técnicas medicinais do povo brasileiro.** 2008. 282 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável) - Universidade de Brasília, DF, 2008.

PAULA, A. C. B. **Correlação entre a desnutrição proteica e o processo de formação e reparação de úlceras gástricas: efeito protetor/curativo do óleo essencial de *Croton cajucara Benth.*** 2003. 121 f. Tese (Doutorado) - UNICAMP, SP, 2003.

PECHENPAUGH, N. J. **Nutrição: Essência e Dietoterapia.** 7. ed. São Paulo: Roca, 1997.

PESKAR, B. M. **Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense.** J. Physiol. Pharmacol., 52:555-568, 2001.

PHILLIPSON, M. et al. **The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation.** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 295:G806-G812, 2008.

PING, T. M. et al. ***Helicobacter pylori* infection and the murine gastric microbiota.** American Society for Microbiology, 2006.

RAGHUNATH, A. S. et al. **Review article: the long-term use of proton-pump inhibitors.** A. and Pharm. T., 22(1)55-63, 2005.

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs.** Toxicon., 39:603-613, 2001.

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

REYES-TREJO, B. et al. **Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls.** J. Pharm. Pharmacol., 60:931-936, 2008.

ROBERT, A. et al. **Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury.** Gastroenterol., 77:433-440, 1979.

SALES, M. F. **Estudos taxonômicos do gênero *Mandevilla* Lindley subgênero *Mandevilla* (Apocynaceae) no Brasil.** 1993. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1993.

SALIM, A. S. **Sulphydryl-containing agentes: a new approach to the problem of refractory peptic ulceration.** Pharmacology, 45(6):301-306, 1992.

SANTOS, S. C. et al. **Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes.** Rev. Bras. Farmacogn. v. 17, n. 2, p. 215-219, 2007.

SCHENKEL, E. P. et al. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. SIMÕES, M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 301-332.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. **Traditional medicine and gastroprotective crude drugs**. J. Ethnopharmacol., 100:61-66, 2005.

SHAH, V. et al. **Physiology of the splanchnic circulation**. In: Topol E, Lanzer F, eds. **Theory and practice of vascular diseases**. Germany: Springer Verlag, 2002, p. 1688-94.

SHAY, H. **A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat**. Gastroenterol., v. 5, p. 43-61, 1945.

SILVA, S. L. ***Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae): um estudo toxicológico pré-clínico agudo e da atividade gastroprotetora**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Amapá, AP, 2012.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P.S.D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade**. Bra. J. Pharmacol. 18(4): 618-626, 2008.

SCHOROETER, G. et al. **Estudo de utilização de anti-ulcerosos na população idosa de Porto Alegre, RS, Brasil**. Rev. HCPA 28 (2):89-95, 2008.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. **Control of gastric acid secretion in health and disease**. Gastroenterol. [S.I.], v. 134, n. 7, p. 1842-1860, jun. 2008.

SCHUBERT, M. L.; SHAMBUREK, R. D. **Control of acid secretion**. Gastroenterol. Clin. of America, v. 19, p. 1-25, 1990.

SOBRINHO, D. C. et al. **Triterpenoids isolated from Parahancornia amapa**. J. Braz. Chem. Soc., v. 2, p. 15-20, 1991.

SONTAJ, S. J. **Guilty as charged: bugs and drugs in gastric ulcer**. Am. J. Gastroenterol., 92(8):1255-1261, 1997.

SORBYE, H.; SVANES, K. **The role of blood flow in gastric mucosal defense, damage and healing**. Digestive Diseases, v. 5, p. 305-317, 1994.

SOSTRES, C. et al. **Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract**. Best Prac. Res. Clin. Gastro. 24:121-132, 2010.

SPIRT, M. J. **Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy**. Clin. Ther., 26(2):197-213, 2004.

STEMERMER, E. **Alcohol consumption and the gastrointestinal tract**. The Israel Medical Association Journal. v. 4, n. 3, p. 200-202, 2002.

SUN, F. P. et al. **Gastrin, somatostatin, G and D cells of gastric ulcer in rats.** World J. Gastroenterol., v. 8, n. 2, p. 375-378, 2002.

SUNDLER, F. et al. **The neuroendocrine system of the gut – an update.** Acta Onco., v. 30, p. 419-27, 1991.

SZABO, S. **Mechanisms of gastric mucosal injury and protection.** J. Clin. Gastroenterol., v. 13, p. 21S-34S, 1991.

TARNAWSKI, A. **Cellular and molecular mechanisms of mucosal defense and repair.** In: Yoshikawa, T. & Arakawa, T. Bioregulation and its disorders in gastrointestinal tract. Tokyo, Japan: Blackwell Science, 3-17, 1998.

TARNAWSKI, A. et al. **Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways.** J. Physiol. Paris, 95(1-6):337-344, 2001.

TOMA, W. et al. **Preliminary studies of *Mammea americana* L. (Guttiferae) bark/látex extract point to an effective antiulcer effect on gastric ulcer models in mice.** Phytomed. 12(5):345-350, 2005.

TOMAZZONI, M. I. et al. **Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica.** Texto Contexto Enferm., v. 15, n. 1, p. 115-121, Florianópolis, 2006.

TOLEDO DIAS, L. F. et al. **Atividade antiúlcera e antioxidante da *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae).** Rev. Bras. Farmacogn., v. 1B, n. 10, p. 309-314, 2009.

TUNDIS, R. et al. **Natural products as gastroprotective and antiulcer agentes: recente developments.** Natural products communication 13(12):2129-2144, 2008.

VALCHEVA-KUZMANOVA, S. et al. **Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats.** Exp. Toxicol. Pathol., 56(6):385-392, 2005.

VAN DEN BERG, M. E. Plantas medicinais na Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático. CNPq/PRU/MPEG, Belém – PA, Brasil, 1982.

VANDERLEI, M. F. et al. **Iridoids and triterpenes from *Himatanthus phagadaenica*, the complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of two iridoids glycosides.** Rev. Bras. Soc. Quím., v. 2, p. 51-55, 1991.

VIEGAS, JR, C. et al. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Química Nova, v. 29, p. 326-337, 2006.

VINATORU, M. **An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs.** Ultrason. Sonochem., v 8, p. 303-313, 2001.

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

WALLACE, J. L. **Prostaglandins, NSAIDs and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?**. Physiological Reviews [S.I.], v. 88, n. 4, p. 1547-1565, out. 2008.

WALLACE, J. L.; DEVCHAND, P. R. **Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense**. Br. J. Pharmacol., 145(3):275-282, 2005.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. **The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense**. FASEB Journal, v. 10, p. 731-740, 1996.

YAO, X.; FORTE, J. G. **Cell biology of acid secretion by the parietal cell**. Annu. Rev. Physiol., v. 65, p. 103-31, 2003.

YUAN, Y; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. **Peptic ulcer disease today**. Nat. Prac. Gastr. Hep. 3(2):80, 2006.

YUNES, R. A. et al. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil**. Quím. Nova, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental**. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna, Chapecó: Argos, 2001.

ANEXO – Certificado de Aprovação do CEP/UNIFAP**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo no. 002/2013 – CEP sobre **"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO GASTROPROTETORA DO EXTRATO METANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE PARAHANCORNIA AMAPÁ (HUBER) DUCKE (APOCYNACEAE)"**, sob a responsabilidade de **André Mendonça dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação de Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal(COBEA), e foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), em reunião realizada em 12/03/2013.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 002/2013 about **"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO GASTROPROTETORA DO EXTRATO METANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE PARAHANCORNIA AMAPÁ (HUBER) DUCKE (APOCYNACEAE)"**, **André Mendonça dos Santos** is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adapted by Brazilian College of Animal Experimentation(COBEA) and was approved by the Research Ethical Committee(CEP-UNIFAP) in 12/03/2013.

Macapá, 12 de março de 2013

Prof. Msc. Alexandre Souto Santiago
Coordenador - CEP-UNIFAP

Universidade Federal do Amapá
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP - UNIFAP
Rod. JK km 2, Marco Zero CEP 68908-130 – Macapá – AP - Brasil
Email: cep@unifap.br