

Rangel Willians Batista

**Efeitos Antioxidantes (*in vitro* e *in vivo*)
de espécies ricas em flavonóides
pertencentes ao gênero *Turnera*, família
*Turneraceae***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Biólogo - Rangel Willians Batista.

Campinas, 29 de agosto de 2005.

Alba Regina Monteiro Souza Brito
-Orientadora -

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alba R. M. Souza Brito



UNICAMP

Campinas 2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Rangel Willians Batista

**Efeitos Antioxidantes (*in vitro* e *in vivo*)
de espécies ricas em flavonóides
pertencentes ao gênero *Turnera*, família
*Turneraceae***

*Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título
de Mestre em Farmacologia.*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alba R. M. Souza Brito



UNICAMP

Campinas 2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B32e

Batista, Rangel Willians

Efeitos antioxidantes (*in vitro e in vivo*) de espécies ricas em flavonóides pertencentes ao gênero *Turnera*, família Turneraceae / Rangel Willians Batista. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Alba Regina Monteiro Souza Brito
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mitocôndria. 2. Úlcera Gástrica. 3. Flavonóides. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Antioxidant effects (*in vitro and in vivo*) of flavonoids in *Turnera diffusa* and *Turnera ulmifolia* tea

Keywords: • Mitochondria
• Gastric ulcer
• Flavonoids

Titulação: Mestrado em Farmacologia

**Banca examinadora: Profª. Drª. Alba Regina Monteiro Souza Brito
Profº. Drº. Wagner Vilegas
Profª. Drª. Elisângela Farias Silva**

Data da defesa: 29-08-2005



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:

Prof. Dr. Wagner Vilegas

Dr^a. Elisângela Farias Silva

Suplentes:

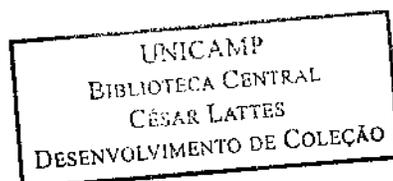
Prof^a. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

2005.08.26.9

Data 29/08/2005



Dedicatória

Dedico este trabalho e todos os outros que são construídos com auxílio das minhas mãos a todas as mulheres que me ensinam a viver e amar a vida:

Meu porto seguro de luz, amor e humildade, minha querida Mãe Teresinha;

Minha querida e sempre amada mulher dos olhos sábios, rocha e fortaleza Vó Hortência;

Meu destino e eterno aprender, minha esposa Melina; Minha estrela brilhante, Sofia.

Minhas imagens de luta, trabalho e honestidade, minha irmã Renata e minha madrinha Maria.

Agradecimentos

Como eu aprendi um dia; o que somos hoje é a somatória de tantas pessoas que passaram e estão passando pela nossa vida. Este trabalho e todos os outros que virão tem muitas mãos-pensamentos ajudando a construir e desconstruir, assim vejo e participo do mundo que me cerca; dando forma aos pensamentos, ideais e sonhos. Agradecer é o mínimo que podemos fazer, aprender é demonstrar gratidão e ensinar é a busca do verdadeiro trabalho.

Agradeço às pessoas que me incitaram desafios e colocaram as dificuldades na minha frente, pois sem vocês eu não conheceria minhas forças e meus amigos. Vocês foram meus amigos, desculpe se demorei a compreender. Agora espero ter aprendido e passado para a próxima lição.

Agradeço os ensinamentos que tive neste caminho e todos que me ajudaram a valorizar o que realmente deve ser valorizado. Sinto o vento, o ar, a Lua, o Sol e tudo que me ensina que sentir é bom; por isto agradeço a todos que estão aqui comigo e a tudo que me foi entregue até hoje, esperando merecer e dar conta de construções maiores para a Felicidade Interior e Aspirações mais Nobres de todos os seres.

Agradeço minha orientadora Profa. Dra. Alba R. S. Brito. 'As vezes acho que eu não soube distribuir o tempo de trabalho e deixei de estar mais tempo ao seu lado. Eu não soube discernir o pessoal e o profissional e deixei de aprender com você coisas além de técnicas de laboratório. Posso agradecer ser seu orientado e dizer que admiro sua busca em construir uma vida dentro deste mundo acadêmico sem perder a sensibilidade.

Expresso meus sinceros agradecimentos pela colaboração e amizade de algumas pessoas e órgãos que tornaram este trabalho possível:

A Profa. Dra. Fernanda Gadelha pela ajuda, laboratório, equipamentos e reagentes para realização de grande parte dos experimentos. E pela nova amizade.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas pela obtenção dos infusos, pela ajuda na parte química e pela boa energia que é ficar ao seu lado.

A Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo pela sutil presença em todo trabalho, pela ajuda na parte bioquímica e pela paciência, além das instrutivas conversas.

A Profa. Dra. Dulce pela ajuda na realização do experimento com DPPH.

Ao Prof. Dr. Armindo Alves pela ajuda, humildade e seu grande conhecimento de bioquímica. Posso dizer que agradeço a você desde a idéia inicial até a lapidação final deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e do Departamento de Farmacologia (Wanderlei, Zefa, Ale, Ivo, Lú e Lécio) pelo bom desempenho de suas funções e pelas conversas amigas.

Ao Kiko, técnico do laboratório da Dra. Fernanda Gadelha. Agradeço a sua ajuda técnica imprescindível para o laboratório, a sua amizade sincera, sua força e calma. Não há palavras para algumas pessoas, você e a Carol têm muita luz.

A equipe toda do laboratório de Produtos Naturais, meus amigos e companheiros de risos e choros (Pri, Maira, Victor, Anderson, Fernanda, Leônia, Bia, Lu Magri, Ana Claudia, Walber, Adriana, Carol e Fabiana).

A equipe de Gong Fu TASG e Associação CAI WEN YU, onde aprendi que tenho alunos, amigos, irmãos e professores. Aos meus mestres de Gong Fu, Sifu

Valdemir do Santos e ao Sh'i Fu Cai Wen Yu, por serem fonte de luz e inspiração de estar sempre buscando mais Sabedoria e desenvolvimento interno.

A meus amigos de graduação da saudosa Maloca e do saudoso Matão: Pin, Carolzinha, Boial, Minino, Digão, Pedro, Rafael, Top, Victor, Dúzia, Nitta, Pira, Michele, Vanini, Rachel.

Aos meus irmãos Breno e Gabriel, do Arraial do Guará, pelas barras que seguramos juntos e todo tempo de convivência.

A todo povo do Céu do Gamarra, pela força espiritual e pelos presentes de luz que recebo ao lado de vocês.

A madrinha Susana e ao padrinho Fabio, por me ensinarem a trabalhar com coragem para que a Verdade Divina brilhe neste mundo, como Mestre Raimundo Irineu Serra e o Padrinho Sebastião Motta nos deixou.

A meu pai deixo minhas lágrimas de agradecimentos, meu choro de alegria por ser teu filho e ter seu amor. Agradeço por Deus ter me colocado ao seu lado neste mundo.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto de mestrado.

Índice	8
Lista de Abreviaturas	10
Resumo	12
Abstract	13
1. Introdução	14
1.1 Radicais Livres	14
1.2 Úlcera Gástrica	18
1.3 Flavonóides	22
1.4 Turneracea	28
1.4.1 <i>Turnera diffusa</i> Wild	28
1.4.2 <i>Turnera ulmifolia</i> L	31
2. Objetivos	35
3. Materiais e Métodos	36
3.1 Coleta e identificação das espécies em estudo	36
3.2 Extração e preparação dos infusos de <i>T. ulmifolia</i> e <i>T. diffusa</i>	36
3.3 Animais utilizados nos ensaios biológicos	37
3.4 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade antioxidante dos infusos de Turneras:	38
3.4.1 Ensaio com DPPH	38
3.4.2 Extração mitocôndrias para ensaios <i>in vitro</i>	38
3.4.3 TBARs em mitocôndrias isoladas	39
3.4.4 Grupos -SH protéicos em mitocôndrias isoladas	40
3.5 Ensaio <i>in vivo</i> da atividade antioxidante em processos de úlcera gástrica:	42
3.5.1 Úlcera por isquemia-reperfusão (I-R)	42
3.5.1.a Grupamentos –SH total na mucosa gástrica	43
3.5.1.b Concentração de TBARs na mucosa gástrica	44
3.5.2 Úlcera por HCl/Etanol após administração de inibidor de GSH	45

4. Resultados	46
4.1 Ensaaios <i>in vitro</i>	46
4.1.1 DPPH	46
4.1.2 TBARs em mitocôndrias de fígado de ratos	48
4.1.2.a Lipoperoxidação causada com adição de sistema oxidante contendo succinato e rotenona	48
4.1.2.b Lipoperoxidação causada com adição de sistema oxidante contendo Ferro e ascorbato	50
4.1.3 Oxidação compostos sulfidrilas em mitocôndrias	51
4.1.3.a Oxidação protéica causada com adição de sistema oxidante contendo ferro e ascorbato	51
4.1.3.b Oxidação protéica causada com adição de oxidante 10 μ M CaCl ₂ e 1,5 mM de fosfato inorgânico (Pi)	53
4.2 Ensaaios <i>in vivo</i> :	55
4.2.1 Úlcera por isquemia-reperfusão	55
4.2.1.a Peroxidação lipídica na mucosa gástrica de animais sujeitos a úlcera por isquemia e reperfusão	56
4.2.1.b Oxidação de grupamentos –SH proteicos e não-proteicos na mucosa gástrica de animais submetidos a isquemia e reperfusão	58
4.2.2 Grupamentos sulfidrilas na citoproteção na úlcera por HCl/Etanol	59
5. Discussão	61
6. Conclusão	71
7. Referências bibliográficas	72
8. Artigo científico submetido	85

Lista de abreviaturas:

$\cdot\text{OH}$ = radical hidroxil

$^1\text{O}_2$ = oxigênio *singlete*

AGP = ácidos graxos poliinsaturados

AMP = Adenosina Monofosfato

ATP = Adenosina Trifosfato

CAT = catalase

COX = ciclooxigenase

DPPH = 2,2 di-fenil-2-picryl-hidrazil

DTNB = 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)

EROs = espécies reativas de oxigênio

GPx = glutathiona peroxidase

GR = glutathiona redutase

GSHI = tripeptídeo GSH livre

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

HClO = radical hipoclorito

$\text{HLOO}\cdot$ = radical hidroperoxil lipídico

I.L.U = Índice de Lesão Ulcerativa

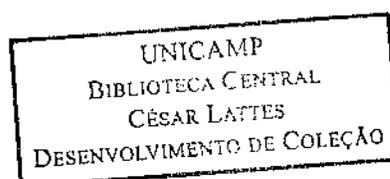
$\text{IC}_{50\%}$ = concentração do tratamento que causa inibição de 50%

I-R = isquemia-reperfusão

$\text{LO}\cdot$ = radical lipídico alcóxil

$\text{LOO}\cdot$ = radical lipídico peroxil

LPO = lipoperoxidação



LPOX = lipooxigenase

met-OH = metanol absoluto

met-OH = metanol absoluto (100%)

NO[•] = óxido nítrico

O₂^{•-} = radical superóxido

ONOO⁻ = radical peroxinitrito

Pi = fosfato inorgânico

PMIM = Permeabilidade da Membrana Interna Mitocondrial

Q[•] = radical semiquinona

r = coeficiente de regressão linear

-SH = tióis ou sulfidrilas

SOD = superóxido dismutase

TBA = ácido tiobarbitúrico

TBARs = Reagentes de ácido tiobarbitúrico

v.o. = via oral

Resumo

Em processos de ulcerogênese por isquemia-reperfusão há grande liberação de radicais livres causando peroxidação lipídica e desestruturação protéica pela oxidação de grupos –SH, o que altera funções da membrana e de enzimas e leva à disfunção celular e necrose tecidual. Ensaio fitoquímico revelou que infusos de *Turnera diffusa* e *T. ulmifolia* tem como compostos majoritários flavonas C-glicosiladas derivadas de luteonina e apigenina. A atividade antiulcerogênica destes infusos está comprovada, porém faltam estudos sobre o potencial antioxidante.

Relacionando o potencial antioxidante de flavonóides e a atividade antiúlcera do extrato, mostramos *in vitro* que 50 µg/ml salina do extrato de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* protegem em 58 e 47% a oxidação de GSH proteico na mitocôndria oxidada por 10 µM Fe⁺² e 200 µM ascorbato, respectivamente. E proteção de 12 e 50% em mitocôndria oxidada por 1,5 mM Pi e 10µM CaCl₂, demonstrando poder de manter grupos –SH intactos durante diferentes sistemas de danos à mitocôndria.

O potencial de estabilizar a membrana foi corroborado com a diminuição na peroxidação lipídica de 62 e 67% para *T. ulmifolia* e *T. diffusa*, respectivamente. Quando testados em úlcera por isquemia-reperfusão como modelo *in vivo* houve uma diminuição no índice de úlceras de 59 e 69%; com diminuição da peroxidação lipídica de 50 e 51% e manutenção na [-SH] total de até 100% na mucosa gástrica para *T. ulmifolia* e *T. diffusa*, quando comparadas à salina.

Abstract

Turnera ulmifolia L. and *Turnera diffusa* Wild are known in folk medicine for treatment of several gastric diseases. Other studies have previously reported anti-ulcer activity and this relationship with your majority composition to be flavonoids. Natural flavonoids are known for scavenging properties on oxygen radicals *in vivo* and *in vitro*.

The oxyradicals generated during the proposed episodes of ischemia-reperfusion provoke severe changes in mitochondria-generated ROS, induce peroxidation of the membrane lipids and oxidation -SH compounds. Therefore, agents that inhibit the oxidation thiol groups, as well as lipid peroxidation, may be of high pharmacological potential.

This work showed activity antioxidant when used mitochondria systems *in vitro*, both species tea plants exhibited effect to inhibit lipid peroxidation and oxidation thiois proteins compounds induced by FeCl₂/ascorbic acid, succinate/rotenone or CaCl₂/inorganic phosphate (Pi).

Our experiments *in vivo* demonstrated effect anti-ulcer and antioxidant to both species in models ischaemia-reperfusion-ulcer-induced after administration orally tea *T. diffusa* e *T. ulmifolia* inhibit lesion ulcer index when compared with control group. And in gastric mucosa exhibited effect to inhibit lipid peroxidation or oxidation -SH total compounds. In model ethanol/HCl-ulcer-induced *Turnera ulmifolia* show effect anti-ulcer partial dependent to compounds SH and *Turnera diffusa* demonstrated to be independent effect anti-ulcer to SH compounds.

Keywords: Flavonoids, Mitochondria, Lipid peroxidation, Compounds sulphydryl oxidation, GSH, Ischemia-reperfusion, Gastric ulcer, N-etilmaleimide, *Turnera ulmifolia*, *Turnera diffusa*.

1. Introdução

1.1 Radicais Livres

Toda molécula (orgânica ou inorgânica) ou átomo, com existência independente e com um ou mais elétrons não pareados na sua última camada de valência, pode ser classificada como radical livre. Tal configuração eletrônica faz dos componentes deste grupo espécies químicas muito reativas, de meia-vida curtíssima, e muito instáveis, pois necessitam completar os pares de elétrons para se estabilizarem. Os principais radicais livres biológicos são o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o radical peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), o radical hidroperoxil lipídico ($\text{HLOO}\cdot$), oxigênio *singlete* ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), radical semiquinona (Q \cdot), radical hipoclorito (HClO) (THOMAS, 2000; HALLIWELL *et al*, 1994, 1995, 1998).

A geração destas espécies químicas acontece naturalmente nos sistemas vivos, ocorrendo por vias endógenas tais como: respiração celular, inflamações e transporte de oxigênio pela hemoglobina. As vias exógenas que geram estas espécies são: ozônio, radiação gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro (HALLIWELL *et al*, 1994, 1995, 1998). Em condições normais, a proteção biológica é conferida por um sistema antioxidante eficiente constituído por enzimas que inativam radicais livres, a saber: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e catalase (CAT), além de moléculas não-enzimáticas como o tripeptídeo glutathione livre (GSH-lv), vitaminas e microelementos. O balanço entre agentes oxidantes e sistemas antioxidantes é o que se chama *status* antioxidante fisiológico (THOMAS, 2000; McCORD, 2000).

Quando a concentração de radicais livres sobrepõe-se à capacidade antioxidante da célula, ocorre ataque oxidativo a lipídios de membrana, a proteínas estruturais e funcionais, e a ácidos nucleicos. Este ataque é denominado "estresse oxidativo" (McCORD, 2000; ANDREOLI, 2000; ARUOMA, 1995). Além disso, os produtos deste ataque oxidativo podem atuar como mediadores inflamatórios, estimulando a migração de polimorfonucleares e ativação da resposta inflamatória (ANDREOLI, 2000; McCORD, 2000).

Uma das formas mais comuns de formação de radicais livres nos organismos vivos é pela cascata que se inicia com a redução univalente da molécula de oxigênio (O_2) à água: $O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^- + 1e^- \rightarrow H_2O_2 + 1e^- \rightarrow \cdot OH + 1e^- \rightarrow H_2O$. Quando esta redução é incompleta, acontece vazamento dos intermediários da cascata que são as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$). Muitos sistemas biológicos podem gerar EROs por utilizarem o O_2 como acceptor de elétrons em suas reações, enzimáticas ou não-enzimáticas. Devido à alta reatividade e meia-vida curta, O_2^- e $\cdot OH$ reagem rapidamente com a molécula orgânica mais próxima, não possuindo alvo específico para reagir; assim seu alvo celular está relacionado ao seu sítio de formação (ANDREOLI, 2000; McCORD, 2000; HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1998).

Nos organismos aeróbios, 95 a 99% do O_2 captado da atmosfera pelos pulmões são utilizados como acceptor de elétrons na cadeia respiratória das mitocôndrias. Este processo é conhecido como respiração celular, onde há consumo de O_2 para produção de H_2O e Adenosina Trifosfato (ATP); 5% deste O_2 , porém, é reduzido a O_2^- pelo vazamento de elétrons na cadeia respiratória, no nível da coenzima Q e do complexo I (NADPH desidrogenase). Alterações no metabolismo biológico durante processos patológicos podem acentuar a produção de EROs pela

cadeia mitocondrial (ANDREOLI, 2000; McCORD, 2000; HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1998; GUTTERIDGE, 1993).

Foi constatado que as mitocôndrias das células de tecido cardíaco sujeito a processos de isquemia-reperfusão (I-R) apresentam aumento na concentração de cálcio interno e abertura inespecífica dos canais iônicos da membrana interna da mitocôndria, acompanhado por uma perda de proteínas da matriz interna com alteração na densidade plasmática. Ocorre ainda despolarização da membrana interna com inchamento ("swelling") das mitocôndrias e diminuição da atividade da ATPase, ou seja, estas alterações da cadeia respiratória levam a um maior vazamento de elétrons e maior formação de EROs (ZAMZAMI *et al.*, 1997; NIEMINEN *et al.*, 1995). Assim, os danos causados à mitocôndria durante I-R podem ser irreversíveis e induzir à morte celular e alterações funcionais do tecido (ZAMZAMI *et al.*, 1997; NIEMINEN *et al.*, 1995; GRIFFITHS e HALESTROP, 1995).

As membranas celulares são alvos freqüentes de EROs por serem ricas em complexos enzimáticos pertencentes às cadeias redutoras de O₂. A composição majoritária de ácidos graxos poliinsaturados (AGP) nas membranas celulares propicia a formação de sítios geradores de EROs, fazendo com que ocorra lipoperoxidação (LPO) pelo fácil acesso dos EROs às insaturações dos ácidos graxos (McCORD, 2000; ANDREOLI, 2000; BUEGE e AUST, 1989). Este processo degenerativo envolvendo formação e propagação de radicais lipídicos peroxil e alcóxil (LOO·, LO·), captação de O₂ e rearranjo de duplas ligações dos AGP altera a integridade e fluidez das membranas (GARDNER, 1989; BUEGE e AUST, 1989). Neste contexto patológico há alterações das membranas celulares relacionadas às funções biológicas de permeabilidade seletiva, atividade enzimática de proteínas de

membrana, transporte de íons, utilização de receptores e cadeias enzimáticas (ARUOMA e HALLIWELL, 1998; BUEGE e AUST, 1989).

O GSH-Iv é importante agente antioxidante dos organismos vivos por seqüestrar EROs e inibir a reação em cadeia de LPO seqüestrando $LOO\cdot$ e $LO\cdot$. Além de outras enzimas dependentes de grupos tióis em seus sítios ativos, a GPx atua de modo dependente de GSH-Iv, sendo a maior responsável pela remoção de H_2O_2 gerado no citosol e na mitocôndria durante estresse metabólico celular (ANDREOLI, 2000; SIES, 1993, 1999).

As células que compõem a mucosa gástrica são ricas em mitocôndrias devido a sua alta atividade metabólica e produção de muco, por isso são sítios onde ocorrem danos oxidativos nos processos de geração de lesões da mucosa gástrica (CABEZA e MOTILVA, 2001; DAS *et al.*, 1997, 1998; DAS E BANERJEE, 1993; ITO *et al.*, 1998)

1.2 Úlcera Gástrica

A defesa antioxidante da mucosa gástrica é caracterizada por alta concentração de GSH-iv e há importância maior das enzimas GSH peroxidase e GR na remoção de H_2O_2 que a CAT na mucosa gástrica (CABREZA e MOTILVA, 2001; BOYD *et al.*, 1979), mostrando a relevância de grupamentos –SH no *status* antioxidante durante ulcerogênese. Já foi demonstrado que danos induzidos por administração de etanol ou de antiinflamatórios não esteroidais, I-R e estresse na mucosa gástrica representam uma significativa diminuição dos níveis de compostos com grupamentos –SH e alta taxa de LPO. Também ocorre diminuição da atividade da GPx na mucosa gástrica tanto em animais de laboratório quanto em humanos. Isto mostra que as EROs são importantes agentes causadores de danos oxidativos nos processos de geração de lesões da mucosa gástrica (CABEZA e MOTILVA, 2001; DAS *et al.*, 1997, 1998; DAS E BANERJEE, 1993; ITO *et al.*, 1998; SZABO e VATTAY, 1990; PIHAN *et al.*, 1987).

Durante a ulcerogênese ocorre ativação da SOD, diminuição da atividade das peroxidases, com geração de $\cdot OH$ e acúmulo de H_2O_2 , resultando em aumento da LPO na mucosa gástrica e formação de radicais lipídicos. Os radicais lipídicos, por sua vez, agem como propagadores de danos oxidativos, levando a um gasto de GSH-iv e desestruturação de grupamentos –SH protéicos (DAS *et al.*, 1997; PARKS, 1988). Potentes antioxidantes como benzoato de sódio, dimetilsulfóxido, polaprezinco (Z-103), complexo zinco-cimetidina, GSH e probucol, reduzem o índice de ulceração com diminuição da LPO e diminuição da inativação de peroxidases gástricas (MIZUI *et al.*, 1981, 1987).

Nos modelos de úlcera induzida por etanol, estresse e por I-R observa-se a ativação de fosfolipase A_2 , cicloxigenase (COX) e lipooxigenase (LPOX). Isto inicia a

cascata do ácido aracônico, tendo como produtos agentes quimiotáticos e inflamatórios, tais como: leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanas. Há, então, uma infiltração de células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, que agem produzindo os radicais O_2^- e HOCl, com a função de atacar o agente patógeno (REPETTO e LLESUY, 2002; LA CASA *et al.*, 2000).

Na ulcerogênese por estresse há mudança da viscosidade nas membranas celulares da mucosa gástrica, além de aumento na fragmentação do DNA e aumento da LPO (BAGCHI *et al.*, 1999). No processo de estresse ao qual o animal é submetido para a formação de úlceras, acontece estimulação do nervo vago, levando a alterações vasculares significativas no processo de formação das lesões gástricas (BAGCHI *et al.*, 1999; DAS *et al.*, 1997).

Já no processo de úlcera induzida por etanol, além do dano direto à mucosa pelo contato do etanol, que por si só inicia a LPO, há também aumento de radicais $\cdot OH$ e O_2^- gerados pela desestruturação de cadeias enzimáticas das membranas, acentuando ainda mais a LPO. Há também infiltração leucocitária, aumento da atividade de mieloperoxidase, fragmentação do DNA, aumento de xantina oxidase e diminuição dos níveis de GSH-Iv na mucosa. Este processo apresenta ainda diminuição dos níveis de muco aderido à mucosa e da síntese de prostaglandinas, o que pode aumentar os danos à mucosa por radicais (REPETTO e LLESUY, 2002; LA CASA *et al.*, 2000)..

Grande parte dos modelos de ulcerogênese experimental apresenta, em maior ou menor grau, alterações vasculares e resposta inflamatória com relevância no processo de formação das lesões da mucosa gástrica (REPETTO e LLESUY, 2002; CHO, C. H. 2001; LA CASA *et al.*, 2000; BAGCHI *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 1998; DAS *et al.*, 1997; CHOW e CHO, 1999). O modelo de úlcera por I-R é utilizado para avaliar

resposta de fármacos em processo de ulcerogênese sem utilização de agentes químicos, patógenos ou estresse somático, como é o caso dos modelos de etanol, *H. pilory* e estresse por contenção e frio. Ou seja, a indução de formação de lesões gástricas por I-R isola os fatores ulcerativos relacionados a radicais livres formados por processos inflamatórios e vasculares (CABEZA e MOTILVA, 2001; ZIMMERMAN e GRANGER, 1994). O aumento da área total de lesão gástrica está significativamente correlacionado ao acúmulo de radicais lipídicos na mucosa gástrica, pois ratos submetidos à I-R, quando comparados a animais não ulcerados apresentam alto índice de LPO. A administração de SOD (seqüestrador de O_2) ou de rebamipide (seqüestrador de $\cdot OH$) causa diminuição da LPO e dos danos à mucosa gástrica durante I-R, mostrando correlação direta entre a ação de EROs e este modelo de ulcerogênese (NAITO *et al.*, 1995; ZIMMERMAN e GRANGER, 1994).

No modelo de produção de lesões ulcerativas por I-R, o bloqueio do fluxo sanguíneo pela artéria celíaca para o estômago inicia um processo de isquemia que impede o tecido de receber O_2 e ATP. A falta de O_2 e ATP produz alteração na razão ADP/ATP, com diminuição da atividade mitocondrial e maior vazamento de elétrons da cadeia respiratória. As falhas na redução completa do O_2 à H_2O levam a produção de espécies de O_2 que não chegaram a ser reduzidas completamente, EROs (TANAKA e YUDA, 1993 e 2001; ZIMMERMAN e GRANGER, 1994; UEDA *et al.*, 1999; NIEMINEN *et al.*, 1995; GRIFFITHS e HALESTROP, 1995; NAITO *et al.*, 1995).

Quando a obstrução da artéria celíaca é removida, ou seja, o fluxo de sangue para o tecido é restaurado, durante a reperfusão, o estômago recebe o sangue com mediadores inflamatórios e com muito O_2 livre levando a uma maior formação de EROs. A explosão deste processo oxidativo, que ocorre após o início da reperfusão, causa diminuição dos níveis de GSH-Iv, diminuição da atividade de GR e aumento do índice

de LPO na mucosa gástrica ulcerada de ratos (CABEZA e MOTILVA, 2001; TANAKA e YUDA, 1993 e 2001; ZIMMERMAN e GRANGER, 1994; UEDA *et al.*, 1999).

Há ainda outra fonte de radicais livres durante este modelo de formação de úlceras por I-R, que ocorre quando a razão ATP/ADP diminui e a concentração de Ca^{+2} intracelular aumenta, através da ação de proteases ou por oxidação, a xantina desidrogenase se transforma em xantina oxidase. A enzima xantina desidrogenase é responsável pela degradação de AMP e das purinas a ácido úrico e, em condições fisiológicas normais, utiliza NAD^+ como aceptor de elétrons. Já a xantina oxidase utiliza o O_2 como aceptor de elétrons e forma O_2^- , o que causa aumento na produção de EROs na mucosa gástrica (CABEZA e MOTILVA, 2001; ZIMMERMAN e GRANGER, 1994). A administração de allopurinol, um inibidor de xantina oxidase, reverte o quadro ulcerativo, diminuindo a LPO e os danos oxidativos (NAITO *et al.*, 1995).

Devido à baixa toxicidade relacionada à administração de flavonóides a animais de laboratório e às suas diversas propriedades antioxidantes sobre o trato gastrointestinal demonstradas experimentalmente, os flavonóides representam uma nova e promissora classe terapêutica para o tratamento de ulcera gástrica (GRACIOSO *et al.*, 2004; BORRELLI e IZZO, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999; ZUANAZZI, 1999; COOK e SAMMAN, 1996; LEWIS, 1992;).

1.3 Flavonóides

Do ponto de vista químico, flavonóides são derivados benzo-y-pirone, com baixo peso molecular, constituído de três anéis fenólicos centrais, ou anéis de pirano, referidos como A, B e C (Figura 1). São classificados de acordo com sua estrutura química e agrupados levando-se em consideração o grau de saturação e os diferentes radicais que podem se associar aos anéis da estrutura (HARBONE e WILLIANS, 2000). As maiores classes de flavonóides incluem os flavonóis, as flavonas, flavononas, catequinas (ou flavonol), antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonas e as chalconas. Muitos flavonóides ocorrem naturalmente como flavonóides glicosilados, ou seja, apresentam açúcares simples ou complexos como substituintes nos anéis centrais; dentre eles destacam-se D-glucose, L-raminose, glucoraminose, galactose, ligninas, arabinose. Flavonóides podem ser encontrados na forma de aglicona, sem açúcares ligados aos anéis centrais (DI CARLO *et al.*, 1999; COOK e SAMMAN, 1996).

Flavonóides são encontrados em todo reino vegetal, principalmente em nozes, sementes, pétalas, casca das frutas e na epiderme das folhas. São complexos polifenólicos derivados do metabolismo secundário da planta e geralmente produzidos em situações de estresse físico, químico ou em resposta ao estresse causado por microorganismos e herbívoros. Os flavonóides oferecem proteção contra radiação ultravioleta proveniente da luz solar e estabilizam membranas celulares durante épocas de seca. Estes compostos polifenólicos são também capazes de quelar metais tóxicos e de reduzir alguns agentes oxidantes lesivos durante alterações químicas e físicas relacionadas às variações do meio (HARBONE e WILLIANS, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999).

São também classificados como metabólitos primários quando estão envolvidos na coloração das flores como atrativos aos agentes polinizadores, em processos de

transferência de elétrons, na morfogênese e determinação do sexo das plantas, e também em reações de oxi-redução do oxigênio na respiração celular e na fotossíntese (HARBONE e WILLIAMS, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999; COOK e SAMMAN, 1996).

Os flavonóides estão presentes, em larga escala, na dieta alimentar do homem justificando o crescente interesse científico em elucidar os efeitos destas substâncias na saúde humana. Seus efeitos benéficos são descritos em diversas patologias, tais como: *diabetes melitus*, alergia, câncer, infecções virais, cefaléias, úlceras duodenal e gástrica, inflamações, cardiopatias, arteriosclerose e osteoporose (HARBONE e WILLIAMS, 2000). No entanto, a heterogeneidade química aliada à extensa lista de propriedades farmacológicas desta classe de compostos dificulta a elucidação de seus mecanismos fisiológicos e bioquímicos (DI CARLO *et al.*, 1999; COOK e SAMMAN, 1996).

As propriedades bioquímicas dos flavonóides dependem da posição das duplas ligações, glicosilações, número, espécie e disposição dos radicais nos anéis fenólicos (Figura 1 e Tabela 1). A maior parte dos estudos envolvendo flavonóides se concentra em suas propriedades bioquímicas e fisiológicas relacionadas ao potencial antioxidante na proteção dos sistemas biológicos durante estresse oxidativo. Pode-se observar ainda que a proteção oferecida por estas substâncias contra o ataque oxidativo induzidos por radicais livres está relacionado às diferenças na estrutura química (HARBONE E WILLIAMS, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999; VAN ACKER *et al.*, 1998).

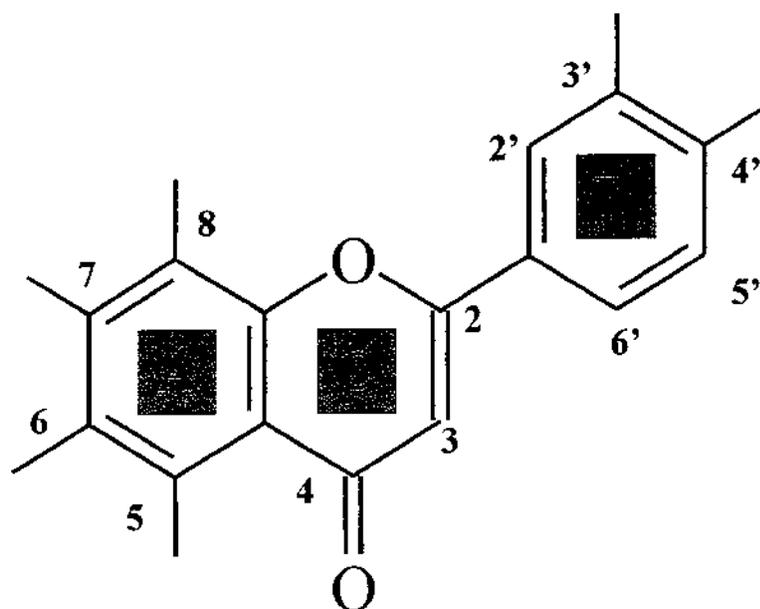


Figura 1- esqueleto químico básico dos flavonóides

Tabela 1- Características químicas e potencial antioxidante

2. Hidroxila na posição 3	eficiência de reatividade com EROs
4. Carbonil na posição 4 e uma hidroxila na posição 5	fatores essenciais para promover o potencial quelante
6. Hidrofobicidade	capacidade de estabilização de membranas celulares

Diversos flavonóides têm sido relatados como moléculas protetoras no trato gastrointestinal e como agentes antiulcerogênicos, além de antiespasmódico, anti-secretório, antidiarréico e inibidor da *H. pylori* (HARBONE e WILLIAMS, 2000). Estes compostos interferem na formação de importantes mediadores inflamatórios e na migração de células leucocitárias que produzem o "burst" inflamatório. A atividade antiinflamatória destas substâncias está relacionada à capacidade destes compostos de atuar sobre o metabolismo das vias das enzimas COX e LPOX, estimulando a síntese de prostaglandinas (ALANKO *et al.*, 1998; CONNER e GRISHAM, 1996; PIHAN *et al.*, 1987). A atividade anti-úlceras, por sua vez, pode estar relacionada à manutenção da integridade vascular da mucosa gástrica, através de mecanismos relacionados à síntese do NO[•] e seus efeitos vasodilatadores (CHO, 2001; KUBES e McCAFFERTY, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999; COOK e SAMMAN, 1996).

Outro mecanismo de ação dos flavonóides é alterar o sistema antioxidante biológico natural em diversos pontos como: aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, GPx e GR; como quelantes de íons ferro e cobre, inibindo a reação de Fenton; catalisadores no transporte de elétrons em reações de oxi-redução; e seqüestradores de EROs e de radicais lipídicos (HARBONE e WILLIAMS, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999; KNIGHT, 1995; JAESCHKE, 1995).

BANYOPADHYAY *et al.*, (2000) citam que o extrato de *Phyllanthus emblica*, rico em flavonóides, via oral, promove inibição acentuada da LPO na mucosa gástrica de animais ulcerados experimentalmente. A ingestão do fruto de *Cardia myxa* leva ao aumento da atividade de GPx e da SOD presentes no plasma, no fígado e no cólon de animais com colite experimental (AL-AWADI *et al.*, 2001). A administração do flavonóide rutina inibe a LPO, previne necroses e aumenta a atividade da GPx na mucosa gástrica em ulcerogênese induzida por etanol (LA CASA *et al.*, 2000). A

mucosa do estômago de animais submetidos a lesões por EROs em modelos de úlcera aguda e crônica, apresenta diminuição da LPO, da fragmentação do DNA e da microviscosidade das membranas após ingestão de extrato de semente de uva, rico em protoantocianidinas (BACCHI *et al.*, 1999)

A relação entre flavonóides e mecanismos antiulcerogênicos envolve, principalmente, alterações nos fatores de citoproteção da mucosa gástrica, tais como mudanças na síntese de prostaglandinas, inibição da produção de leucotrienos, aumento do conteúdo glicoproteico e da viscosidade do gel gástrico. Além disso, flavonóides também promoveriam redução da concentração do fator de ativação plaquetária, inibição do crescimento de *Helicobacter pylori*. Ocorre também inibição da bomba de próton (H⁺/K⁺) com redução da secreção ácida pelas células parietais na mucosa gástrica (DI CARLO *et al.*, 1999).

Um flavonóide com alto poder antioxidante *in vitro*, a quercetina, também é efetivo em inibir o aparecimento das lesões ulcerativas em roedores. No entanto, para este composto foi postulado que os efeitos citoprotetores sobre a mucosa gástrica acontecem através de um complexo mecanismo envolvendo, de um lado, a estimulação da síntese de prostaglandinas citoprotetoras e aumento na produção do muco protetor, e de outro, a inibição da formação de leucotrienos nesta mucosa. As propriedades antioxidantes da quercetina foram sugeridas como auxiliar no mecanismo de inibição das lesões ulcerativas (DI CARLO *et al.*, 1999).

A ação de flavonóides na regulação da secreção ácida é também sobre a bactéria *H. pylori* também tem sido relatada experimentalmente. Flavonas, flavononas e quercetina inibiram o desenvolvimento de úlceras causadas pelo *H. pylori* e também aquelas causadas por aumento da liberação de ácido clorídrico pela célula parietal em resposta a um estímulo exacerbado da histamina. Esses flavonóides seriam eficazes

em inibir a bomba H⁺/K⁺/ATPase responsável pela atividade secretora da célula parietal, o que leva à diminuição da produção de ácido clorídrico na mucosa gástrica (COOK e SAMMAN, 1996).

Há um número limitado de informações sobre absorção, degradação e excreção dos flavonóides e grupos polifenólicos em humanos e animais. Alguns estudos relatam que flavonóides que se apresentam como agliconas são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal. Há também aqueles que propõem ser a glicosilação dos flavonóides responsável pela absorção pelo intestino delgado, que ocorre por um mecanismo de transporte glicose/sódio dependente, relacionado ao tipo e posição do açúcar ligado à estrutura polifenólica do flavonóide (GALVEZ *et al.*, 1994). Tem sido proposto ainda que microorganismos da flora intestinal possam modificar os flavonóides ingeridos alterando a absorção (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999; HAVSTEEM, 1983).

Os flavonóides isolados da *Turnera diffusa*, como a arbutina, foram relacionados às propriedades terapêuticas presentes nesta erva medicinal (PIACENTE *et al.*, 2002; DOMINGUEZ e HINOJOSA, 1976). Estudos fitoquímicos revelaram que flavonas C-glicosilados derivadas da luteolina e da apigenina são os compostos majoritários no infuso das partes aéreas da *Turnera ulmifolia*, e estes seriam responsáveis pela sua atividade antiúlcera (GRACIOSO *et al.*, 2002).

1.4 Gênero *Turnera*

O gênero *Turnera*, pertencente à família *Turneraceae*, é representado por cerca de noventa espécies (SCHULTZ, 1973). As espécies aqui investigadas foram *Turnera diffusa* Wild. e *Turnera ulmifolia* L. O uso da infusão e/ou a decocção da parte aérea *T. ulmifolia* e *T. diffusa* é relatado pela medicina popular desde as Guianas até a região nordeste do Brasil, para o tratamento de doenças inflamatórias tais como otites, nefrites, furunculoses e outras doenças do trato gastrintestinal, respiratório e reprodutor (SCHULTZ, 1973; PIO CORREA, 1984; PEREZ *et al.*, 1984).

1.4.1 *Turnera diffusa* Wild.

Encontrada praticamente em toda a América, a *Turnera diffusa* Wild. (Figura 2) aparece em campos e jardins desde o Amazonas até São Paulo. A espécie é conhecida popularmente em vários países da América Latina como Damiana, embora o nome popular possa se referir a outras espécies da família das Turneráceas. A *T. diffusa* Wild. possui flores amarelas com 8-12 mm, cálice tomentoso penta-dentado, pétalas espatuladas e estames curtíssimos. Os frutos têm cápsula subglobosa com 4-5 mm (PIO CORRÊA, 1984).

Esta espécie é um arbusto pubescente, muito ramoso, de até 2 m de altura. Possui folhas pecioladas, mais ou menos ovado-rombeas, espatuladas ou oblanceoladas, obtusas ou agudas, quase sempre cuneadas na base, com 1-2 cm de comprimento. As bordas das folhas são revolutas nas margens, crenado-serradas ou duplo dentadas, profundamente nervadas e pubescentes ou glabras na página superior e tomentoso-pubescentes ou apenas pilosas na página inferior; os pedúnculos são muito curtos (PIO CORRÊA, 1984).



Figura 2: *Turnera diffusa* Wild

Índios mexicanos e cubanos utilizam o infuso da planta inteira de *T. diffusa* como expectorante, diurético, afrodisíaco e para o tratamento de espermatorréia, otites e nefrites (FRYER, 1965; PEREZ *et al.*, 1984). É citado também o uso da decocção de folhas secas de *T. diffusa* em distúrbios do sistema digestivo (WENIGER *et al.*, 1986; PIO CORRÊA, 1984; ISHIKURA, 1982; KRAIG, 1976).

Estudos fitoquímicos da espécie *T. diffusa* detectaram 0.15 a 0.17% de arbutina benzenóide nas folhas (TANTISEWIE *et al.*, 1969). Após triagem fitoquímica mais detalhada foi revelado que os principais compostos presentes no liofilizado desta espécie são flavonas C-glicosiladas derivadas da luteolina e da apigenina, e foi reconhecido o composto fenólico caracterizado como p-arbutina (Figura 3) (PIACENTE

et al., 2002). O conjunto de flavonóides identificados no infuso de *T. diffusa* está apresentado na tabela 2 e suas estruturas individuais podem ser visualizadas inserindo cada um dos respectivos radicais assinalados na tabela 2 (R1, R2 e R3) no local correspondente a partir da estrutura básica (figura 4).

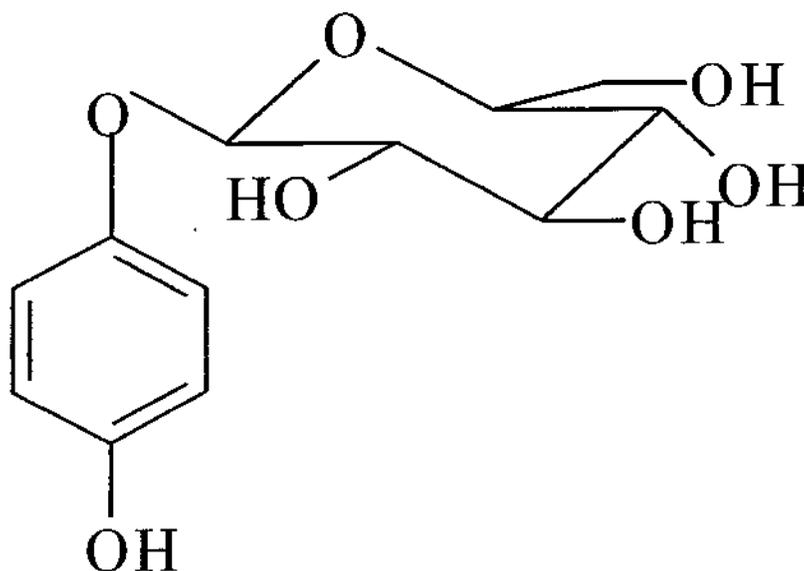


Figura 3: Composto fenólico encontrado no infuso de *T. diffusa* (p-arbutina).

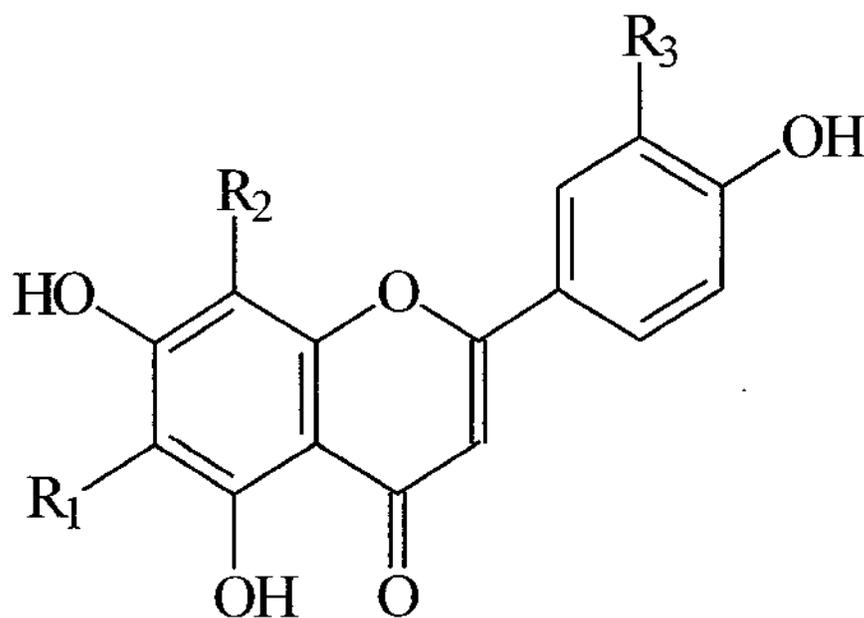


Figura 4: Núcleo básico dos flavonóides encontrados no infuso de *T. diffusa*.

Tabela 2- Compostos encontrados no infuso de *T. diffusa*

Flavonóides	R1	R2	R3
Luteonina-8-C- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 2)quinovopiranosídeo	H	qui (1 \rightarrow 2)rha	OH
Apigenina-7- β -D-glucopiranosídeo	glc	H	H
Apigenina-7-O- β -D(6"-p-coumaroil) glucopiranosídeo	glc (1 \rightarrow 6)p-coum	H	H
Vitexina-2"- α -L-rhamnopiranosídeo	H	glc (1 \rightarrow 2)rha	H
Orientina-2"-O- α -L-rhamnopiranosídeo	H	glc (1 \rightarrow 2)rha	OH
Orientina-3'-metoxi-6"-O- β -D-glucopiranosídeo	H	glc (1 \rightarrow 6)glc	OCH3

1.4.2 *Turnera ulmifolia* L.

A *Turnera ulmifolia* L., conhecida popularmente como Chanana ou Albina, é encontrada em pátios e jardins, principalmente em terrenos arenosos na América Tropical, África e Ásia (Figura 4). Na América do Sul é encontrada desde as Guianas até o sudeste do Brasil, sendo considerada invasora em algumas áreas. É uma planta arbustiva, ereta, ramificada, de 30 a 90 cm de altura (PIO CORREA, 1984).

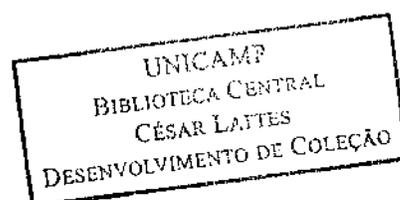


Figura 5: *Turnera ulmifolia* L.

As folhas são lanceoladas a ovado-oblongas, bastante delgadas e curtamente pecioladas, de 1 a 11 cm, apresentando s bordas asserradas, agudas ou acuminadas no ápice e, em sua maioria, estreitas na base glandular. A espécie apresenta grande variedade no tamanho e na cor das flores, e na forma e pubescência das folhas. As flores são axiliares, os pedúnculos são curtos e as brácteas podem ter a mesma largura ou serem mais largas que o cálice, lanceoladas, asserradas em sua parte baixa. O cálice é profundamente penta-lobado, com seis segmentos lanceolados, agudos ou acuminados. As pétalas são oblongas com 1 a 3 cm, inseridas no meio do cálice. Os estames são quártuplos e as anteras são alargadas e eretas. Os ovários são sésseis com estilos duplos no ápice. As plancetas são triplas com cápsula de 6 a 10 mm de largura (ROIG, 1988; PIO CORREA, 1984).

O chá da planta inteira de *T. ulmifolia* é indicado para mulheres em período de pós-parto e para aquelas que apresentam amenorréia (AYENSU, 1978). Em Cuba, a infusão das flores é utilizada para o alívio de cólicas menstruais (ROIG E MESA, 1945); na Jamaica, o extrato aquoso das folhas é utilizado como antipirético (ASPREY E THORNTON, 1955); na Colômbia, o decocto das folhas é utilizado como abortivo (GARCIA-BARRIGA, 1975).

Estudos já haviam demonstrado que o extrato hidroalcoólico 70% e infuso de *T. ulmifolia*, apresentaram significativa atividade antiulcerogênica em diversos modelos de úlcera gástrica induzida em ratos. Ambos não produziram sinais de toxicidade até doses superiores a 10g/kg, por via oral. A atividade antiulcerogênica foi relacionada com atividade antiinflamatória e com aumento dos fatores defensivos da mucosa, tais como prostaglandinas e muco (ANTÔNIO e BRITO, 1998). O conjunto de flavonóides identificados no infuso de *T. ulmifolia* está apresentado na tabela 3; e suas estruturas individuais podem ser visualizadas inserindo cada um dos respectivos radicais assinalados na tabela 3 (R1, R2 e R3) no local correspondente, a partir da estrutura básica (figura 6).



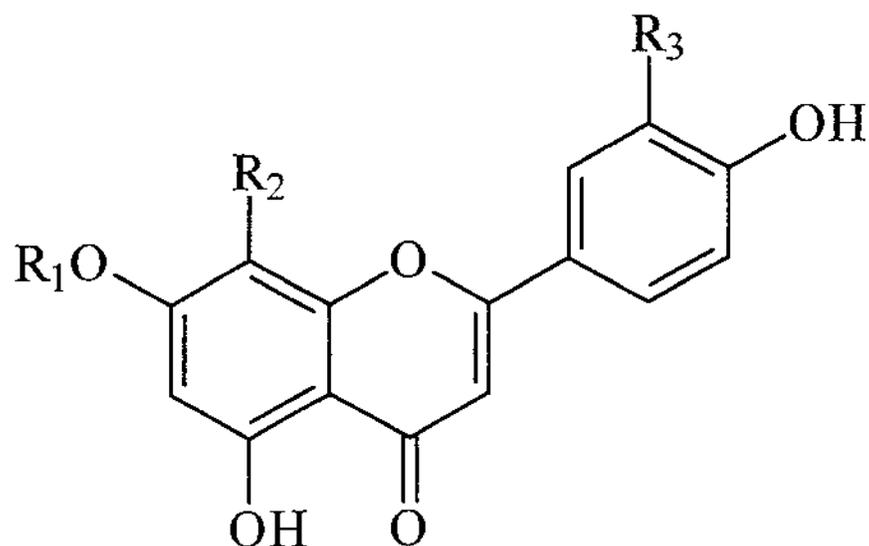


Figura 6: Núcleo básico dos flavonóides encontrados no infuso de *T. ulmifolia*.

Tabela 3 - Compostos encontrados no infuso de *T. ulmifolia*

Flavonóides	R1	R2	R3
1- vitexin-2''-O-β-D-xylopyranoside	H	glc(1→2)xyl	H
2- orientin-2''-O-β-D-glucopiranoside	H	glc(1→2)glc	OH
3- vitexin-2''-O-β-D-glucopyranoside	H	glc(1→2)glc	H
4- orientin-2''-O-α-L-rhamnopyranoside	H	glc(1→2)rha	OH
5- vitexin-2''-O-α-L-rhamnopyranoside	H	glc(1→2)rha	H
6- vitexin	H	glc	OH
7- isoorientin	glc	H	OH

2. Objetivos

2.1 Avaliar potencial pró-oxidante e antioxidante *in vitro*, em mitocôndrias isoladas, dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* em danos oxidativos a moléculas biológicas durante LPO e oxidação de grupos –SH protéicos.

2.2 Avaliar proteção antioxidante *in vivo* na produção de lesões gástricas relacionadas a LPO e oxidação de grupamentos –SH total na úlcera gástrica por radicais livres.

3. Materiais e Métodos

3.1 Coleta e identificação das espécies em estudo

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

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

3.2 Extração e preparação dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*:

Em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Wagner Villegas, do Instituto de Química, UNESP - Araraquara, foi realizado o processo de obtenção dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa*.

Depois de secas e devidamente trituradas em moinho de faca, as partes aéreas de ambas as espécies passaram por um processo de extração em água fervente (100 °C) durante 15 minutos na proporção de 50 g de matéria prima vegetal para 500 ml de água, ou seja, uma solução a 10 %. Em seguida, após resfriamento em temperatura ambiente, o material foi filtrado e levado ao liofilizador. O rendimento do infuso liofilizado obtido de *T. diffusa* foi de aproximadamente 4% e o do infuso de *T. ulmifolia* de 7,5 % (WAGNER *et al.*, 1984).

3.3 Animais utilizados nos ensaios biológicos

Para a determinação da atividade antiulcerogênica por I-R, amostras obtidas de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* foram testadas via oral, diluídas em salina (NaCl 0,9%), na dose de 500 mg do liofilizado vegetal por quilograma de peso do animal.

Foram utilizados ratos *Wistar* albinos, machos, pesando entre 200 e 250 g. Para a avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo HCl/Etanol, foram utilizados camundongos *Swiss* albinos, machos, pesando entre 25 e 35 g. O fígado foi extraído e as mitocôndrias isoladas para ensaios *in vitro*, de ratos *Wistar* albinos, machos, pesando entre 200 e 250 g.

Todos os animais foram aclimatados às condições do biotério por pelo menos 7 dias antes da manipulação experimental, sob temperatura (23 ± 2 °C) e ciclos claro-escuro de 12 h controlados, alimentados com ração nuvital (Nuvilab) e água à vontade. Os períodos de jejum a que foram submetidos os animais eram de 24 horas. Todos os experimentos foram iniciados no período da manhã e os animais foram distribuídos ao acaso nos diferentes grupos experimentais. Os protocolos experimentais dos testes utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas.

3.4 Ensaios *in vitro* da atividade antioxidante dos infusos de Turneras

3.4.1 Ensaios com DPPH

O reagente 2,2 di-fenil-2-pieryl-hidrazyl (DPPH), é um radical livre estável com falta de um elétron em sua estrutura, sendo usado para testar o potencial de doação de elétrons de outros compostos, como os flavonóides. O flavonóide, ao doar um elétron para o DPPH, faz com que este mude sua cor, permitindo o monitoramento da reação pelo espectrofotômetro (GAO *et al.*, 1999).

O espectrofotômetro Perkin-Elmer 1310 Lambda 3 foi calibrado com metanol absoluto (met-OH) na faixa de absorbância de 517 nm. As amostras de *Turnera diffusa* e *T. ulmifolia* foram diluídas em met-OH e adicionadas, em concentrações finais diferentes (6,25; 12,5; 18,7; 25; 50 e 75 µg/ml), a uma solução de DPPH (4 mg de DPPH em 100 ml de met-OH), completando um volume final de 3 ml. Após este procedimento, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente, protegidas da luz por 30 minutos e depois foi feita a leitura a 517 nm. Leitura de Branco (Ao) com 2 ml solução de DPPH adicionada em 1 ml de metanol. E os cálculos foram feitos pela fórmula: %A = (Ao – A / Ao) x 100.

3.4.2 Extração mitocôndrias para ensaios *in vitro*

Ratos machos *Wistar* com 200-250 g, foram mantidos em jejum prévio de 24 h e não foram tratados com nenhum extrato vegetal, apenas tiveram acesso livre à água. Para extração de mitocôndrias, o animal foi sacrificado por deslocamento cervical e foi feita incisão cirúrgica pelo plexo solar para retirada do fígado. Este foi lavado com

solução NaCl 0,9% gelada, homogeneizado e centrifugado para extração da fração mitocondrial conforme PEDERSEN *et al*, (1978). A determinação da concentração de proteínas foi realizada segundo o método proposto por GORNALL *et al.*, (1949).

3.4.3 TBARs em mitocôndrias de fígado de ratos

a) A reação foi iniciada pela adição dos infusos, diluídos em solução salina, nas concentrações de 6,25; 12,5; 18,7; 25,0; 50,0; 75,0 $\mu\text{g/ml}$ para volume final de 1 ml de solução tampão PBS (pH 7,2) composta por NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), NaH_2PO_4 (8,1 mM), K_2HPO_4 (1,5 mM); contendo 0,5 mg proteína de mitocôndria. Após incubação de 5 minutos a 30° C, adicionou-se 2 mM de succinato de potássio e 6 μM de rotenona causando um pequeno vazamento de elétrons na cadeia respiratória e formação de EROs.

Esta reação foi incubada por 30' a 30° C, homogeneizando suavemente a cada 5 minutos. A reação foi finalizada com a adição de 10 μl de BHT (100 mM), 400 μl ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (p/v), 200 μl H_3PO_4 20%, 40 μl NaOH 10 N. As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto e colocadas em banho fervente (100°C) por 20 minutos. Depois de resfriadas em temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 ml de n-butanol e centrifugou-se a 1400 g por 5 minutos para separação da capa lipídica. A leitura do sobrenadante foi realizada a 535 nm em espectrofotômetro, onde os reagentes do ácido tiobarbitúrico (TBARs) indicaram o nível da LPO.

Os dados são expressos em nanomoles de TBARs por mg de proteínas, usando para cálculo $\epsilon = 1,49 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Os experimentos foram feitos em triplicatas para cada amostra, durante três dias diferentes.

b) Em um segundo experimento, 200 μM ascorbato e 10 μM FeCl_2 foram adicionados como sistema oxidante forte, ao invés da combinação succinato/rotenona. O tampão utilizado foi o mesmo, agora com a concentração de 1 mg proteína de mitocôndria por ml. Após 5 minutos foi colocado o infuso nas mesmas concentrações ditas anteriormente, e então se seguiram os mesmos procedimentos do primeiro experimento do item. Metodologia modificada e adaptada de KOWALTOWSKI *et al.*, (1998;1999); SANTOS *et al.*, (1998) e de GADELHA *et al.*, (1997).

3.4.4 Grupos -SH protéicos em mitocôndrias de fígado de rato

Em meio de reação contendo tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH_2PO_4 , 1,5 mM K_2HPO_4 ; pH 7,2), com volume final de 1ml (mitocôndria 0,5 mg proteína/ml); adicionou-se 10 μM CaCl_2 e o infuso das Turneras nas concentrações de: 6,25; 12,5; 18,7; 25,0; 50,0; 75,0 $\mu\text{g/ml}$ salina. Após 5 minutos adicionou-se 1,5 mM de fosfato inorgânico (Pi). A reação foi incubada por 15' a 30° C, sendo homogeneizada suavemente a cada 5 minutos.

Após 15 minutos de incubação, adicionou-se ácido perclórico na concentração final de 7%. A amostra foi centrifugada a 4500 g por 5 min. O precipitado foi ressuspenso em 100 μl de ácido perclórico 7% e 1 ml de água e centrifugado novamente a 4500 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 0,2 ml de Triton X-100 10% (v/v) e 0,8 ml de água.

0,2 ml de tampão fosfato de potássio, pH 7,6 foi adicionado a uma alíquota de 0,8 ml de suspensão de cada amostra e agitado por 1 minuto para leitura a 412 nm (A1). Adicionou-se 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) diluído em tampão fosfato, pH 7,2, 0,2 mM concentração final. Foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos

em ausência de luz para depois ser lido novamente a 412 nm (A2) em espectrofotômetro. A fórmula utilizada para os cálculos foi: $(A2 - A1) \times 13,600 M^{-1}$

Os dados são expressos em nanomoles de -SH protéico por mg de proteínas de mitocôndria. A metodologia foi modificada e adaptada de KOWALTOWSKI *et al.*, (1998; 1999), SANTOS *et al.*, (1998) e JOCELYN (1987). Os experimentos foram feitos em triplicatas para cada amostra, em três dias diferentes.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

3.5 Ensaios *in vivo* da atividade antioxidante em processos de úlcera gástrica:

3.5.1 Úlcera por isquemia-reperfusão (I-R)

Este modelo de ulcerogênese foi realizado de acordo com o método descrito por UEDA (1989). Ratos machos *Wistar* com aproximadamente 250 g após jejum foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (n=8), sendo que quatro desses grupos passaram por I-R e um não:

1. **Sham:** animais manipulados e I-R, porém não tratados
2. **Salina:** tratados via oral (v.o.) salina (NaCl 0,9%) em dose-volume final de 10 ml/kg e I-R
3. ***Turnera diffusa*:** 500 mg/kg diluídos em salina (v.o.) em dose-volume final de 10 ml/kg e I-R
4. ***T. ulmifolia*:** 500 mg/kg diluídos em salina (v.o.) em dose-volume final de 10 ml/kg e I-R
5. **Normal:** não tratado apenas manipulado como os outros grupos, porém não ulcerados, ou seja, não passaram por I-R

Após tratamento v.o., esperou-se 30 minutos para então administrar via intramuscular cloridrato de quetamina (0,1 ml/kg) e xilazina (0,2 ml/kg) para anestesiá-los os ratos. Foi feita tricotomia para abertura de uma incisão de 3 cm do lado esquerdo do abdômen. A artéria aorta foi localizada e, posteriormente, a artéria celíaca na qual foi pinçado com um grampo microvascular, aproximadamente 0,5 cm da artéria aorta, impedindo o fluxo sanguíneo por 30 minutos, causando isquemia. A reperfusão é feita com a retirada do grampo. No final de 60 minutos de reperfusão, o animal é sacrificado por ensanguinação da aorta abdominal. O estômago é retirado e aberto ao longo da

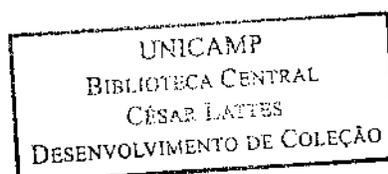
grande curvatura e lavado em salina, preso por agulhas e aberto sobre uma placa de petri com parafina. A placa foi colocada sobre uma bacia de gelo, para determinar Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.). Em todos os experimentos de indução de úlcera gástrica as lesões foram quantificadas e classificadas de acordo com a sua severidade (SZELENYI e THIEMER, 1978) em lesões nível 1 (pontos hemorrágicos < 1 mm) nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas > 3 mm de extensão), com pequenas modificações. Para cada grupo de tratamento foi calculado um Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.) obtido através da equação:

$$I.L.U = \sum (\text{lesões nível } 1 \times 1) + (\text{lesões nível } 2 \times 2) + (\text{lesões nível } 3 \times 3)$$

Logo após o cálculo do I.L.U. a mucosa é raspada com lâmina de vidro, sendo o conteúdo raspado dividido em 8 microtubos e congelado em nitrogênio líquido, e armazenados à -80°C para posteriores medidas de TBARs e grupamentos –SH.

3.5.1.a Grupamentos –SH total na mucosa

Em meio de reação contendo 500 μl de tampão Tris 0,25 mM e EDTA 20 mM, pH 8,2, foi adicionada uma alíquota (100 μl diluídas em KCl 0,15 M) do homogenato obtido a partir da raspagem da mucosa do estômago. As amostras foram agitadas e foi medida a absorbância (A1) a 412 nm em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1310 Lambda 3. Adicionou-se 10 μl do DTNB 10 mM, diluído em met-OH. Após incubação de 15 minutos protegido da luz em temperatura ambiente, foi feita a segunda leitura (A2) da absorbância em 412 nm. Para zerar o aparelho usou-se o meio de tampão (Tris-EDTA) e como branco (B) o DTNB diluído no mesmo tampão. Para calcular a concentração de grupamentos –SH usou-se a equação: $(A2 - A1 - B) \times 1,57 \text{ mM}$



Os resultados foram expressos em nanomoles de grupamentos totais por mg de proteína do tecido (nmol -SHt/mg proteínas). Os experimentos foram feitos em triplicatas para cada amostra, com n de oito animais por grupo. Metodologia adaptada de JOCELYN (1987) e FAURE e LAFOND (1995). A determinação da concentração de proteínas foi realizada segundo o método proposto por GORNALL *et al.*, (1949).

3.5.1.b Concentração de TBARs na mucosa do estômago

A amostra coletada do homogenato da mucosa gástrica adicionou-se 500 µl de KCl 0,15 M. Este conteúdo foi transferido para tubos de ensaio de vidro, contendo 0,2 ml de SDS 8,1% (sulfato de sódio duodecil), 1,5 ml de ácido acético 20% (solução ajustada pH 3,5 com NaOH), 1,5 ml de TBA 0,8% (p/v) e 0,4 ml de água destilada, para ajustar volume final a 4 ml.

Após agitação por 1 minuto, os tubos foram para banho fervente (100°C) por 1 hora. Esperado resfriamento das amostras a temperatura ambiente, adicionou-se 1 ml de água e 5 ml de n-butanol. Tubos foram tampados e agitados por 1 minuto e em seguida centrifugados a 1400 g durante 10 minutos, e medida a absorbância do sobrenadante (capa orgânica) em 535 nm no espectrofotômetro Perkin-Elmer 1310 Lambda 3 (adaptado de CABEZA e MOTILVA, 2001; OHKAWA *et al.*, 1979)).

Os resultados foram expressos em nanomoles de TBARs por mg de proteína (nmol TBARs/mg proteínas). Os experimentos foram feitos em triplicatas para cada amostra (animal), com n de oito animais por grupo. A determinação da concentração de proteínas foi realizada segundo o método proposto por GORNALL *et al.*, (1949).

3.5.2 Úlcera por HCl/Etanol após administração de inibidor de GSH

Para investigar o envolvimento dos grupos -SH endógenos no efeito protetor dos infusos de *Turneras*, foi realizado o método conforme descrito por MATSUDA (1998). Camundongos deixados em 24 horas de jejum foram tratados com N-etilmaleimida (10 mg/kg) por via subcutânea. Após 30 minutos, esses animais foram tratados, por via oral, com 500 mg/kg dos infusos de *Turnera diffusa* e *T. ulmifolia*, diluídas em salina em dose-volume final de 10 ml/kg. Decorrido o tempo de uma hora, os camundongos receberam 0,2 ml de uma solução de 0,3 M HCl em etanol 60 %, via oral. Decorridos mais 60 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e os estômagos removidos para determinação do ILU.

3.6 Análise estatística

Os resultados farmacológicos relacionados aos ensaios de indução de úlcera gástrica estão expressos como média \pm desvio padrão (dp) da média. Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de Dunnett quando se buscou comparar cada grupo teste em relação aos resultados obtidos para o grupo controle (salina) ou o teste *a posteriore* de Tukey, quando se buscou comparar os grupos entre si. Os dados dos experimentos *in vitro* foram analisados por ANOVA não-paramétrica com teste de Kruskal-Wallis, comparando todas as concentrações dos infusos com a amostra sem infuso. O nível de significância mínimo foi de “ $p < 0,05$ ” em todas as análises.

4. Resultados

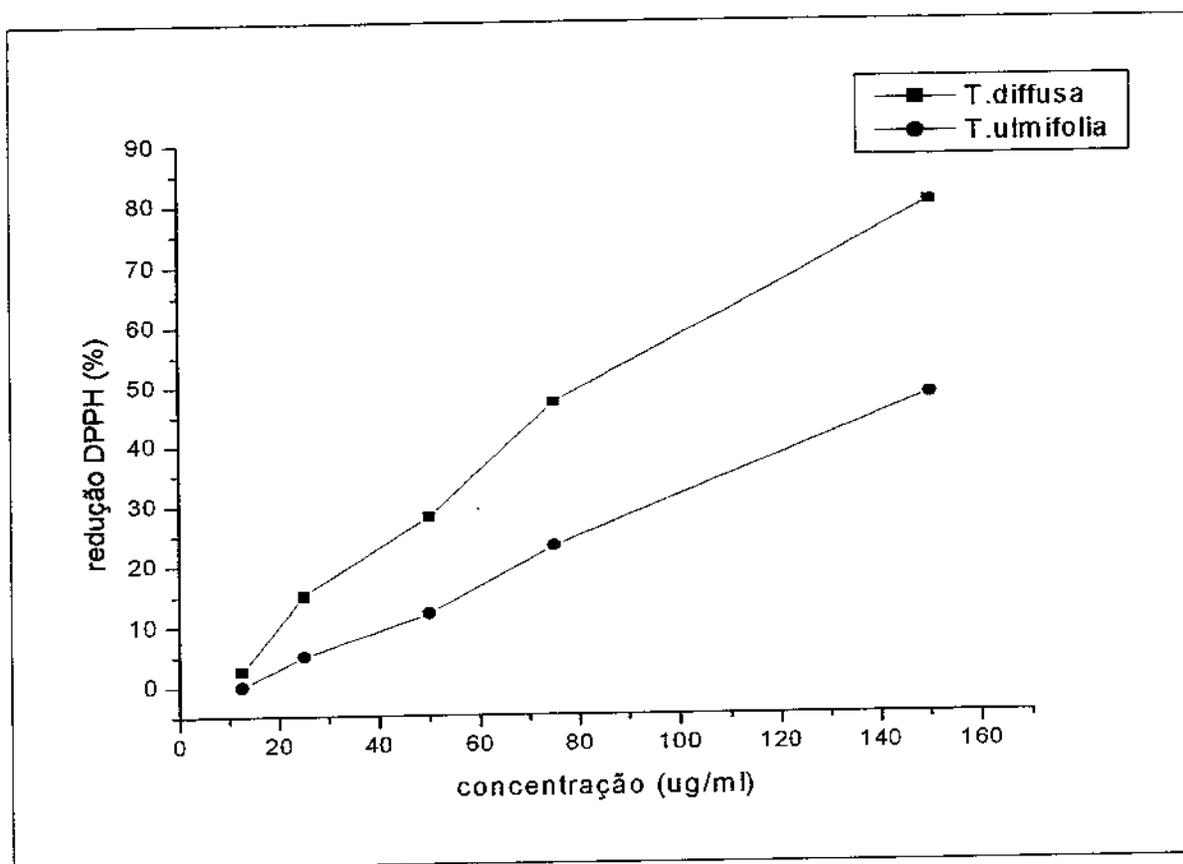
4.1 Ensaio *in vitro*

4.1.1 DPPH

Muitos métodos são utilizados para analisar a atividade antioxidante de materiais biológicos e o método mais simples e comum utilizado para investigar a atividade sequestradora de polifenóis é a utilização do radical livre estável DPPH como reagente cromógeno (GAO *et al.*, 1999). O mecanismo desta reação consiste no seqüestro, pelo DPPH, de um átomo de hidrogênio de um doador polifenólico (antioxidante). Esta reação envolve uma mudança de cor do DPPH de violeta para amarelo que pode ser monitorada pela absorbância a 515 nm (LEBEU *et al.*, 2000).

Os experimentos partiram das concentrações: 6,25; 12,5; 18,7; 25; 50; 75 e 150 µg dos infusos de *T. ulmifolia* e *T. diffusa* diluídos por ml metanol. Os dados representam média ± desvio padrão de três experimentos, e foram expressos pela porcentagem de redução do DPPH.

Figura 7. Porcentagem de redução do DPPH para *T. diffusa* e *T. ulmifolia*



A espécie *Turnera diffusa* apresentou inibição da redução do radical DPPH com $IC_{50\%}$ (concentração do tratamento que causa inibição de 50%) de 80 µg/ml que é aproximadamente duas vezes (1,74 vezes) menor que a $IC_{50\%}$ da *T. ulmifolia*, 159 µg/ml.

Ao calcular o coeficiente de regressão linear (r) observamos que a resposta de inibir a redução do DPPH causada pelas Turneras é dose-dependente para as doses testadas, pois obtivemos um r de 0,98 e 0,99 para *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, respectivamente.

4.1.2 TBARs em mitocôndrias de fígado de ratos

As membranas celulares são constituídas por uma dupla camada de fosfolípidios e proteínas e sua integridade está diretamente relacionada à funcionalidade celular, sendo assim importante o monitoramento da LPO através da concentração de TBARs como produto da oxidação e desestruturação das membranas celulares (AURUOMA, 1996). O complexo formado por substâncias reativas ao TBA é um cromóforo que pode ser lido na absorvância a 535 nm, sendo amplamente usado como biomarcadores de LPO (OHKAWA *et al.*, 1979).

4.1.2. a) Lipoperoxidação causada com adição de sistema oxidante contendo succinato e rotenona

Em meio contendo mitocôndrias extraídas de fígado de Wistar sadio incubadas por 5 minutos com concentrações crescentes das espécies de Turneras estudadas, foi adicionado o succinato, que é substrato do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial e a rotenona, que é inibidor do complexo I, acionando o transporte de elétrons com a doação de elétrons pelo succinato. Porém, a cadeia é inibida pela rotenona, havendo assim um acúmulo de coenzima Q reduzida. A incapacidade de transportar elétrons para continuar a cadeia respiratória leva a um vazamento de elétrons e formação de componentes reduzidos culminando em produção de EROs e ataque oxidativo às biomoléculas (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001).

Esperamos observar com este experimento uma possível atividade pró-oxidante, ou antioxidante, pois é reconhecido pela literatura que a resposta à oxidação pelos flavonóides é concentração-depende, apresentando-se como pró-oxidante em

concentrações altas (HARBONE e WILLIAMS, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999; COOK e SAMMAN, 1996).

Tabela 4. Efeitos *in vitro* de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* na concentração de TBARs; os dados representam média de três experimentos.

tratamento	µg/ml	ηmol TBAR	IC _%	IC _{50%}
mitocôndria	-	0.10	-	
<i>T. diffusa</i>	6.25	0.10	zero	50,0
	12.5	0.08	20	µg/ml
	18.7	0.07*	30	r=0,98
	25.0	0.06***	40	
	50.0	0.05***	50	
	75.0	0.05***	50	
<i>T. ulmifolia</i>	6.25	0.08	20	
	12.5	0.07*	30	25,0
	18.7	0.07*	30	µg/ml
	25.0	0.05***	50	r=0,99
	50.0	0.05***	50	
	75.0	0.05***	50	

ANOVA, KW=54,0; teste de Dunn; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

A tabela 4 mostra que ambas as espécies testadas não apresentam atividade pró-oxidante e sim antioxidante, demonstrando uma inibição na LPO de até 50%. Para *T. diffusa* nas concentrações maiores que 18,7 µg/ml e para *T. ulmifolia* na concentração de 12,5 µg/ml já existe resposta significativa na inibição da LPO. Com IC_{50%} de 25 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente, a *T. ulmifolia* mostra duas vezes maior atividade na inibição da LPO que a *T. diffusa*. Ambas apresentam respostas extremamente significativas (***P<0,01) acima de 25,0 µg/ml. Ao calcularmos o

coeficiente de regressão linear observamos resposta dose-dependente para ambas as Turneras, com r praticamente iguais, 0,99 e 0,98.

4.1.2. b) Lipoperoxidação causada com adição de sistema oxidante contendo Ferro e ascorbato

Com o mesmo meio de reação citado acima, causamos ataque oxidativo a membrana com adição de FeCl_2 e Ascorbato e não o succinato/rotenona. Em todas as amostras adicionamos a mesma concentração de ferro/ascorbato, mudando a concentração das amostras vegetais, comparamos as diferentes concentrações testadas das Turneras com a amostra que não continha nenhuma das espécies vegetais, tendo somente o oxidante (100% LPO, 0% de inibição). Os dados estão expressos na tabela 5

Tabela 5. Efeitos *in vitro* de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* durante LPO em mitocôndrias; os dados representam média de três experimentos

Tratamento	µg/ml	nmol TBARs	IC%	IC _{50%}
FeCl ₂ /ascorb	10 µM /200µM	1.68	--	
<i>T. diffusa</i>	6,25	1.62	8	64,71µg/ml r = 0,96
	12,5	1.54	16	
	18,7	1.38 *	22	
	25,0	1.28***	31	
	50,0	1.03***	44	
	75,0	0.84***	52	
<i>T. ulmifolia</i>	6,25	1.03	45	7,7µg/ml r = 0,93
	12,5	0.88 **	52	
	18,7	0.76 **	59	
	25,0	0,74 ***	63	
	50,0	0,58***	69	
	75,0	0,49***	74	

ANOVA, KW=60,1; teste de Dunn; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Neste sistema de geração de EROs a *T. ulmifolia* apresentou uma atividade de inibição da LPO 8,4 vezes maior que a *T. diffusa* ao analisarmos as IC_{50%}, 7,7 µg/ml e 64,7 µg/ml, respectivamente. Quando comparamos a amostra que não foi tratada às diferentes concentrações da mesma espécie vegetal obtemos resposta significativa (** P<0,01) da *T. ulmifolia* a partir de 12,5 µg/ml e para *T. diffusa* a partir de 18,7 µg/ml. Ambas as Turneras mostraram comportamento dose-dependente observando o coeficiente de regressão linear de 0,93 e 0,96, para *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, respectivamente.

4.1.3 Oxidação grupamentos -SH em mitocôndrias

4.1.3. a) Oxidação protéica causada com adição de sistema oxidante contendo ferro e ascorbato

O mesmo sistema de geração de EROs pela adição de íons ferro foi utilizada para analisar a atividade antioxidante com relação a danos oxidativos a proteínas mitocondriais. A mitocôndria é responsável pelo fornecimento de ATP para toda célula e a formação desta molécula é dependente de enzimas protéicas da cadeia respiratória. As proteínas mitocondriais são fundamentais também no controle de todo metabolismo celular, pois a oxidação de grupos -SH pode gerar pontes dissulfetos, por exemplo, e desestruturar a atividade de enzimas e proteínas de canais iônicos (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 1998).

A proteção conferida pelas Turneras quanto à oxidação de grupos -SH protéicos foi analisada comparando-se a amostra 100% oxidada (0% de proteção) onde não houve adição dos infusos ricos em flavonóides. Os dados estão expressos na tabela 6.

Tabela 6. Efeitos *in vitro* de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* na oxidação de -SH protéicos em mitocôndrias oxidadas por FeCl₂/ascorbato; os dados representam média de três experimentos.

Tratamento	µg/ml	µmol -SH	IC%	IC _{50%}
FeCl ₂ /ascorb.	10µM /200µM	48,6	--	54,9µg/ml
<i>T. diffusa</i>	6,25	51,7	--	r = 0,96
	12,5	59,3	--	
	18,7	63,0	7,4	
	25,0	75,7 *	29	
	50,0	87,8 **	49	
	75,0	97,6***	67	
<i>T. ulmifolia</i>	6,25	45,7	--	116µg/ml r = 0,98
	12,5	53,4	--	
	18,7	58,7	0,2	
	25,0	59,5 *	1,5	
	50,0	65,8 **	11	
	75,0	76,5 **	31	

ANOVA, KW=26,2; teste de Dunn; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Para ambas as Turneras observamos neste modelo respostas significativas a partir da concentração de 25,0 µg/ml, embora a *T. diffusa* tenha apresentado uma proteção duas vezes maior que a *T. ulmifolia*, quando comparamos a IC_{50%} de ambas, 54,9 e 116 µg/ml, respectivamente. As duas espécies apresentaram resposta dose-dependente com *r* igual a 0,96 e 0,98.

4.1.3. b) Oxidação protéica causada com adição de oxidante 10 μM CaCl_2 /1,5 mM de fosfato inorgânico (Pi)

Além da proteção conferida contra danos oxidativos proporcionados por alguns grupamentos -SH livres, mudanças no estado redox de -SH protéicos são importantes na transdução de sinais e controle de todo metabolismo mitocondrial e celular (COULTER *et al.*, 2000). A formação de EROs pela adição de CaCl_2 e Pi alteram a Permeabilidade da Membrana interna Mitocondrial (PMIM) devido a ataques a proteínas de membrana responsáveis pela abertura dos poros de membrana. Essas alterações danosas à mitocôndria estão relacionadas à oxidação de grupos tióis protéicos. A abertura inespecífica de poros de membrana leva à formação de mais EROs e conseqüente aumento nos danos celulares (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998).

A incubação foi no mesmo meio do experimento citado no item acima e as concentrações das Turneras também se mantiveram, sendo mudado somente o sistema oxidante para CaCl_2 e Pi. Os resultados foram expressos pela média de três experimentos e citados na tabela 7

Tabela 7. Efeitos *in vitro* de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* na concentração de -SH protéicos em mitocôndrias; os dados representam média de três experimentos.

Tratamento	µg/ml	µmol -SH	% inibição	IC _{50%}
Pi e CaCl ₂	1,5mM/10µM	84,5	--	
<i>T. diffusa</i>	6,25	98,9	17	40,1 µg/ml
	12,5	108,3	28	r = 0,93
	18,7	120,6	43	
	25,0	124,0 *	47	
	50,0	134,2 **	59	
	75,0	143,7***	70	
<i>T. ulmifolia</i>	6,25	102,9	21	40,7 µg/ml
	12,5	115,5	37	r = 0,91
	18,7	119,8	42	
	25,0	124,1 *	47	
	50,0	133,9 **	59	
	75,0	138,4***	64	

ANOVA, KW=26,0; teste de Dunn; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

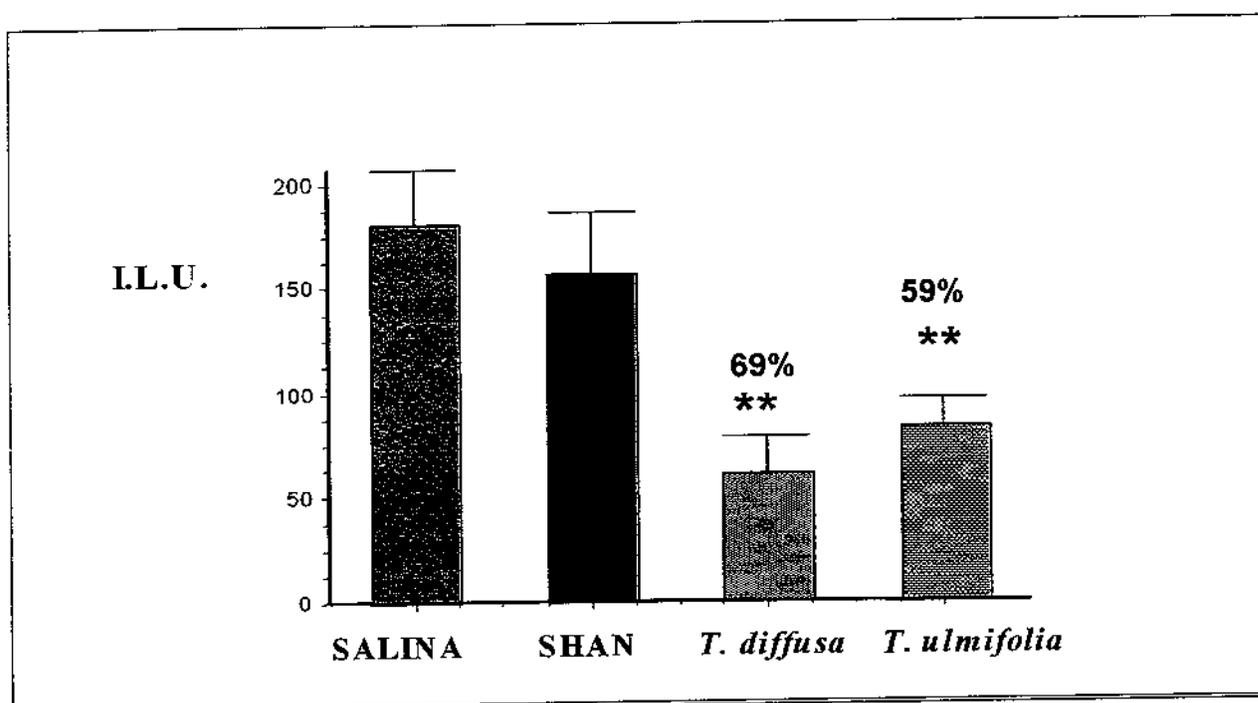
Neste modelo, quanto à oxidação de grupamentos -SH protéicos, as Turneras mostram-se significativas a partir da concentração de 25,0 µg/ml, e tanto a *T. diffusa* quanto a *T. ulmifolia*, apresentam IC_{50%} praticamente iguais, 40,1 e 40,7 µg/ml, respectivamente. Ambas as espécies apresentaram resposta dose-dependente com r igual a 0,93 e 0,91.

4.2 Ensaio *in vivo*

4.2.1 Úlcera por isquemia-reperfusão

O método de formação de lesões na mucosa gástrica por I-R foi utilizado para analisar o efeito antioxidante *in vivo*, após administração oral das espécies vegetais estudadas diluídas em salina. Os resultados estão expressos na figura 6; os dados representam média \pm desvio padrão.

Figura 6. Efeitos *T. diffusa* e *T. ulmifolia* em estômagos ulcerados por isquemia e reperfusão



ANOVA $F(3,28) = 43.88$, Teste de Dunnet ** $p < 0.01$; $n = 8$ /grupo

Ambos os infusos vegetais *T. diffusa* e *T. ulmifolia* apresentaram atividade antiúlcera no modelo de I-R, com diminuição significativa (** $P < 0,01$) do I.L.U. quando comparadas ao grupo Salina, 69 e 59%, respectivamente. Quando comparamos os

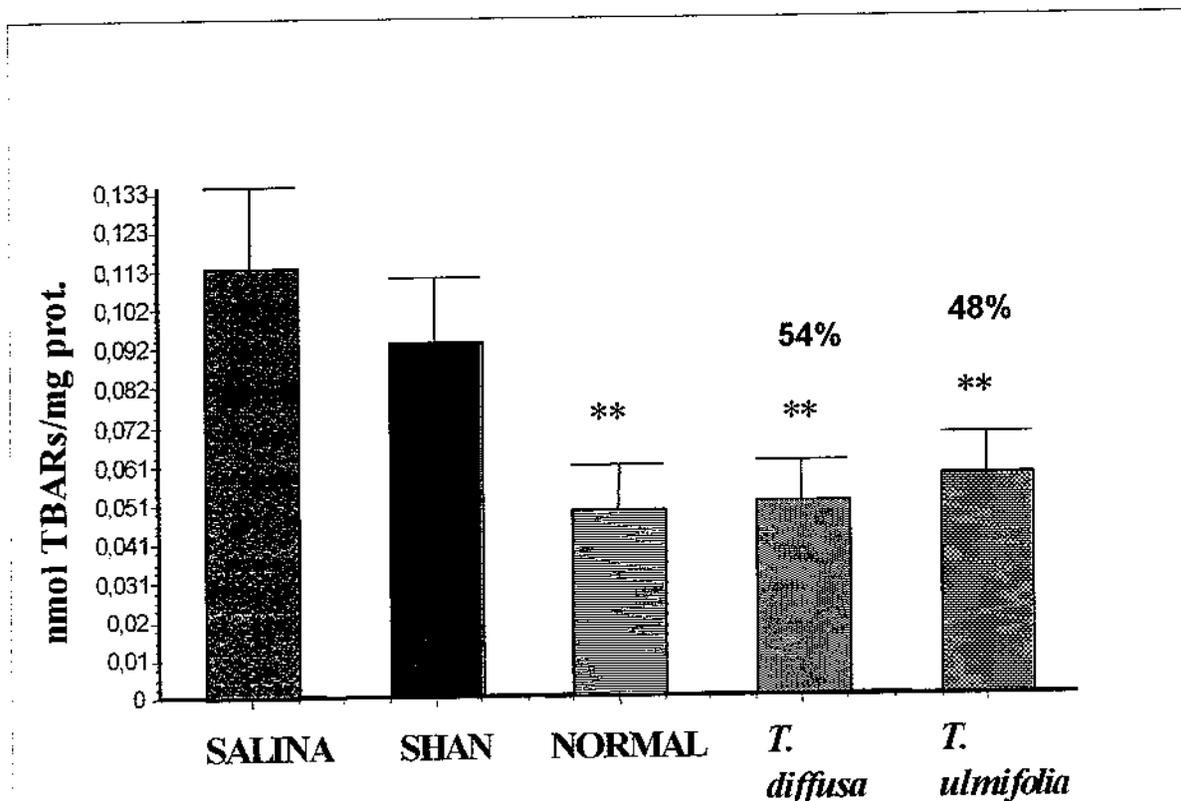
grupos entre si pelo teste de Tukey, não encontramos diferença entre os grupos tratamentos com as Turneras, ou seja, as duas espécies apresentam atividade igual neste modelo *in vivo*.

4.2.1.a Peroxidação lipídica na mucosa gástrica de animais sujeitos a úlcera por isquemia e reperfusão

Foram feitas medidas dos complexos formados por produtos da LPO e o TBA para monitorar a integridade das membranas celulares quanto ao nível de danos oxidativos causados durante a ulcerogênese por I-R. Como controle positivo foram utilizados animais sadios, grupo Normal, não foi submetido ao processo de I-R, apenas manipulados como os outros grupos: jejum, pesagem, simulação de tratamento.

Os dados foram analisados comparando ao grupo tratado com Salina pelo teste Dunnet e comparados entre si pelo teste de Tukey, com $P < 0,05$. Os resultados são expressos na figura 7, como média \pm desvio padrão de triplicatas para cada animal; n = 8 animais por grupo.

Figura 7. Efeitos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* na concentração TBARs na mucosa de estômagos ulcerados por isquemia-reperfusão



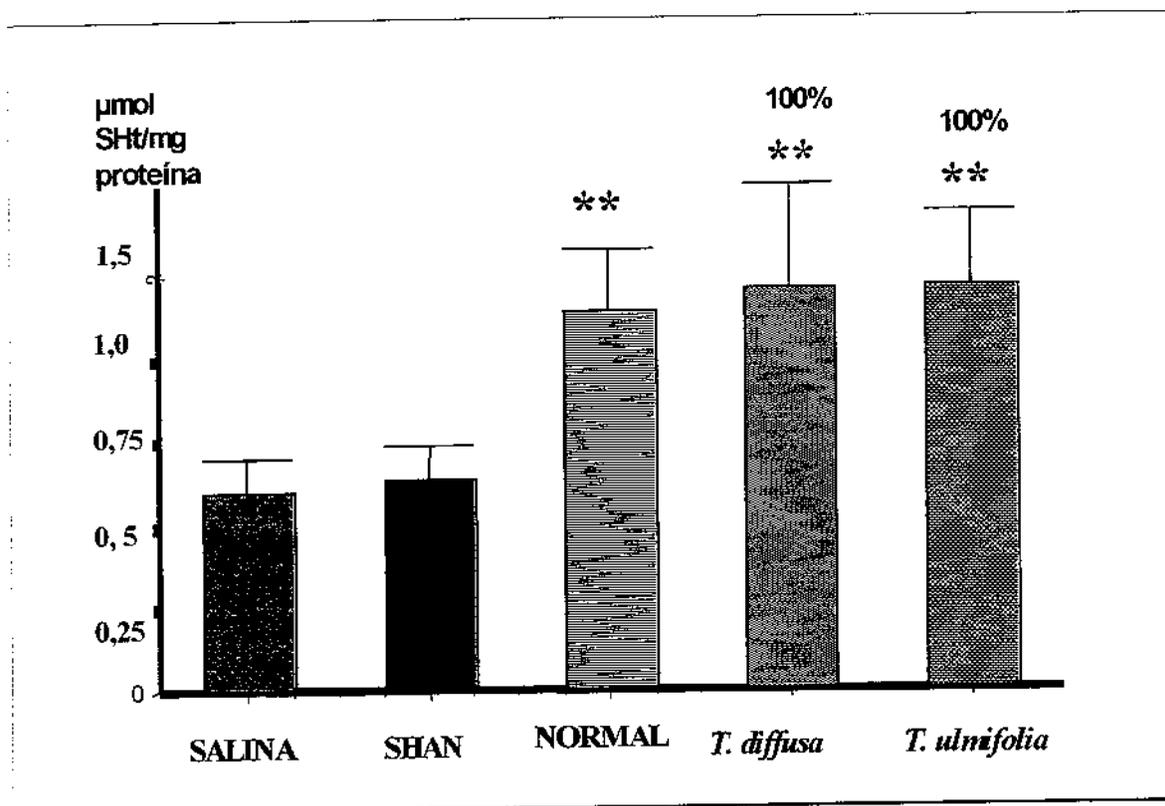
ANOVA $F(4,35) = 48.64$, Teste de Dunnet ** $p < 0.01$; $n = 8$ /grupo

Ocorreu uma diminuição significativa ($P < 0,01$) na formação de TBARs na mucosa dos animais tratados com *T. diffusa* e a *T. ulmiifolia*, 0,051 e 0,05 nmol TBARs/mg proteínas, respectivamente; quando comparadas ao grupo tratado com salina 0,113 nmol TBARs/mg proteínas. Ao compararmos os grupos tratados com Turneras entre si, não foi encontrada diferença significativa entre eles, ambas mostram um inibição na LPO muito próximas, 54% para *T. diffusa* e 49% para *T. ulmiifolia*. A produção de TBARs foi igual ($P > 0,05$) para os grupos tratados com as Turneras e o grupo Normal (0,049 nmol TBARs/mg prot), onde os animais estavam saudáveis.

4.2.1.b Oxidação de grupamentos -SH protéicos e não-protéicos na mucosa gástrica de animais submetidos a isquemia e reperfusão

Dentre os danos ocasionados durante a ulcerogênese por I-R está a desestruturação protéica por oxidação de grupamentos -SH e a diminuição da defesa antioxidante pelo gasto da molécula não-protéica de GSH livre (JOCELYN, 1987). O monitoramento da concentração de grupamentos -SH total proporciona um parâmetro de mensuração do *status* antioxidante na mucosa dos animais utilizados no experimento de ulcerogênese por I-R. Os dados estão expressos na figura 8.

Figura 8. Efeitos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* na concentração de SH total na mucosa de estômagos ulcerados por isquemia-reperfusão; os dados representam média \pm desvio padrão



ANOVA $F(4,35) = 43.99$, Teste de Dunnet $**p < 0.001$; $n = 8$ /grupo

A oxidação causada durante a ulcerogênese por I-R foi inibida 100% para as duas Turneras, pois o nível de grupamentos -SH totais foi de 1,20 e 1,22 μ moles para *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, respectivamente; e para o grupo tratado com salina foi 0,60 μ moles; essa diferença é extremamente significativa (**P,0,01). Não há diferença quando comparamos ambas com o grupo Normal, 1,14 μ moles -SH/mg prot. E também foi observado que não há diferença significativa entre as duas Turneras

4.2.2 Grupamentos -SH na citoproteção na ulcera por HCl/Etanol

Os dados mostrados na tabela 8 dos resultados obtidos com a administração subcutânea do inibidor de grupos -SH, mostram aumento significativo ($78,3 \pm 21$ *P<0,01) no ILU quando comparadas ao grupo que recebeu salina subcutânea e não recebeu a droga, $20 \pm 7,7$. A administração oral de *T. diffusa* depois da administração da N-etilmaleimida diminui o ILU para $35 \pm 17,5$; e quando administrada *T. ulmifolia* o ILU diminui para $40,4 \pm 13$ conferindo proteção significativa (** P<0,01), 45 e 58%, respectivamente. Foi constatado que não há diferença na proteção conferida pelas duas Turneras, quando comparadas entre si.

Pelo teste de Tukey temos que não há diferença significativa quando comparamos os grupos que receberam o inibidor de grupamentos -SH (35 ± 17) e o grupo que recebeu salina ($19,6 \pm 10$), quando foram tratados 30 minutos depois com *T. diffusa* via oral. Para os dois grupos tratados com *T. ulmifolia* há diferença extremamente significativa (P<0,001), quando receberam salina e quando N-etilmaleimida (s.c.).

Tabela 8. Efeito da administração das Turneras em modelo de úlcera induzido por HCl/etanol (via oral) + N-etilmaleimida (via subcutânea).

TRATAMENTOS	DOSE (mg/kg)	ILU	PROTEÇÃO %
Salina (s.c) + Salina (v.o.)	----	20 ± 8 **	74
N-etilmaleimida (s.c.) + Salina (v.o.)	10	78,3 ± 21	0
N-etilmaleimida (s.c.) + <i>T. diffusa</i> (v.o.)	500	35 ± 17 **	55
Salina (s.c) + <i>T. diffusa</i> (v.o.)	500	19,6 ± 10 **	75
N-etilmaleimida (s.c.) + <i>T. ulmifolia</i> (v.o.)	500	40,4 ± 13 **	48
Salina (s.c) + <i>T. ulmifolia</i> (v.o.)	500	10,3 ± 2,3 **	86

ANOVA F(5,47)= 28,44, Teste de Dunnet ** p<0.01; n= 8 /grupo

5. Discussão

A atividade bioquímica e farmacológica dos constituintes químicos presentes em espécies vegetais utilizados como plantas medicinais por populações nativas é a principal fonte de conhecimento e produção de medicamentos farmacêuticos (SOUZA BRITO e NUNES, 1997). Baseado em conhecimento popular, fitoquímico e outras referências bibliográficas, este estudo procurou analisar o potencial antioxidante de polifenóis hidrossolúveis contidos nos infusos liofilizados de duas espécies vegetais do gênero *Turnera*, família Turneracea.

HARBONE e WILLIAMS, (2000); DI CARLO *et al.*, (1999); COOK e SAMMAN, (1996) citam as propriedades farmacológicas dos flavonóides no tratamento de diversas patologias humanas. A atividade antiúlcera comprovada por GRACIOSO *et al.*, (2002) e ANTONIO e BRITO (1998) da espécie de *Turnera ulmifolia* L. rica em flavonóides glicosilados nos direcionou para busca de um possível potencial antioxidante desta espécie e da espécie *Turnera diffusa*, esta última por ser da mesma família, Turneracea, e apresentar composição fitoquímica muito semelhante à espécie *T. ulmifolia* (PIACENTE *et al.*, 2002).

O método baseado no reagente DPPH é utilizado para analisar a atividade seqüestradora de radicais livres encontrada em extratos vegetais contendo polifenóis e aminas aromáticas, sendo uma técnica para "screening" químico de material biológico com potencial atividade antioxidante farmacológica (ANCEREWICZ *et al.*, 1998). Escolhemos as concentrações entre 6,25 e 150 µg/ml baseados em estudos feitos por BARTH *et al.*, (1991) que analisou, *in vitro*, a atividade de inibição de LPO pelo extrato de folha de *Ginkgo Biloba* nas concentrações entre 15 e 150 µg/ml.

Como pode ser observado a espécie *Turnera diffusa* apresentou IC_{50%} 91 µg/ml e a *T. ulmifolia* apresentou IC_{50%} duas vezes maior, 159 µg/ml. Estes dados mostram que a atividade seqüestradora de radicais livres testada neste sistema químico é maior na espécie *Turnera diffusa* que a apresentada pela *T. ulmifolia*. A principal diferença entre a composição química destas duas espécies está no fato da *Turnera diffusa* apresentar a hidroquinona glicosilada conhecida como p-arbutina, além dos derivados de luteolina e apigenina também presentes na *Turnera ulmifolia* (PIACENTE *et al.*, 2002; SPENCER e SEIGLER, 1980).

Para continuar as análises *in vitro* simulando a complexidade do sistema antioxidante e o estresse oxidativo em moléculas biológicas, as mitocôndrias foram escolhidas, pois é onde podem ser encontradas a maioria das enzimas antioxidantes e todas as moléculas biológicas fundamentais, além de ser a principal sítio de formação de EROs nos tecidos em estados patológicos (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 1997; TAYLOR *et al.*, 1997).

No entanto, certos flavonóides causam um “burst” respiratório em mitocôndrias isoladas com produção de EROs (HODNICK *et al.*, 1986). Então foi selecionado um sistema com baixa indução de EROs na mitocôndria, inicialmente testando-se a atividade de inibir ou produzir LPO pelas espécies vegetais incubadas com rotenona e succinato, alterando-se apenas o funcionamento básico da cadeia respiratória. Foi observada a mesma resposta dose-dependente apresentada no sistema com DPPH. A *T. diffusa* nas concentrações maiores que 18,7 µg/ml e a *T. ulmifolia* na concentração de 12,5 µg/ml já apresentaram resposta significativa na inibição da LPO (Figura 2). Porém, neste modelo, ocorre uma inibição duas vezes maior produzida pela espécie *T. ulmifolia* quando comparada a *T. diffusa*, mostrando um resultado invertido ao encontrado no modelo químico com DPPH. Esses dados não permitiram maiores

esclarecimentos sobre a atividade diferencial entre as duas espécies seja pela presença de p-arbutina ou pelos outros flavonóides.

É encontrado na literatura que alguns flavonóides têm alto potencial quelante, ou seja, são seqüestradores de íons metálicos (HARBONE e WILLIAMS, 2000; VAN ACKER *et al.*, 1998; HANASAKI *et al.*, 1993; AFANAS'EV *et al.*, 1988). Para analisar a atividade antioxidante em um sistema com geração de radicais livres dependente de íons metálicos, foi feito um experimento induzindo LPO na mitocôndria com a adição de FeCl₂ e Ascorbato. Neste sistema de geração de EROs, ambas as *Turneras* repetiram o comportamento de resposta dose-dependente, e além disso a *T. ulmifolia* apresentou inibição da LPO muito maior que a *T. diffusa* quando comparadas as IC_{50%}, 7,7 µg/ml e 64,71 µg/ml, respectivamente.

Já ao se estudar a composição química dos infusos, tem-se que a *T. diffusa* contém dois flavonóides apigeninas glicosilados e uma luteonina e a *T. ulmifolia* não contém estes flavonóides e sim seus derivados, como a orientina e a vitexina. VAN ACKER *et al.*, (1998) demonstraram que a apigenina tem habilidade de seqüestrar íons ferro, e ambas, luteonina e apigenina, têm atividade de inibir a LPO, embora alertem que as condições do ensaio alteram as respostas de potencial quelante dos flavonóides em análises *in vitro*.

A hidroquinona p-arbutina só é encontrada na *T. diffusa*, e pode responder pela atividade de inibição da LPO. IOKU *et al.*, (1992) relatam que a p-arbutina isolada de extrato de *Origanum majorana* L. apresenta alto potencial antioxidante quando comparada ao α-tocoferol, inibindo a LPO produzida em suspensão de lipossomos. O efeito protetor dos flavonóides em inibir a LPO tem sido estabelecido dependente da sua estrutura química seqüestradora de radicais livres e/ou quelante, além de sua

habilidade de interagir e penetrar nas camadas bi-lipídicas das membranas (SANTOS *et al.*, 1997; HODNICK *et al.*, 1985; 1987).

Na *T. ulmifolia* encontramos quatro flavonóides com grupo catecol, ou seja, com uma hidroxila na posição 3' e outra na 4', e esta conformação estrutural poderia ser responsável pela atividade seqüestradora dos flavonóides (SANTOS *et al.*, 1997; HODNICK *et al.*, 1987; AFANAS'EV *et al.*, 1988). A *T. diffusa* tem apenas dois flavonóides com grupo catecol. A isorientina encontrada na *T. ulmifolia* apresenta uma glicosilação na posição C-7 que poderia ser responsável pela atividade de inibir a LPO, conforme citado por HODNICK *et al.*, (1997). Já na *T. diffusa* não é encontrado nenhum flavonóide glicosilado nesta posição. BINDOLI *et al.*, (1997) mostrou que o flavonóide similarina, isolado de *Silybum Marianum* tem atividade de inibir a LPO por estabilizar a membrana das mitocôndrias e também pela atividade quelante.

SANTOS *et al.*, (1997) utilizaram íons ferro para induzir alterações na Permeabilidade da Membrana Mitocondrial (PMIM), levando à oxidação de grupamentos -SH proteicos. Este sistema foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante de flavonóides com relação a danos oxidativos a proteínas mitocondriais. Foi demonstrado que houve inibição da oxidação de -SH proteicos pela *T. diffusa* duas vezes maior que pela incubação com *T. ulmifolia*, IC_{50%} de 54,9 e 116 µg/ml, respectivamente.

Para analisarmos o fato de que a *T. diffusa* apresenta uma proteção duas vezes maior que a *T. ulmifolia* quando à oxidação de proteínas e duas vezes menor quanto à oxidação de lipídios, procuramos avaliar a concentração de grupamentos -SH protéicos com outro sistema oxidativo. A adição de CaCl₂ e Pi leva a um acúmulo de H₂O₂, com posterior formação de ·OH que por sua vez causa oxidação de grupamentos -SH das proteínas de canais da membrana celular e posterior abertura inespecífica de poros

(KOWALTOWISKI *et al.*, 2001). Neste sistema as respostas foram iguais para ambas as espécies testadas, mostrando respostas significativas a partir de 25,0 µg/ml, com IC_{50%} de 40,1 e 40,7 µg/m para *T. diffusa* e a *T. ulmifolia*, respectivamente.

Dos experimentos *in vitro*, concluiu-se que a *T. ulmifolia* e a *T. diffusa* têm atividade antioxidante tanto no modelo químico do DPPH, quanto em modelo biológico com mitocôndria, ora uma tem maior atividade ora outra, dependendo do ensaio. Então, partiu-se para modelos *in vivo*, para analisar a atividade antioxidante dos infusos das Turneras após absorção, metabolização e distribuição dentro do organismo de ratos e camundongos submetidos à ulcerogênese experimental. A *T. ulmifolia* tem atividade antiúlcera demonstrada em diversos modelos experimentais, sendo amplamente descrita na literatura a participação de radicais livres na patogênese de lesões agudas na mucosa gástrica induzidas por etanol, estresse, anti-inflamatórios não-esteroidais e I-R. Todos estes processos de formação de úlcera induzidos em laboratório apresentam, em maior ou menor grau, alterações vasculares e resposta inflamatória com relevância no processo de formação de EROs, com produção de lesões ulcerativas na mucosa gástrica. (CABEZA e MOTILVA., 2001; UEDA, 1989; PIHAN *et al.*, 1987).

GRACIOSO *et al.*, (2002) confirmaram a atividade antiúlcera do chá de *T. ulmifolia*, citada na cultura popular brasileira (PIO CORREA, 1984), através do estudo com infuso liofilizado da parte aérea da planta na proteção antiúlcera relacionada aos flavonóides hidrossolúveis aí contidos. A partir destes estudos, escolheu-se a dose de 500 mg/kg para testes *in vivo*. O modelo de úlcera por I-R foi utilizado para avaliar resposta destes potenciais fármacos em processo de ulcerogênese. Os principais mecanismos propostos para a patogênese neste modelo de formação de lesões gástricas são: alterações vasculares com formação de EROs e “burst” inflamatório

como as principais fontes de danos oxidativos às moléculas biológicas (CABEZA e MOTILVA, 2001; ZIMMERMAN e GRANGER, 1994; ANDREWS *et al.*, 1994; UEDA, 1989). Processos patológicos que levem a alterações vasculares, como I-R, causam danos teciduais também relacionados à atividade mitocondrial (McCORD, 2000; ZAMZAMI *et al.*, 1997). Por ser uma reação em cadeia, a LPO pode começar com um radical apenas como substrato e gerar muitos radicais lipídicos, causando propagação degenerativa tecidual em muitas patologias humanas como: aterosclerose, lesões por I-R, câncer, processos inflamatórios (asma, artrite reumatóide), envelhecimento, além de doenças do sistema nervoso como Parkinson e Alzheimer (McCORD, 2000; COOK e SAMMAM, 1996; ARUOMA, 1995).

Os animais tratados com os infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia* apresentam diminuição das lesões ulcerativas quando comparadas ao grupo tratado apenas com Salina, mostrando atividade antiúlcera significativa. Neste experimento, a diferença na composição fitoquímica dos infusos não é significativa quanto à sua atividade antiúlcera, pois não foi encontrada diferença entre os grupos tratados com cada uma das Turneras.

Uma hipótese seria a inibição da formação de úlceras devido à atividade antiinflamatória de compostos polifenólicos, atuando sobre o metabolismo das vias das enzimas COX e LPOX (WALLACE *et al.*, 2000). Como já foi relatado por ANTONIO e BRITO, (1998) *T. ulmifolia* tem atividade antiinflamatória, provavelmente por inibição seletiva a COX II. GRACIOSO *et al.*, (2002) também detectaram alterações nos níveis de prostaglandinas após administração do infuso desta espécie em ratos. Outros estudos apontam para a ação de flavonóides na via do ácido aracdônico, com efeito antioxidante ou prooxidante dependendo do número e posição das hidroxilas nos anéis fenólicos (ALANKO *et al.*, 1998). E o potencial antioxidante pode ser explicado pela

ação do catecol, hidroquinona e fenol modulando as enzimas dependentes de íons ferro como a prostaglandina sintase e 5-LPOX ativadas dentro do citoplasma de leucócitos polimorfosnucleares (ALANKO *et al.*, 1993).

Os experimentos *in vitro* demonstram possível atividade quelante para ambos os infusos das Turneras. Outros autores já afirmaram a atividade quelante de diversos flavonóides (SANTOS *et al.*, 1997; BINDOLI *et al.*, 1997; ALANKO *et al.*, 1993; HODINICK *et al.*, 1987; AFANAS'EV *et al.*, 1988). Este mecanismo poderia ser o responsável pelo efeito antiúlcera, como uma atividade quelante de íons ferro proporcionada pelos flavonóides hidrossolúveis das Turneras, o que diminuiria a inativação de glutatona peroxidase, sugerindo que a inativação desta enzima pode ocorrer através de uma oxidação dependente de metais como citado por DAS *et al.*, (1997) no modelo de ulcerogênese por estresse.

O muco é um fator de proteção antiúlcera e no processo de I-R há diminuição deste fator defensivo do epitélio gástrico aumentando a formação de úlceras pelo suco digestivo (CABEZA e MOTILVA, 2001). Como foi demonstrado (GRACIOSO *et al.*, 2002; ANTONIO e BRITO, 1998) a atividade antiúlcera da espécie *Turnera ulmifolia* está relacionada com aumento do muco, e este fator de proteção da mucosa gástrica pode ser responsável pela atividade antioxidante dos infusos no modelo de I-R, já que o muco apresenta atividade seqüestradora de radicais livres (GONG *et al.*, 1990). MOJZIZ *et al.*, (2001) citam que flavonóides que estimulam a produção de muco também possuem atividade antioxidante.

A I-R produz EROs pela via enzimática Xantina-hipoxantina, como foi citado anteriormente (ANDREWS *et al.*, 1992). Existem estudos que descrevem a ação de alguns flavonóides alterando síntese e atividade das enzimas envolvidas nesta via (CHANG *et al.*, 1993). A atividade antiúlcera pode, também, ser potencializada pelos

flavonóides com a manutenção da integridade vascular da mucosa gástrica, inibição da bomba de próton (H⁺/K⁺) e redução da secreção ácida pelas células parietais na mucosa gástrica (DI CARLO *et al.*, 1999; COOK e SAMMAN, 1996; ANDREWS *et al.*, 1992).

DI CARLO *et al.* (1999) sugeriram que o efeito gastroprotetor da rutina poderia ser parcialmente explicado através da formação de um complexo citoprotetor na mucosa gástrica que não dependeria de prostaglandinas, mas sim do aumento de glicoproteínas e do aumento da viscosidade do muco protetor na mucosa gástrica. Tais efeitos seriam devido à ação direta dos flavonóides sobre a mucosa gástrica. Estes mesmos autores referiram-se a uma possível propriedade de sequestrar radicais livres, propriedade essa que poderia também contribuir para a atividade antiulcerogênica do flavonóide rutina.

A proteção dos infusos ainda pode ser devido à atividade antioxidante apresentada nos nossos experimentos *in vitro*, causando uma melhoria no *status* antioxidante sistêmico do animal, como foi citado por AL-AWADI *et al.*, (2001). Estes autores mostraram que a ingestão do fruto de *Cardia myxa* levou ao aumento da atividade de GPx e da SOD, além da diminuição da LPO e oxidação de grupos -SH presentes no plasma, no fígado e no cólon de animais com colite experimental.

A membrana mitocondrial é a principal fonte de EROs e por isso está diretamente suscetível à ação destes radicais formados durante processos patológicos do tecido levando à LPO e oxidação de grupamentos tióis (KOWALTOWISKI *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 1998). Baseados nos resultados *in vitro*, onde os flavonóides hidrossolúveis de ambas as *Turneras* demonstraram atividade de inibir a LPO e a oxidação de grupos -SH em mitocôndrias, foi analisada a concentração de TBARs e GSht na mucosa gástrica dos animais do experimentos de I-R.

Foi observada uma diminuição na formação de TBARs nos animais tratados com *T. diffusa* e a *T. ulmiifolia* quando comparadas ao grupo tratado com salina. Ambas apresentaram mesmo grau de inibição. Alguns estudos já haviam comprovado que flavonóides isolados de plantas ou como extratos ricos em polifenóis demonstravam inibição da LPO na mucosa de ratos e camundongos sujeitos a outros modelos de ulcerogênese experimental (BANYOPADHYAY *et al.* 2000; LA CASA *et al.*, 2000; BACCHI *et al.*, 1999; DI CARLO *et al.*, 1999).

Para confirmar a atividade dos infusos com relação à manutenção do *status* antioxidante da mucosa, avaliou-se a concentração de GSH total, tióis não protéicos (GSH livre, cisteína), tióis protéicos, GSH peroxidase, dentre outros. O GSH livre representa 90% dos tióis intracelulares e sua concentração e atividade antioxidante é muito alta na porção glandular do estômago quando comparado com outras regiões do trato digestivo (CABEZA, 1999; TANAKA e YUDA, 1993; 2001). A oxidação dos grupamentos tióis totais foi inibida 100% nos grupos que receberam via oral o infuso das duas *Turneras*, não havendo diferença significativa entre os dois tratamentos. As duas espécies apresentaram concentração de TBARs e GSH iguais ao grupo de animais que não foi submetido ao processo de ulcerogênese, ou seja, os tratamentos foram capazes de manter estes dois parâmetros de medida do *status* antioxidante da mucosa igual ao de um animal sadio.

Os grupamentos tióis totais (-SHt) são importantes marcadores biológicos do *status* antioxidante celular. O nível de -SH total demonstra não só a defesa antioxidante pelo tripeptídeo GSH livre, mas também mostra o dano oxidativo de -SH protéico. A diminuição dos níveis de -SH total podem indicar um maior ataque radicalar (FAURE e LAFOND, 1995). Os grupos -SH têm importante papel nos mecanismos defensivos da mucosa gástrica frente ao estresse oxidativo, principalmente os -SH intracelulares que

reagem com peróxidos e hidroperóxidos, diminuindo a propagação da LPO (GLAVIN e SZABO, 1992). Portanto, a proteção antiúlcera dos infusos com inibição da LPO poderia estar relacionada com a manutenção dos grupamentos -SH na mucosa, e por isso a significativa atividade antioxidante apresentada *in vitro*, e agora comprovada *in vivo*. Para avaliar a relação entre o efeito protetor proporcionado pelas Turneras e compostos -SH endógenos, foi utilizado o modelo de ulcerogênese com HCL/Etanol e administração subcutânea de inibidor de grupos -SH.

MIZUI e DOUTECHI, (1981), relatam que a administração de HCL/Etanol, em camundongos produz lesões necrosantes na mucosa gástrica com diminuição da camada protetora de muco; os danos necrosantes seriam devido à ação direta desses agentes lesivos sobre o epitélio gástrico causando estresse oxidativo, o que leva à LPO (GONÇALVES *et al.*, 2001; BAGCHI *et al.*, 1999). Muitos autores utilizam a administração de N-etilmaleimida (como inibidor de -SH no modelo HCL/etanol, o que induz um aumento na produção de lesões na mucosa para observar a dependência deste fator defensivo da mucosa e sua relação à proteção antiúlcera conferida por fármacos com possível atividade antioxidante (KO *et al.*, 1995; LONGUERCIO *et al.*, 1991; SZABO e VATTAY, 1990; SZABO *et al.*, 1987).

De acordo com os dados obtidos a administração oral de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, 30 minutos depois da administração da N-etilmaleimida diminuíram o ILU conferindo igual nível de proteção, quando comparados ao grupo que foi administrado só N-etilmaleimida e salina. Foi detectado que a *T. diffusa* via oral apresentou mesmo efeito protetor independente se antes foi administrado solução salina ou NEM subcutânea, o que mostra que esta espécie mantém sua atividade antiúlcera sem depender dos grupamentos -SH. Porém, o tratamento com *T. ulmifolia* demonstrou uma diminuição no efeito antiúlcera quando houve pré-administração de N-etilmaleimida, pois o ILU

aumentou 56% quando comparada ao grupo que recebeu salina antes da administração de *T. ulmifolia*. Esses dados mostram a dependência de grupamentos -SH na proteção antiúlcera conferida pela *T. ulmifolia* e não pela *T. diffusa*.

6 - Conclusão

- Não houve potencial pró-oxidante *in vitro*, na mitocôndria, para ambos os infusos, nas concentrações ensaiadas.
- As espécies da família Turneracea testadas apresentam alto potencial antioxidante nos modelos, *in vitro*, de indução de estresse oxidativo em mitocôndria.
- A *T. ulmifolia* apresenta maior inibição da lipoperoxidação *in vitro*, na mitocôndria, quando comparada à *T. diffusa*.
- Porém, a *T. diffusa* apresenta melhor proteção que *T. ulmifolia* em relação à oxidação de -SH protéicos na mitocôndria nos dois sistemas oxidantes testados.
- Ou seja, a *T. ulmifolia* confere maior proteção à oxidação de lipídios e a *T. diffusa* apresenta maior proteção à oxidação de proteínas.
- Ambos infusos apresentam atividade antiúlcera relacionada à atividade antioxidante na mucosa gástrica nos ensaios *in vivo*, por isquemia-reperfusão e HCL/Etanol.
- *T. diffusa* mantém sua atividade antiúlcera sem depender dos grupamentos -SH, já a *T. ulmifolia* mostra dependência de grupamentos -SH na proteção antiúlcera.
- Lipoperoxidação e oxidação de -SH total em estômagos de animais tratados com os dois infusos estudados mantiveram-se iguais ao grupo de animais "saudáveis", não submetidos processo de ulceração. Não houve diferença na atividade antioxidante *in vivo* entre os infusos de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*.

7 - Referências Bibliográficas

AFANAS'EV, I. B.; DOROZHKO, A. I.; BRODSKII, A. V.; KOSTYUK, V. A.; POTAPOVITCH, A. I. Chelation and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Bioch. Pharm.* 38(11):1763-1769; 1988.

ALANKO, J.; RIUTTA, A.; HOLM, P.; MUCHA, I.; VAPPATALO, H.; METSÄ-KETELÄ, T. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. *Free Radical Biology & Medicine.* 7:197-201; 1998.

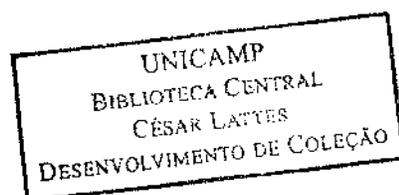
AI-AWADI, F. M.; SRIKUMAR, T. S.; ANIM, J. T.; KHAN, I. Antiinflammatory effects of *Cordia myxa* fruit on experimentally induced colitis in rats. *Nutrition*, 17: 391-396, 2001.

ANCEREWICZ, J.; MIGLIAVACCA, E.; CARRUPT, P.; TESTA, B.; BRÉE, F.; ZINI, R.; LE RIDANT, A. Structure-property relationship of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(1): 113-120, 1998.

ANDREOLI, T. E. Physiology in medicine: Free Radicals and oxidative stress. *American Journal Medicine*, 108: 650-651, 2000.

ANDREWS, F.J., MALCONTENTI-WILSON C., O'BRIEN, P.E. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into gastric mucosa after ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 266: 48G-54G, 1994.

ANDREWS, F.J., MALCONTENTI-WILSON C., O'BRIEN, P.E. Sequence of gastric mucosal injury following ischemia and reperfusion. *Dig. Dis. Sci*, 37: 1356-1361, 1992.



ANTONIO, M. A., SOUZA BRITO, A. R. M. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 61:215-228; 1998.

ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biology & Medicine* 20(5): 675-705, 1996.

ASPREY, G. F.; THORNTON, P. Medicinal plants of Jamaica, *West Indian Medicine Journal*, 4: 145-65, 1945.

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

AUTERHOFF, H. AND HAEUFEL, H.P.. Contents of Damiana drugs. *Arch. Pharm.* 301: 537, 1968a.

AUTERHOFF, H. AND HAUFEL, H.P.. Constituents of the drug Damiana. *Arch. Pharm.* 301: 537, 1968b.

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

BAGCHI M; MILNES, B. S. M.; WILLIAMS, C.B.S.; BALMOORI, J. M. S.; YE, X. B. S.; STOHS, S.; BAGCHI, D. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Nutrition Research*. 19(8) 1189-1199, 1999.

BANYOPADHYAY, S. K.; PAKRASHI, S. C.; PAKRASHI, A. The role of *Phyllanthus emblica* fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer. *J. Ethnopharm.* 70: 171-176, 2000.

BARTH, S. A.; INSELMANN, G.; ENGEMANN, R.; HEIDEMANN, H. T. Influences of *Ginkgo Biloba* on cyclosporin a induced lipid peroxidation in human

liver microsomes in comparison to vitamin E, glutathione and N-acetylcysteine. **Bioch, Pharm.** 41(10): 1521-1526, 1991.

BINDOLI, A.; CAVALLINI; SILIPRANDI, N. inhibitory actino of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. **Biochemical Pharmacology**, 26: 2405-2409, 1997.

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

BOYD, S. C.; SASAME, H. A.; BOYD, M. R. Hight concentration of glutatione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis. **Science**, 205: 1010-1012, 1979.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods enzymol.** 303-310, 1989.

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

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

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

CHOW, J. Y. C.; MA, L.; CHO, C. H. Involvement of free radicals and histamine in the potentiating action of cigarrete smoke exposure on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Free Radical Biology & Medicine** 24 (7,8): 1285-1293, 1998.

CONNER, E. O. e GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition** 12 (4), 274-277, 1996.

COOK, N. C. e SAMMAN, S. Review article: Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, 7: 66-76, 1996.

COULTER, C. V.; KELSO, G. F.; LIN, T.; SMITH, R. A. J.; MURPHY, M. P. Mitochondrially targeted antioxidants and thiol reagents. **Free Radical Biology & Medicine**, 28 (10): 1547-1554, 2000.

DAS, D. e BANERJEE, R. K. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. **Molecular and Cellular Biochemistry** 125: 115-125, 1993.

DAS, D.; BANDYPADHYAY, D.; BANERJEE, R. K. Oxidative inactivation of gastric peroxidase by site-specific generation of hydroxyl radical and its role in stress-induced gastric ulceration. **Free Radical Biology & Medicine** 24(3): 460-469, 1998.

DAS, D.; BANDYPADHYAY, D.; BHATTACHARJEE, M.; BANERJEE, R. K. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. **Free Radical Biology & Medicine** 23(1): 8-18, 1997.

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

DOMINGUEZ, X. A. e HINOJOSA, M. Mexican medicinal plants XXVIII. Isolation of 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavone from *Turnera diffusa*. **Planta Medica** 30: 68-70, 1976.

FAURE, P. e LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. **Analysis of Free Radicals in Biological Systems** 237-248, 1995.

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

GADELHA, F. R.; THOMSON, L.; FAGIAN, M. M.; COSTA, A. D. T.; RADI, R.; VERCESI, A. E. Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein tili cross-linking and lipid peroxidation. **Arch. of Biochem. and Bioph.** 345 (2): 243/250, 1997.

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

GAO, Z.; KAIXUN, H.; YANG, X.; XU, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria bacailensis* Georgi. **Bioch. Et Bioph. Acta.** 1472: 643-650, 1999.

GARCIA-BARRIGA, H. **Flora medicinal de Colombia**. Vol. 2/3. Universidad Nacional. Bogota, 1975.

GARDENER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biology & Medicine** 7: 65-86, 1989.

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

GONÇALVES, F.; PORTELLA, T.; STIPP, E.; DI STASI, L. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Mautenus aquifolium*, *Sorocea blomplandii* and *Zolemia ilicifolia*. **J. Ethnopharm.** 77: 441-447, 2001.

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

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

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, A. C. A.; Souza Brito, A. R. M. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. On mouse gastric mucosa support the Turneracea as a new source of antiulcerogenic drus. **Biol. Pharm. Bull.** 25:487-491; 2002.

GRIFFITHS, E. J.; HALESTRAP, A. P. Mitochondrial non-specific pores femain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. **Biochem. J.** 307:93-98; 1995.

GUTTERIDGDE, J. M. C. Invited review free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. **Free Rad. Res. Commun.** 19: 141-158, 1993.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet** 344 (10): 721-724, 1994.

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

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

HANASHAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, 16 (6): 845-850, 1993.

HARBONE, J.F.; WILLIAMS, C.A. Review - Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55:481-504; 2000.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, 32: 1141-1148, 1983.

HODNICK, W. F.; KUNG, F. S.; ROETTGER, W. J. ; BOHMONT, C. W.; PARDINI, R. S. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: A structure-activity study. **Biochemical Pharm.** 35 (14): 2345-2357, 1985.

HODNICK, W. F.; MILOSAVLJEVIC, E. B.; NELSON, J. H.; PARDINI, R. S. Electrochemistry of flavonoids: Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharm.** 37 (13): 2607-2611, 1987.

IOKU K.; TERAOKA, J.; NAKATANI, N. Antioxidative activity of arbutin in a solution and liposomal suspension. **Biosci. Biotech. Biochem.** 56 (10): 1658-1659, 1992.

ISHIKURA, N.. Flavonol glycosides in the flowers of *Hibiscus mutabilis* v. *versicolor*. **Agr. Biol. Chem.** 46: 1705-1706, 1982.

ITO, M., SUZUKI, Y., ISHIHARA, M., SUZUKI, Y. Anti-ulcer effects of antioxidants: effect of probucol. **European Journal of Pharmacology** 354: 189-196, 1998.

JAESCHKE, H. Mechanisms of antioxidant stress-induced acute tissue injury. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 209: 104-111, 1995.

JOCELYN, P. C. Spectrophotometric Assay of Thios. **Methods of Enz.** 143: 44-67, 1987.

KNIGHT, J. A. Diseases related to oxygen-derived free-radicals. **Ann. Clin. Lab. Sci.** 25: 111-121, 1995.

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

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTIKHO, R. F.; VERCESI, A. E. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. **The J. of Biol Chem.** 273 (21): 12766-12769, 1998.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO; R. F., VERCESI, A. E. Minireview: Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS letters** 495, 12-15, 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine.** 26(3/4):463-471; 1999.

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

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

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

LEBEU, J.; FURMAN, C.; JEAN-LUC, B.; DURIEZ, P.; TESSIER, E.; COTELLE, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids, **Free Rad. Biol. & Med.** 29(9): 900-921, 2000.

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

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

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotections of escins Ia, Ib, Iia, and lib on ethanol-induced gastric lesions in rats. **Eur. J. Pharmacol**, 373(1): 63-70, 1999.

McCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The Amer. J. of Med.** 108: 652-659, 2000.

MIZUI, T. e DOUTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Jap. J. Pharmacol.** 33: 939-945, 1981.

MIZUI, T.; SATO, H.; HIROSE, F.; DOTEUCHI, M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Scien.** 41: 755-763, 1987.

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

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; MATSUYAAMA, K.; YAGI, N.; ARAI, M.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; YOSHIDA, N.; KONDO, M. Effect of novel histamine

H₂ receptor antagonist, IT-066, on acute gastric injury induced by ischemia-reperfusion in rats, and its antioxidative properties. **Europ. J. Pharm.** 294: 47-54, 1995.

NIEMINEN, A.; SAYLOR, A. K.; TESFAI, S. A.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. **Bioch. J.** 307: 99-106, 1995.

OHKAWA, H.; NOBUKO, O.; YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem. J.** 293: 601-606, 1979.

PARKS, D. A.; WILLIAMS, T. K.; BECKMAN, J. S. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. **Am. J. Physiol.** 254: 768G-774G, 1988.

PEDERSEN, P. L.; GREENAWALT, J. W.; REYUNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMENTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Meth. Cell. Biol.** 20:411-481; 1978.

PEREZ, R. M.; OCEGUEDA, G. A.; MUNOZ, J. L.; AVILA, J. G.; MORROW, W. W. A study of the hypoglucemic effect of some Mexican plants. **J. Ethnopharmacol.** 123: 253-262, 1984.

PIACENTE, S.; CAMARGO, E. E. S.; ZAMPELLI, A.; GRACIOSO, J. S.; SOUZA-BRITO, A. R. Flavonoids and Sributin from *Tumera difusa*. **Z. Naturforsch.** 57:983-985; 2002.

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

PIO CORREA M., "Dicionário da Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas," Vol. IV, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984.

REPETTO, M. G. e LLESUY. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz. J. Méd. Biol. Res.** 35(5) 523-534, 2002.

ROIG, J.T. In: Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba. Ministerio de Cultura Editorial Científico-Técnica. **El Vedado. Havana.** Volume 2, 633-635, 1988.

ROIG, Y. e MESA, J. T. In: Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba. Ministerio de Agricultura. **Republica de Cuba. Havana.** 872p., 1945.

SANTOS, A. C.; UYEMURA, S. A.; LOPES, J. L. C.; BAZON, J. N.; MINGATTO, F. E.; CURTI, C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine.** 24(9):1455-1461; 1997.

SCHULTZ, A.R. In: Botânica sistemática. Ed. 3ª, Editora Globo, 2, 212, 1973.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine** 27 (9-10): 916-921, 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry** 215 (2): 213-219, 1993.

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

SPENCER, K. C. e SEIGLER, D. S. Deidaclin from *Turnera ulmifolia*. **Phytochem.** 19: 1863-1864, 1980.

SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUMO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linoleic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, 26 (11-12): 1313-1323, 1999.

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

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

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

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

TANAKA, J.; YUDA, Y.; INOUE, I.; YAMAKAWA, T. The role of nitric oxide in the gastric secretion induced by ischemia-reperfusion in pylorus-ligated rat. **Europ. J. of Pharm.** 424: 69-74, 2001.

TANTISEWIE, B.; RUIJGROK, H. W. L.; HEGNAUER, R. The distribution of hydrocyanic acid in the cormophytes v. on cyanogenic compounds in the parietales and in some others families. **Pharm. Weekbl.** 104: 1341, 1969.

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, 16 (7-8): 716-718, 2000.

UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; OYAMADA, H.; TANIGAWA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M. Role of free radicals and

lipid peroxidation in gastric mucosla injury induced by ischemia-reperfusion in rats.

Scand. J. Gastroenterol, 162: 55-58, 1989.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN BALEN, G. P. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Bioch. Pharm.** 56: 935-943, 1998.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. M. **Plant Drug Analysis**; Springer: Berlin, pp 163-193, 1984.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W.; REUTER, B. K.; VERGNOLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: Requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, 119:706-714, 2000.

WENIGER, B.; ROUZIER, M.; DAGUILH, R.; HENRYS, D.; HENRYS, J.H.; ANTON, T. Popular medicine of the Central Plateau of Haiti. 2. Ethnopharmacological inventory. **J. Ethnopharm.** 171: 13-30, 1986.

YAGI, K. lipid peroxides and human diseases. **Chem. Phys. Lipids**, 45: 337-351, 1976.

ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; DALLAPORTA, B.; PETIT, P. X.; KROEMER, G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. **Journal of Bioenergeytics and Biomembranes** 29 (2): 185-193, 1997.

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