BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Atividades antiúlcera e antioxidante de *Syzygium jambos* (L.) Alston

Raquel Donatini De Pasquale

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^a Tit. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2008
19278

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013886

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Donatini De Pasquale, Raquel
D677a Atividades antiúlcera e antioxidante de *Syzygium jambos*
(L.) Alston / Raquel Donatini De Pasquale. -- São Paulo, 2008.
93p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Bacchi, Elfriede Marianne

I. Mirtaceas : Farmacognosia I. T. II. Bacchi, Elfriede
Marianne, orientador.

615.3234 CDD

Raquel Donatini De Pasquale

Atividades antiúlcera e antioxidante de *Syzygium jambos* (L.) Alston

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profª Tit. Elfriede Marianne Bacchi
orientador/presidente

Profª Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima
Clélia Akiko Hiruma Lima

Profª Dra. Cristina Dislich Röpke
Cristina Dislich Röpke

Profª Dra. Helena Onishi Ferraz
Helena Onishi Ferraz

Profª Dra. Edna Tomiko Myiake Kato
Edna Tomiko Myiake Kato

São Paulo, 20 de outubro de 2008.

Aos meus pais, Marina e Antonio, pelo incentivo, apoio e carinho imensos, e por acreditarem neste trabalho e em mim, todo o meu amor e gratidão.

À minha irmã Cris pela amizade e força, que me possibilitaram seguir em frente.

Às queridas amigas

Tati, por compartilhar os momentos de alegria, por me confortar nas horas difíceis, e por me chamar à realidade tantas e tantas vezes, de forma, ao mesmo tempo, tão dura e tão doce...

Biba, que, mesmo à distância, manteve seu apoio, cumplicidade e amizade

Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Profª Titular Elfriede Marianne Bacchi, pela orientação, paciência e compreensão.

À Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Keigo Minami, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela colaboração na aquisição da espécie vegetal.

Ao Prof. Dr. Vinícius Castro Souza e Fiorella Fernanda Mazine, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela identificação da espécie vegetal.

À Profª Titular Sílvia Berlanga de Moraes Barros, pela disponibilização do laboratório e colaboração na execução do teste de atividade antioxidante.

A Diogo Pineda Rivelli e Rebeca L. de Almeida, pelo auxílio no ensaio de atividade antioxidante e amizade.

À Profª Drª Primavera Borelli e Ricardo Ambrósio Fock do departamento de análises clínicas, pela colaboração na avaliação da toxicidade subcrônica.

Às Professoras Doutoras Cristina Dislich Röpke e Helena Onishi Ferraz, pelas valiosas sugestões na discussão deste trabalho.

Ao funcionário Roberto de Jesus Honório, pelo auxílio e amizade.

À secretária Elisabete Claro de Souza Paiva, pela paciência e esclarecimentos durante todo o curso.

Aos secretários da Pós-Graduação, pelo auxílio e esclarecimentos.

Aos bibliotecários, Ângelo, Adriana e especialmente à Leila, pelo auxílio e revisão bibliográfica.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

DONATINI DE PASQUALE, R. **Atividades antiúlcera e antioxidante de *Syzygium jambos* (L.) Alston**. 2008. 93f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O jameiro (*Syzygium jambos* (L.) Alston) constitui uma das diversas espécies frutíferas e medicinais pertencentes à família Myrtaceae. O extrato hidroetanólico a 70% liofilizado de folhas de *S. jambos* apresentou atividade dose-dependente em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol acidificado, sendo que a dose de 400 mg/kg reduziu significativamente a Área Total de Lesão (81,64%) e a Área Relativa de Lesão (65,11%), em comparação ao grupo controle. Nesta dose, o extrato apresentou-se mais eficaz que o fármaco empregado como referência (lansoprazol – 30 mg/kg). No modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético, o extrato (400 mg/kg) não apresentou resultados significativos na cura das lesões. A atividade antioxidante do mesmo extrato e de quatro frações foi avaliada através da medida da capacidade seqüestrante de radicais 1,1-difenil-2-picrilidrazila. O extrato hidroetanólico a 70% liofilizado apresentou CE₅₀ de 5,36 ± 0,06 µg/mL, valor comparável ao do Trolox (CE₅₀ = 4,98 ± 0,04 µg/mL), substância antioxidante de referência. As frações clorofórmica, acetato de etila, etanólica e hidroetanólica a 50% apresentaram CE₅₀ de, respectivamente, 64,06 ± 0,68 µg/mL, 19,02 ± 0,22 µg/mL, 6,89 ± 0,12 µg/mL e 8,47 ± 0,05 µg/mL. Da fração clorofórmica do extrato foi isolado o triterpeno ácido ursólico. Na avaliação da toxicidade subcrônica através da administração oral a ratos Wistar, durante 30 dias, de três diferentes doses do extrato (400, 1000 e 2500 mg/kg), não foram observados sinais clínicos de toxicidade. As análises macroscópica e microscópica dos órgãos não mostraram alterações dignas de nota para nenhuma das doses empregadas. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos resultados das análises bioquímicas do sangue dos animais. Os resultados revelam o potencial do extrato no tratamento de úlceras gástricas, sendo necessários estudos mais aprofundados do mecanismo de ação desta atividade, bem como de toxicidade crônica.

Palavras-chave: antiúlcera, antioxidante, *Syzygium jambos*, Myrtaceae.

ABSTRACT

DONATINI DE PASQUALE, R. **Antiulcer and antioxidant activities of *Syzygium jambos* (L.) Alston**. 2008. 93f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Syzygium jambos (L.) Alston is one of the species of Myrtaceae with medicinal properties. The dried 70% hydroethanolic extract of the leaves showed a dose-response effect in ethanol/HCl-induced ulcers, significantly decreasing the total lesion area (81,64%) and relative lesion area (65,11%) compared to control group. At this dose the extract was more effective than lansoprazol (30 mg/kg), used as reference drug. The same extract at 400 mg/kg was not effective on healing acetic acid-induced ulcers. Antioxidant activity of *S. jambos* extract and four fractions was measured using 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical scavenging ability. The EC₅₀ value for the extract was $5,36 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$, while Trolox, antioxidant substance of reference, showed EC₅₀ of $4,98 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$. The tested fractions (chloroform, ethyl acetate, ethanol and 50% ethanol) showed EC₅₀ of $64,06 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$, $19,02 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$, $6,89 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ e $8,47 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, respectively. Ursolic acid was identified in the chloroformic fraction of the extract. Subchronic toxicity studies were performed by oral administration of the leaf extract to rats, during 30 days, at three different doses (400, 1000 and 2500 mg/kg). The extract did not show any clinical sign of toxicity. Macroscopic and microscopic analysis of the organs demonstrated no alterations for the three doses tested. There were no statistically differences between results of biochemical analysis of blood. These results show the potential of the extract in treatment of gastric ulcer, although more studies of mechanism of action and chronic toxicity are necessary.

Keywords: antiulcer, antioxidant, *Syzygium jambos*, Myrtaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston.	página 5
Figura 2 – Fotomicrografias de cortes histológicos de folhas de <i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston.	7
Figura 3 – Glicosídeos isolados de folhas de <i>S. jambos</i> .	11
Figura 4 – Esquema representativo do fracionamento do extrato hidroetanólico a 70% liofilizado de folhas de <i>S. jambos</i> .	23
Figura 5 – Esquema representativo do fracionamento da fração clorofórmica do extrato de folhas de <i>S. jambos</i> .	30
Figura 6 – Regressão linear da atividade antioxidante do EHEL das folhas de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	36
Figura 7 – Regressão linear da atividade antioxidante da fração hidroetanólica a 50% obtida a partir do EHEL de folhas de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	37
Figura 8 – Regressão linear da atividade antioxidante da fração etanólica obtida a partir do EHEL de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	38
Figura 9 – Regressão linear da atividade antioxidante da fração acetato de etila obtida a partir do EHEL de folhas de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	39
Figura 10 – Regressão linear da atividade antioxidante da fração clorofórmica obtida a partir do EHEL de folhas de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	40
Figura 11 – Regressão linear da atividade antioxidante do Trolox na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	41
Figura 12 – Efeito da administração oral do EHEL das folhas de <i>S. jambos</i> , nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, no modelo de indução aguda de úlcera gástrica através de etanol acidificado.	43
Figura 13 – Aspectos dos estômagos na avaliação da atividade antiúlcera do EHEL de <i>S. jambos</i> através do modelo de indução aguda por etanol acidificado.	44
Figura 14 – Efeito da administração oral do EHEL das folhas de <i>S. jambos</i> , na dose de 400 mg/kg, no modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético a 30%.	45

Figura 15 – Aspectos dos estômagos na avaliação da atividade antiúlcera do EHEL de <i>S. jambos</i> , na dose de 400 mg/kg, através do modelo de indução por ácido acético a 30%.	46
Figura 16 – Variação do consumo de água (mL) dos animais controle e tratados, avaliado a cada 2 dias, durante trinta dias, no teste de toxicidade subcrônica, através da administração oral diária do EHEL das folhas de <i>S. jambos</i> , nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg.	48
Figura 17 – Variação do consumo de ração (g) dos animais controle e tratados, avaliado a cada 2 dias, durante trinta dias, no teste de toxicidade subcrônica, através da administração oral diária do EHEL das folhas de <i>S. jambos</i> , nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg.	49
Figura 18 – Evolução da massa corpórea dos animais machos e fêmeas, avaliado a cada 2 dias, durante trinta dias, no teste de toxicidade subcrônica, através da administração oral diária do EHEL das folhas de <i>S. jambos</i> , nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg.	50
Figura 19 – Comparação entre as massas relativas de órgãos dos animais machos, controle e tratados (EHEL de <i>S. jambos</i>), no teste de toxicidade subcrônica, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg por via oral.	52
Figura 20 – Comparação entre as massas relativas de órgãos dos animais fêmeas, controle e tratados (EHEL de <i>S. jambos</i>), no teste de toxicidade subcrônica, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg por via oral.	53
Figura 21 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de rato tratado com 2.500 mg/kg de EHEL de folhas de <i>S. jambos</i> , por via oral, por 30 dias.	54
Figura 22 – Fotomicrografias de cortes histológicos de miocárdio de rato tratado com 2.500 mg/kg de EHEL de folhas de <i>S. jambos</i> , por via oral, durante 30 dias.	54
Figura 23 – Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de rato tratado com 2.500 mg/kg de EHEL de folhas de <i>S. jambos</i> , por via oral, durante 30 dias.	55
Figura 24 – Estrutura química do ácido urs-3β-hidroxi-12-en-28-óico (ácido ursólico).	59
Figura 25 – Espectro de RMN ¹ H (δ em ppm, piridina, 300 MHz) da substância (1).	61
Figura 26 – Expansão da região de 0,5 a 4 ppm do espectro de RMN ¹ H.	62

Figura 27 – Expansão da região de 4 a 9 ppm do espectro de RMN ^1H .	63
Figura 28 – Espectro de RMN ^{13}C (δ em ppm, piridina, 75,5 MHz) da substância (1).	64
Figura 29 – Expansão da região de 20 a 180 ppm do espectro de RMN ^{13}C .	65
Figura 30 – Expansão da região de 14 a 60 ppm do espectro de RMN ^{13}C .	66
Figura 31 – Radical DPPH e sua forma reduzida.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coluna filtrante da fração clorofórmica do EHEL de folhas de <i>S. jambos</i> .	página 31
Tabela 2 – Gradiente empregado na coluna cromatográfica da subfração 6 da fração clorofórmica do EHEL de folhas de <i>S. jambos</i> .	32
Tabela 3 – Rendimento das frações obtidas a partir do EHEL de <i>S. jambos</i> no fracionamento por solventes.	34
Tabela 4 – Valores de CE ₅₀ das frações do EHEL de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	35
Tabela 5 – Atividade antioxidante (AA%) do EHEL de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	36
Tabela 6 – Atividade antioxidante (AA%) da fração hidroetanólica a 50% obtida a partir do EHEL de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	37
Tabela 7 – Atividade antioxidante (AA%) da fração etanólica obtida a partir do EHEL de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	38
Tabela 8 – Atividade antioxidante (AA%) da fração acetato de etila obtida a partir do EHEL de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	39
Tabela 9 – Atividade antioxidante (AA%) da fração clorofórmica obtida a partir do EHEL de <i>S. jambos</i> na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	40
Tabela 10 – Atividade antioxidante (AA%) do Trolox na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.	41
Tabela 11 – Análise bioquímica do sangue dos animais controle e tratados, na avaliação da toxicidade subcrônica do EHEL de <i>S. jambos</i> , através da administração diária por via oral, durante 30 dias, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg.	56
Tabela 12 – Coluna filtrante da fração clorofórmica do extrato de folhas de <i>S. jambos</i> .	57
Tabela 13 – Cromatografia em coluna da CF6 de <i>S. jambos</i> .	58
Tabela 14 – Dados de RMN ¹³ C (δ em ppm, C ₅ D ₅ N, 75,5 MHz) da substância (1) comparados com os valores do ácido ursólico.	60

SUMÁRIO

	página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 <i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston	4
2.1.1 Aspectos botânicos	4
2.1.2 Química e farmacologia de <i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston	8
2.1.3 Toxicologia de <i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston	13
2.2 Trato gastrointestinal	14
2.2.1 Etiologia da úlcera gástrica	17
2.2.2 Estresse oxidativo nas lesões gástricas	19
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Coleta do material vegetal	22
4.2 Elaboração de extratos e fracionamento	22
4.3 Atividade antioxidante	24
4.4 Ensaios biológicos	25
4.4.1 Animais	25
4.4.2 Atividade antiúlcera gástrica	26
4.4.2.1 Atividade antiúlcera aguda – modelo de indução por etanol e ácido clorídrico	26
4.4.2.2 Atividade antiúlcera subcrônica – modelo de indução por ácido acético	27
4.4.3 Toxicidade subcrônica	28
4.5 Estudos fitoquímicos	30
4.5.1 Isolamento de constituinte da fração clorofórmica do EHEL	30
4.5.1.1 Cromatografia em coluna filtrante	31
4.5.1.2 Cromatografia em coluna	32

4.5.1.3 Cromatografia em camada delgada	33
4.5.1.4 Análises espectrométricas	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Rendimento do EHEL e das frações	34
5.2 Atividade antioxidante	34
5.3 Ensaio biológicos	42
5.3.1 Atividade antiúlcera gástrica	42
5.3.1.1 Atividade antiúlcera aguda – modelo de indução por etanol e ácido clorídrico	42
5.3.1.2 Atividade antiúlcera subcrônica – modelo de indução por ácido acético	45
5.3.2 Toxicidade subcrônica	47
5.4 Estudos fitoquímicos	57
5.4.1 Isolamento de constituinte da fração clorofórmica do EHEL	57
5.4.2 Elucidação estrutural	59
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	80
8 REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	93
ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP	93

1 INTRODUÇÃO

A úlcera péptica constitui desordem do trato gastrintestinal que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e tem sido, há bastante tempo, uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade (BIRDANE et al., 2007).

A etiologia da úlcera gástrica ainda não está totalmente elucidada. Fato conhecido é que ocorre um desequilíbrio entre os fatores agressivos (secreção de ácido e pepsina) e os fatores citoprotetores da mucosa gástrica (secreção de bicarbonato, secreção de muco e produção de prostaglandinas) (BORRELLI; IZZO, 2000). A infecção por *Helicobacter pylori*, o largo uso de antiinflamatórios não-esteróides, o consumo de cigarros e de bebidas alcoólicas contribuem para a formação das úlceras gástricas (LIMA et al., 2006).

Os medicamentos utilizados atualmente no tratamento de úlceras gástricas são os antiácidos, os inibidores da bomba de prótons, os antagonistas de receptor H_2 e os antibióticos para erradicação do *H. pylori* (RANG et al., 2004). No entanto, estes fármacos podem ocasionar reações adversas graves, como trombocitopenia (ZLABEK; ANDERSON, 2002), nefrite intersticial aguda (RA; TOBE, 2004), nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (FISHER; LE COUTEUR, 2001), reações anafiláticas (GONZALEZ et al., 2002), ginecomastia e impotência (SABESIN, 1993).

Além disso, no Brasil, o tratamento de úlceras gástricas é bastante caro, não sendo acessível a grande parte da população (HIRUMA-LIMA et al., 2006a). O tratamento das úlceras gástricas, dessa forma, constitui ainda um grande desafio e torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes, menos tóxicos e de custo mais baixo.

Diversas substâncias de origem vegetal, entre elas flavonóides, taninos, saponinas e terpenóides, têm apresentado atividade antiúlcera bastante significativa (BORRELLI; IZZO, 2000; LEWIS; HANSON, 1991; RODRIGUEZ; HIRUMA-LIMA; SOUZA BRITO, 2004), demonstrando o grande potencial das plantas medicinais como fontes alternativas para o tratamento de úlceras gástricas.

Myrtaceae é uma das famílias mais características da flora brasileira, apresentando potencial e significativo interesse econômico para o Brasil (JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000). Compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies distribuídas predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (BARROSO, 1984). As espécies de Myrtaceae são conhecidas por apresentarem frutos comestíveis, destacando-se a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.) e a goiabeira (*Psidium guajava* L.). Na medicina popular, as folhas são largamente utilizadas como antiinflamatórias, cicatrizantes, anti-sépticas e, especialmente, como antidiarreicas (LORENZI; ABREU MATOS, 2002). Várias espécies fornecem importantes óleos essenciais e condimentos, como o eucalipto e a pimenta. Os constituintes dessa família incluem, além de óleos essenciais, leucoantocianinas, taninos, ácidos fenólicos e ésteres, sendo rara a presença de glicosídeos cianogênicos e alcalóides (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Pertencente à família Myrtaceae, *Syzygium jambos* (L.) Alston é árvore de origem asiática, nativa da Índia e Malásia. Seus frutos são edúlos, muito apreciados pelo aroma agradável (PIO CORREA, 1969), e empregados como diuréticos, digestivos e antifebris (CRAVO, 1994). As folhas são empregadas na medicina popular como digestivas e antiinflamatórias (SLOWING; CARRETERO; VILLAR, 1996).

O extrato hidroetanólico a 70% liofilizado das folhas de *S. jambos* apresentou teores de flavonóides e taninos, de 1,2% e 43,3%, respectivamente. Administrado por via oral a ratos Wistar na dose de 400 mg/kg, o mesmo extrato inibiu em 83% a formação de ulcerações hemorrágicas induzidas por etanol acidificado, em comparação ao grupo controle (DONATINI, 2003).

Apesar do uso popular das folhas de *S. jambos*, não há, na literatura, estudos de toxicidade deste vegetal.

O presente trabalho pretende contribuir na investigação da atividade antiulcerogênica do extrato hidroetanólico a 70% de folhas de *S. jambos*, empregando modelos experimentais agudo e subcrônico de úlcera gástrica em roedores, avaliar a relação entre a ação antiúlcera e a atividade antioxidante, bem como investigar a toxicidade subcrônica do referido extrato.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Syzygium jambos* (L.) Alston

2.1.1 Aspectos botânicos

Os nomes botânicos mais freqüentemente empregados para designar a espécie em estudo são *Syzygium jambos* (L.) Alston e *Eugenia jambos* L. (INDEX KEWENSIS, 1995).

Syzygium jambos (L.) Alston constitui espécie vegetal de porte arbóreo, ramificado, atingindo de 8 a 10 metros (Fig.1A). As folhas são opostas, pecioladas, elípticas, glabras; as flores são aromáticas dispostas em corimbos ou em racemos terminais (Fig.1B); o fruto é do tipo baga globosa amarelo-rósea ou róseo-branca (Fig.1C e 1D), muito aromático e succulento (PIO CORREA, 1969).

A lâmina foliar apresenta contorno lanceolado, com aproximadamente 17 a 20 cm de comprimento e 3,5 a 4 cm de largura, ápice agudo, base cuneada e margem inteira (Fig.1E). Quanto à nervação, a folha é penínérvea, apresentando nervura marginal (DONATINI, 2003).

As folhas de *S. jambos*, transformadas em droga (Fig.1F), apresentam-se inteiras, de consistência coriácea, superfície lisa, glabra, de coloração verde pardacenta, sendo mais clara na face abaxial. Apresentam-se retorcidas, com os bordos recurvados no sentido da face adaxial. São observados pontos translúcidos por toda a superfície da lâmina foliar. Possuem odor aromático característico e sabor adstringente (DONATINI, 2003).

Figura 1 – *Syzygium jambos* (L.) Alston. **A** – Aspecto geral da planta. **B** – Ramo florido. **C** e **D** – Ramos frutificados. **E** – Folhas frescas. **F** – Droga constituída de folhas (DONATINI, 2003).

Ao microscópio, podemos reconhecer em *S. jambos* muitas das características morfológicas universais de Myrtaceae: folhas hipostomáticas, apresentando cavidades secretoras subepidérmicas, feixes vasculares bicolaterais e mesofilo dorsiventral (JOLY, 1975; METCALFE; CHALK, 1950).

A descrição microscópica das folhas de *S. jambos* é apresentada a seguir. O mesofilo é constituído de 1 a 2 camadas de parênquima paliçádico, seguidas por uma camada de células coletoras (Fig.2B). O parênquima lacunoso é constituído de diversas camadas de células braciiformes (Fig.2B). Idioblastos arredondados contendo drusas de oxalato de cálcio ocorrem principalmente próximo às superfícies foliares. Células alongadas, ramificadas e de paredes com espessamento celulósico percorrem toda a região do limbo (Fig.2A e 2C) (DONATINI, 2003).

A nervura mediana apresenta contorno plano-convexo. O feixe vascular bicolateral, disposto em arco aberto (Fig.2D), encontra-se envolvido por células com espessamento celulósico e lignificado (Fig.2F). Drusas são freqüentes no parênquima fundamental e na região floemática (Fig.2E). Cavidades secretoras são observadas junto à epiderme, sob ambas as faces, e apresentam sinais de fragmentos celulares em seu interior (Fig.2D e 2E) (DONATINI, 2003).

Não são observados tricomas em nenhuma das superfícies (DONATINI, 2003; FERRI, 1971) e não há ocorrência de cristais prismáticos de oxalato de cálcio, que normalmente são descritos em mirtáceas (METCALFE; CHALK, 1950).

Na porção distal do pecíolo, o feixe vascular apresenta-se em arco com as extremidades dirigidas para o centro (Fig.2G). Esclereídes são freqüentes na região externa ao floema (Fig.2G) e apresentam-se, em material dissociado, com formato alongado e irregular, com até três ramificações nas extremidades (Fig.2H e 2I) (DONATINI, 2003).

Figura 2 – Fotomicrografias de cortes histológicos de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston. A – Secção transversal do mesofilo: aspecto geral. Escala = 40 μm . B – Secção transversal do mesofilo: parênquima paliçádico, células coletoras, parênquima lacunoso. Escala = 20 μm . C – Secção transversal do mesofilo: detalhe evidenciando cavidade secretora subepidérmica. Escala = 20 μm . D – Nervura mediana: feixe vascular bicollateral envolvido por bainha de fibras. Escala = 100 μm . E – Superfície abaxial da nervura mediana: cavidade secretora subepidérmica; drusas na região parenquimática. Escala = 40 μm . F – Detalhe do sistema vascular: fibras com espessamento celulósico e lignificado; drusas na região parenquimática. Escala = 20 μm . G – Secção transversal do pecíolo: feixe vascular bicollateral; esclereídes na região externa ao floema. Escala = 100 μm . H e I – Tecido dissociado do pecíolo: esclereídes. Escala = 20 μm (DONATINI, 2003).

2.1.2 Química e farmacologia de *Syzygium jambos* (L.) Alston

A revisão da literatura das atividades farmacológicas e das substâncias identificadas em folhas e órgãos aéreos de espécies pertencentes aos gêneros *Syzygium* e *Eugenia* é apresentada por Donatini (2003). Neste trabalho, restringimos a revisão à espécie *Syzygium jambos* (L.) Alston e seu sinônimo botânico *Eugenia jambos* L., abordando as atividades farmacológicas já descritas, bem como as substâncias isoladas.

Os estudos de caules, folhas, flores e frutos de *S. jambos* resultaram no isolamento de diversos compostos fenólicos e triterpenóides, característicos de Myrtaceae, descritos a seguir.

Okuda e colaboradores (1982) isolaram do extrato hidrometanólico de folhas, elagitaninos e outros compostos fenólicos: pedunculagina, casuarinina, casuariina, casuarictina, telimagrandina I, estrictinina e 2,3-hexaidroxidifenoilglicose. Do extrato metanólico das folhas foi isolado o ácido 4-O- β -D-glicopiranosil-3,3',4'-tri-O-metilelágico (CHAKRAVARTY et al., 1998).

Extratos de éter de petróleo e metanólico de flores apresentaram flavonóides como principais componentes (8-hidroxi-6-metoxiflavanona, 5,7-diidroxiflavanona, 6,8-diidroxí-5-metilflavanona, 5-hidroxi-7-metoxi-6,8-dimetilflavanona e 5,7-dimetoxiflavanona) (HOANG; NGUYEN, 2004).

Os componentes voláteis de *S. jambos* foram extensamente estudados. Rao e Nigam (1969) verificaram, no óleo volátil de folhas, a presença de ocimeno, D-L- α -pineno, D-canfeno, L-limoneno, D-cânfora, cadineno, acetato de geranila, D-borneol e α -terpineol. Ainda nas folhas foram encontrados α -cariofileno, β -pineno, linalol e

trans-nerolidol (HOANG; NGUYEN, 2004). O óleo essencial dos frutos apresentou alto teor de nerolidol (16.4%) (HOANG; NGUYEN, 2004), além de mais de 80 outros componentes (GUEDES et al., 2004; VERNIN et al., 1991; WONG; LAI, 1996).

Djipa e colaboradores (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e acetônico das cascas do caule de *S. jambos* através do método de diluição em ágar em placas de petri. Ambos os extratos reduziram e, em alguns casos, inibiram o crescimento de todos os microrganismos testados, incluindo bactérias responsáveis por infecções cutâneas e diarreias. Os extratos mostraram-se particularmente efetivos contra *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e cepas coagulase negativas como *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus warneri*. Os autores atribuíram a atividade antimicrobiana ao alto teor de taninos presente nos extratos (77% e 83% para extrato aquoso e acetônico, respectivamente), uma vez que a eliminação dos taninos ocasionou a supressão desta atividade.

A atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico a 70% de folhas de *S. jambos* foi avaliada utilizando-se uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*), uma levedura (*Candida albicans*) e um fungo esporulado (*Aspergillus niger*), através do método de diluição em meio líquido em tubos. Os resultados mostraram que o extrato foi eficaz contra *S. aureus* com concentração inibitória mínima maior que 200 µg/mL e menor que 300 µg/mL. O mesmo extrato não mostrou atividade contra *E. coli* na concentração de 1000 µg/mL e não foi eficaz contra os fungos nas duas concentrações utilizadas (1000 e 2000 µg/mL) (DONATINI, 2003).

Triterpenos isolados do extrato etanólico das cascas do caule de *S. jambos* (friedelina, β-amirina, ácido betulínico e lupeol) apresentaram atividade

antidermatofítica frente aos microrganismos *Microsporium audouinii*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton soudanense*, em método de diluição em ágar (KUIATE et al., 2007).

Entre 50 espécies vegetais testadas quanto à atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*, o extrato etanólico de folhas de *S. jambos* foi o quinto mais eficaz em método de difusão em discos, depois dos extratos de *Mammea americana*, *Marchantia polymorpha*, *Mangifera indica* e *Callistemon citrinus* (FRAME et al., 1998).

O extrato etanólico das folhas de *Eugenia jambos* apresentou atividade antiviral *in vitro* contra herpes simplex tipo I, em concentrações variando de 5 a 25 µg/mL, e inibiu a replicação do vírus da estomatite vesicular (concentrações de 2,5 a 50 µg/mL), mas não demonstrou efeito na replicação de poliovírus (ABAD et al., 1997).

Yang, Lee e Yen (2000) verificaram, no extrato acetônico das folhas de *Eugenia jambos*, a presença de dois taninos hidrolisáveis (1-O-galoil-castalagina e casuarinina) com propriedades citotóxicas sobre células leucêmicas promielocíticas humanas (HL-60). Os autores sugerem que o mecanismo antitumoral seja devido à indução de apoptose nas células HL-60.

Do extrato metanólico de folhas de *S. jambos* foram isolados dois glicosídeos flavonoídicos (3-O-β-D-xilopiranosil (1,2) α-L-ramnopiranosídeo de quercetina e 3-O-β-D-xilopiranosil (1,2) α-L-ramnopiranosídeo de miricetina) (Fig.3), que apresentaram atividade antiinflamatória mais significativa que os fármacos empregados como referência (fenilbutazona e indometacina) em modelo de edema de pata em camundongos (SLOWING; CARRETERO; VILLAR, 1996).

Figura 3 – Glicosídeos isolados de folhas de *S. jambos*. **(1)** 3-O-β-D-xilopiranosil (1,2) α-L-ramnopiranosídeo de miricetina; **(2)** 3-O-β-D-xilopiranosil (1,2) α-L-ramnopiranosídeo de quercetina (SLOWING; CARRETERO; VILLAR, 1996).

O extrato hidroetanólico a 70% liofilizado das folhas de *S. jambos* apresentou teores de flavonóides e taninos, de 1,2% e 43,3%, respectivamente. Administrado por via oral a ratos Wistar na dose de 400 mg/kg, o mesmo extrato apresentou resultados significativos ($p < 0,001$) na prevenção de ulcerações hemorrágicas induzidas por etanol acidificado (DONATINI, 2003).

Apesar do uso popular das sementes (SHOME; RAWAT; MEHROTRA, 1996) e das folhas de *S. jambos* (TEIXEIRA et al., 1992) como hipoglicemiantes, o chá das folhas (2 g de folhas em 250 mL de água) administrado a indivíduos não diabéticos após a ingestão de 75 g de glicose, não apresentou resultados significativos na redução da glicemia em comparação ao grupo que recebeu placebo (TEIXEIRA et al., 1990). Outros estudos, empregando ratos saudáveis, ratos com diabetes induzido por estreptozotocina e pacientes diabéticos, demonstraram que os

extratos de *S. jambos* não apresentam efeito hipoglicemiante (TEIXEIRA; FUCHS, 2006).

O extrato diclorometano das folhas apresentou três diidrochalconas (2',6'-diidroxí-4'-metoxidiidrochalcona, 2',6'-diidroxí-4'-metoxí-3'-metildiidrochalcona e 2',6'-diidroxí-4'-metoxí-3,5'-dimetildiidrochalcona), que demonstraram atividade seqüestrante de radicais DPPH através de método espectrométrico (JAYASINGHE et al., 2007).

O extrato hidroetanólico a 50% das folhas de *S. jambos* (100 e 300 mg/kg) apresentou eficácia analgésica comparável à da morfina em modelo de indução térmica de dor cutânea em ratos. Apresentou também efeito na dor inflamatória induzida por formalina mais significativo que o diclofenaco, reconhecido fármaco antiinflamatório. A ação analgésica do extrato de *S. jambos* nos dois modelos citados não está relacionada a receptores opióides, uma vez que a administração de um antagonista desses receptores (naloxona) não suprimiu o efeito analgésico do extrato (ÁVILA-PEÑA et al., 2007).

Das sementes de *Eugenia jambos* foi isolada uma lecitina termoestável, com capacidade de aglutinar eritrócitos humanos de diferentes tipos ABO (TÁBORA; BERTRAND, 1980).

A fração acetato de etila do extrato aquoso de folhas de *S. jambos* administrada intravenosamente a cães, apresentou acentuado efeito hipotensor acompanhado de bradicardia. A dose mínima de 0,003 ml/kg produziu uma diminuição na pressão arterial média de 1,57 mmHg; com a dose máxima utilizada (0,15 ml/kg), sendo a diminuição média de 55,07 mmHg. Não foi verificado efeito direto da fração sobre a resistência vascular periférica (ROMERO JIMÉNEZ, 1995).

Preparações cosméticas (loções e cremes faciais, tônicos capilares) contendo extratos de *S. jambos* foram patenteadas no Japão. Os produtos são indicados para prevenção de queda de cabelos, acne, dermatite e apresentaram ação antienvelhecimento da pele. O mecanismo descrito pelos autores inclui efeito inibitório da testosterona 5 α -redutase e da lipase, além de antagonista androgênico (TAKAHASHI; SUZUKI; MURATA, 2006).

2.1.3 Toxicologia de *Syzygium jambos* (L.) Alston

Apesar do uso popular das folhas de *S. jambos*, não há na literatura muitos estudos sobre a toxicidade desta espécie. Donatini (2003) avaliou a toxicidade aguda do extrato hidroetanólico a 70% liofilizado de folhas em camundongos, através da administração por via oral, em dose única, de 5 g/kg de massa corpórea. Como houve morte de 7 animais entre os 10 tratados, foi realizada a determinação da DL₅₀, utilizando as doses de extrato de 1,2 g/kg, 1,92 g/kg, 3,07 g/kg, 4,90 g/kg e 7,86 g/kg. O valor de DL₅₀ encontrado para o EHEL de *S. jambos* foi de 4,68 g/kg.

Tanto na avaliação da toxicidade aguda como no estudo de DL₅₀, a análise macroscópica dos órgãos (fígado, rins, coração e pulmão) não apresentou diferenças em relação ao grupo controle. No entanto, no estudo de DL₅₀, houve diferença significativa na massa relativa de fígado para os animais machos que receberam as doses de 1,92 mg/kg e 4,90 mg/kg ($p < 0,05$) e para as fêmeas que receberam a dose de 4,90 mg/kg ($p < 0,01$) (DONATINI, 2003).

2.2 Trato gastrintestinal

O estômago secreta cerca de 2,5 L de suco gástrico diariamente. As principais secreções consistem em pepsinogênios, provenientes das células principais ou pépticas, e em ácido clorídrico e fator intrínseco, provenientes das células parietais ou oxínticas (RANG et al., 2004).

A secreção de ácido clorídrico pelas células parietais, principal característica da fisiologia gástrica, é regulada por três estímulos principais: gastrina, acetilcolina e histamina (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006; RANG et al., 2004).

A gastrina é um hormônio peptídico sintetizado nas células endócrinas da mucosa do antro gástrico e do duodeno, sendo secretada no sangue da veia porta. O controle da liberação de gastrina envolve transmissores neuronais, além do efeito direto do conteúdo gástrico, principalmente a presença de aminoácidos e peptídeos. Sua principal ação consiste em estimular a secreção de ácido pelas células parietais. Também aumenta indiretamente a secreção de pepsinogênio e estimula o fluxo sanguíneo e a motilidade gástrica (BRUNTON, 1996; RANG et al., 2004).

A visão, o odor, o paladar, a mastigação e a deglutição de alimentos estimulam, via nervo vago, a liberação do neurotransmissor acetilcolina, que atua sobre receptores muscarínicos presentes na superfície das células parietais e na superfície das células que contêm histamina (CRAWFORD, 2000).

A histamina é um hormônio local que atua sobre os receptores H_2 . É proveniente de mastócitos ou células semelhantes às enterocromafins (*enterochromaffin-like cells* - ECL), localizados próximo à célula parietal. Ocorre liberação basal uniforme de histamina, que aumenta com a presença de gastrina e acetilcolina (BRUNTON, 1996; RANG et al., 2004).

O mecanismo exato de ação dos três estímulos não está totalmente esclarecido. Uma das hipóteses é de que os três secretagogos atuem diretamente sobre a célula parietal, que possui receptores H_2 para histamina, receptores M_2 muscarínicos para a acetilcolina e receptores de gastrina. Outra hipótese sugere que a acetilcolina e a gastrina podem tanto atuar diretamente sobre a célula parietal como estimular a liberação de histamina das células ECL parácrinas ou mastócitos, sendo que a histamina, por sua vez, ativa os receptores H_2 da célula parietal (BRUNTON, 1996; CRAWFORD, 2000; KONTUREK et al., 2005; RANG et al., 2004).

A somatostatina, peptídeo regulador de hormônios como a insulina e o glucagon, exerce efeito inibitório sobre a secreção de ácido gástrico, pepsina e gastrina (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006).

A secreção das células parietais consiste numa solução isotônica de HCl com pH inferior a 1 (RANG et al., 2004). Nas células parietais, o AMP cíclico e as vias dependentes de Ca^{2+} ativam a H^+ , K^+ -ATPase (a bomba de prótons), que efetua a troca de íons hidrogênio e potássio através da membrana celular parietal, gerando um grande gradiente iônico, com um pH intracelular de 7,3 e um pH intracanalicular de 0,8 (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006). Desta forma, é necessária a existência de uma proteção da parede gástrica contra a autodigestão. A barreira mucosa é constituída principalmente pela secreção de muco e bicarbonato, além de uma barreira epitelial e um rico suprimento sanguíneo (CRAWFORD, 2000; RANG et al., 2004).

O muco gástrico consiste em um gel viscoso, elástico, aderente e transparente, formado por água e glicoproteínas, que cobre toda a mucosa gastrintestinal (HIRUMA-LIMA et al., 2006b). É secretado por células secretoras de

muco localizadas entre as células epiteliais superficiais por toda a mucosa gástrica. Estas células secretam também íons bicarbonato, que são retidos no muco, criando um gradiente de pH de 1-2 na luz a 6-7 na superfície mucosa (CRAWFORD, 2000; RANG et al., 2004). O muco gástrico ainda é capaz de atuar como agente antioxidante, reduzindo assim o dano à mucosa mediado por espécies reativas. Se alguns radicais são gerados na superfície do epitélio contendo muco, o muco intracelular pode seqüestrá-los. As propriedades protetoras da barreira de muco dependem não somente da estrutura do gel, mas da quantidade e espessura da camada que recobre a superfície da mucosa (HIRUMA-LIMA et al., 2006b).

A barreira epitelial consiste em junções intercelulares compactas que evitam a difusão retrógrada dos íons de hidrogênio. É dotada de alta capacidade de restituição em caso de lesão, através da migração de células ao longo da membrana basal exposta e conseqüente restauração da integridade do epitélio (CRAWFORD, 2000).

O rico fluxo sanguíneo da mucosa gástrica fornece oxigênio, bicarbonato e nutrientes para as células epiteliais e contribui na remoção do ácido que sofreu difusão retrógrada (CRAWFORD, 2000).

As prostaglandinas produzidas localmente apresentam função importante na proteção gástrica. Elas estimulam a secreção de bicarbonato e muco, mantêm o fluxo sanguíneo da mucosa e regulam a renovação e reparo celular (HIRUMA-LIMA et al., 2006b). Também exercem importante papel sobre células inflamatórias, diminuindo a liberação de enzimas lisossomais, a produção de metabólitos tóxicos do oxigênio dos neutrófilos e a liberação de histamina dos mastócitos (RANG et al., 2004).

2.2.1 Etiologia da úlcera gástrica

A úlcera gástrica está relacionada a um desequilíbrio entre os fatores agressivos e os fatores citoprotetores da mucosa gástrica (BORRELLI; IZZO, 2000). O aumento da secreção ácida com difusão retrógrada, a diminuição do fluxo sanguíneo, a ruptura da camada mucosa aderente e o dano direto ao epitélio estão envolvidos na etiologia da úlcera gástrica (CRAWFORD, 2000).

Durante muito tempo a secreção de ácido foi considerada o foco no tratamento de úlceras pépticas. No entanto, a hiperacidez não é um pré-requisito, uma vez que apenas uma minoria dos pacientes com úlceras duodenais possui hiperacidez, sendo ainda menos comum nos pacientes com úlceras gástricas. Contudo a ulceração gástrica pode ocorrer rapidamente quando os mecanismos de defesa da mucosa falham, assim como quando o fluxo sanguíneo diminui, o esvaziamento gástrico é demorado ou a restituição epitelial é impedida (CRAWFORD, 2000).

A deficiência no conteúdo de prostaglandinas endógenas é um dos principais fatores na patogênese das úlceras gástricas causadas pela utilização de antiinflamatórios não-esteróides (AINEs). A diminuição na produção de prostaglandinas faz com que haja redução na produção de muco e bicarbonato, além de ocasionar a diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa (LIMA et al., 2006).

A ativação de neutrófilos, que ocorre no dano gástrico, pode contribuir na lesão gástrica através de vários mecanismos, como a produção de espécies reativas ou liberação de proteases e mediadores lipídicos, como fator de ativação das plaquetas (*platelet-activating factor* – PAF) e leucotrienos, que afetam o tônus

vascular e a permeabilidade, exacerbando a isquemia tecidual (LA CASA et al., 2000).

O PAF, fosfolípídeo endógeno mediador de processos inflamatórios e alérgicos, causa ulceração gastrintestinal e predispõe o estômago ao dano decorrente da aplicação tópica de etanol (IZZU et al., 1994). É sintetizado e liberado por neutrófilos, plaquetas, macrófagos, monócitos, basófilos e células endoteliais. Constitui um potente agente na agregação de plaquetas, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Além disso, estimula agregação e degranulação de neutrófilos, induz a liberação de enzimas lisossomais e apresenta ação espasmogênica para a musculatura lisa (RANG et al., 2004; ROSAM; WALLACE; WHITTLE, 1986).

A liberação de PAF no trato gastrintestinal ocasiona um aumento na síntese de leucotrienos (WALLACE; MACNAUGHTON, 1988). O leucotrieno B₄ (LTB₄) é um importante mediador em todos os tipos de inflamação, produzido principalmente por neutrófilos. Ao atuar sobre receptores específicos, causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (RANG et al., 2004). Os leucotrienos têm sido identificados na mucosa gástrica, particularmente após exposição ao etanol (LA CASA et al., 2000).

A infecção por *Helicobacter pylori* foi identificada como um dos fatores de patogênese de úlceras pépticas, principalmente duodenais. A presença do *H. pylori* ocasiona aumento da secreção ácida, bem como interfere na secreção de muco e bicarbonato, resultando em gastrite aguda e, posteriormente, crônica (KONTUREK et al., 2005).

2.2.2 Estresse oxidativo nas lesões gástricas

O oxigênio exerce papel contraditório sobre os organismos vivos – é molécula essencial à vida aeróbia, no entanto, é capaz de destruir tecidos vivos (LARSON, 1988). O corpo humano gera, sob várias condições, diversas espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), tais como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peroxila ($\text{ROO}\bullet$), que causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídeos e proteínas (SOUZA et al., 2007).

Espécie reativa é qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. São espécies capazes de existir independentemente e, em geral, são instáveis, têm uma meia vida muito curta e reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares (ABDALLA, 2003).

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com as de um substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL; GUTTERGUIDE, 2007).

Substâncias antioxidantes são produzidas pelo próprio metabolismo, como a glutatona, o ubiquinol e o ácido úrico, e também são adquiridas através da alimentação como os carotenóides, tocoferóis e flavonóides (ABDALLA, 2003).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e os mecanismos antioxidantes endógenos. Uma das consequências desse desequilíbrio é a oxidação dos ácidos graxos da membrana celular, denominada lipoperoxidação. O estresse oxidativo tem sido responsabilizado

pelo desenvolvimento de uma série de condições patológicas como câncer, envelhecimento, inflamação e morte celular (BARROS et al., 1996).

As espécies reativas parecem estar envolvidas em diversos modelos experimentais de úlcera gástrica. Bagchi e colaboradores (1999) sugeriram que espécies reativas podem exercer importante papel nas lesões gastrintestinais induzidas por estresse através do aumento da lipoperoxidação. Também em modelos de estresse verificou-se a inativação da prostaglandina sintetase através do acúmulo de H_2O_2 , um inibidor da síntese de prostaglandinas, que propicia a geração de ROS (BANDYOPADHAYAY et al., 1999).

A exposição da mucosa gástrica ao etanol induz um aumento significativo dos níveis de peroxidação lipídica. O dano à mucosa devido ao etanol é associado com diminuição dos níveis de compostos sulfidríla, especialmente glutathione (GSH). A glutathione peroxidase é uma importante enzima que exerce papel chave na eliminação de H_2O_2 e hidroxiperoxídeos lipídicos nas células da mucosa gástrica. A atividade antioxidante desta enzima está relacionada com a oxidação da glutathione reduzida, que pode subsequente ser reduzida pela glutathione redutase, com NADPH como agente redutor. A inibição desta enzima pode resultar em acúmulo de peróxido de hidrogênio com consequente oxidação de lipídeos (LA CASA et al., 2000).

Pihan, Regillo e Szabo (1987) sugeriram que o ataque de ROS a moléculas não-lipídicas, como enzimas, proteínas ou receptores, seria também uma possível causa do dano gástrico induzido por etanol.

Tem sido sugerido que ROS geradas por neutrófilos podem constituir importante fator no retardo da cura de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos (LIMA et al., 2006).

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é aprofundar o conhecimento da espécie *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae), com relação à composição química e atividades farmacológicas. São objetivos específicos:

- Avaliar a relação dose-efeito da atividade antiúlcera aguda do extrato hidroetanólico a 70% das folhas (EHEL) de *S.jambos*;
- Avaliar a atividade antiúlcera subcrônica do EHEL de *S. jambos*;
- Avaliar a atividade antioxidante do EHEL e das frações etanólica, hidroetanólica a 50%, acetato de etila e clorofórmica;
- Avaliar a toxicidade subcrônica do EHEL;
- Fracionar os extratos através de cromatografia em coluna, com o objetivo final do isolamento e identificação do(s) princípio(s) ativo(s).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *Syzygium jambos* foram coletadas em agosto de 2000, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ – USP, em Piracicaba. Exsicata de ramo florido foi identificada por Fiorella Fernanda Mazine, especialista em Myrtaceae da ESALQ – USP, e depositada no herbário da mesma Escola sob nº ESA 84432.

4.2 Elaboração de extratos e fracionamento

As folhas de *Syzygium jambos* foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C por 48 horas, pulverizadas em moinho de facas, passando por tamis de 1 mm.

O extrato hidroetanólico a 70% foi elaborado por percolação, segundo a Farmacopéia Brasileira (1959), empregando-se 2500 g da droga pulverizada. Em seguida, foi concentrado à pressão reduzida e o extrato aquoso remanescente foi liofilizado.

Para o fracionamento foram pesados 40 g do extrato hidroetanólico a 70% liofilizado (EHEL) e adicionados 400 mL de clorofórmio. A mistura foi mantida em agitador magnético por 30 minutos. Após agitação, a mistura foi filtrada. O filtrado (fração clorofórmica) foi concentrado, utilizando-se evaporador à pressão reduzida e, em seguida, banho-maria. Foram empregados ainda para o fracionamento acetato de etila, etanol e etanol a 50%, conforme esquema a seguir (Figura 4).

Figura 4 – Esquema representativo do fracionamento do extrato hidroetanólico a 70% liofilizado de folhas de *S. jambos*.

4.3 Atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante do EHEL foi empregado o método de medida de atividade seqüestrante de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) segundo método descrito por Mensor e colaboradores (2001).

A 1 mL de uma solução 0,3 mM de DPPH em etanol foram adicionados 2,5 mL de solução etanólica do EHEL em diferentes concentrações. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as absorbâncias foram medidas a 518 nm, utilizando etanol para calibração do aparelho.

A solução usada como branco foi obtida adicionando-se 1 mL de etanol a 2,5 mL do EHEL em diferentes concentrações. A solução controle foi obtida através da adição de 1 mL da solução 0,3 mM de DPPH a 2,5 mL de etanol.

A atividade antioxidante (AA%) foi calculada em porcentagem, para cinco concentrações diferentes do EHEL, a partir de uma média de 3 leituras, de acordo com a fórmula:

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco}) \times 100}{\text{Absorbância do controle}}$$

Os valores de CE₅₀ (concentração necessária para atingir 50% da capacidade antioxidante) foram calculados através da regressão linear dos pontos, onde a abscissa representa a concentração do extrato e a ordenada, a média percentual da atividade antioxidante. Os resultados foram obtidos através de análise de variância (ANOVA) e apresentados como média $\pm$ erro padrão.

O mesmo procedimento foi utilizado para a determinação da atividade antioxidante das frações do EHEL obtidas com clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol a 50%. Como referência, foi empregado o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), um derivado hidrofílico do α -tocoferol, através do mesmo método.

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Animais

Os animais utilizados nos ensaios foram provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Para a avaliação da atividade antiúlcera, foram utilizados ratos Wistar fêmeas (150 a 180 g). Na avaliação da toxicidade subcrônica, foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas de aproximadamente 150 g.

Os animais foram mantidos durante 5 dias em adaptação ao ambiente do ensaio, em gaiolas apropriadas, com ciclo de claro-escuro regulado para 12/12 horas.

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Ofício CEEA nº 73/2006).

4.4.2 Atividade antiúlcera gástrica

4.4.2.1 Atividade antiúlcera aguda – modelo de indução por etanol e ácido clorídrico

A avaliação da relação dose-efeito da atividade antiúlcera gástrica foi realizada através do modelo de indução aguda por etanol acidificado (MIZUI; DOTEUCHI, 1983).

Ratos Wistar fêmeas, de 150 a 180 g, foram mantidos em jejum por 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso à água. Os testes foram realizados com grupos de 07 animais controle e 07 animais teste.

O EHCL foi administrado aos animais por via oral, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg de massa corpórea, em suspensão aquosa, na concentração de 40 mg/mL (volume máximo de 1 mL por 100 g de massa corpórea do animal). Para o grupo de animais controle foi administrado 1 mL de água potável para cada 100 g de massa corpórea do animal. Lansoprazol foi utilizado como fármaco de referência, na dose de 30 mg/kg de massa corpórea (TOMA, 2002).

Após 30 minutos, foi administrado, por via oral, ácido clorídrico a 0,3 M em etanol a 60% a todos os animais. Uma hora depois da administração do indutor, os animais foram mortos em câmara de CO₂, os estômagos retirados e abertos pela curvatura maior. As ulcerações foram avaliadas utilizando-se o programa Image Pro Plus.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico, através de análise de variância e Tukey, e apresentados através das medidas de Área Total de Lesão (ATL), expressa em mm², e Área Relativa de Lesão (ARL), expressa em porcentagem, calculada segundo a fórmula:

$$\text{ARL} = \text{ATL}/\text{AT} \times 100$$

Onde: ARL = área relativa de lesão (%)

ATL = área total de lesão (mm²)

AT = área total do estômago (mm²)

4.4.2.2 Atividade antiúlcera subcrônica – modelo de indução por ácido acético

Foram utilizados 10 ratos Wistar fêmeas por grupo (controle, tratado e fármaco de referência), pesando aproximadamente 150 g. Antes do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, com livre acesso à água.

A avaliação da atividade antiúlcera subcrônica foi realizada de acordo com a técnica descrita por Takagi, Okabe e Saziki (1969). Nos animais submetidos à anestesia com éter, procedeu-se uma incisão na região abdominal e, no estômago parcialmente exposto, foram injetados 0,05 mL de ácido acético a 30%, abaixo da serosa. A partir do segundo dia após a cirurgia, o EHEL de *Syzygium jambos* foi administrado diariamente na dose de 400 mg/kg, por via oral, e o fármaco de referência (cimetidina), na dose de 100 mg/kg. O grupo controle recebeu água potável. Os animais foram mortos após 12 dias de tratamento, com dose excessiva de anestésico (éter) e as ulcerações foram avaliadas.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico, através de análise de variância e Tukey, e apresentados através das medidas de Área Total de Lesão (ATL), expressa em mm², e Área Relativa de Lesão (ARL), expressa em porcentagem, calculada segundo a fórmula:

$$\text{ARL} = \text{ATL}/\text{AT} \times 100$$

Onde: ARL = área relativa de lesão (%)

ATL = área total de lesão (mm²)

AT = área total do estômago (mm²)

4.4.3 Toxicidade subcrônica

O estudo de toxicidade subcrônica dos extratos foi realizado segundo método preconizado por Souza Brito (1994).

Ratos Wistar machos e fêmeas, pesando cerca de 150 g, foram divididos em grupos de cinco animais controle e cinco animais tratados para cada sexo. Os animais foram aclimatados à temperatura de cerca de 22 °C, com ciclos de 12 horas de claro e escuro, regime alimentar com ração tipo purina e água *ad libitum*.

O EHEL foi diluído em água potável, sendo a mesma utilizada como controle, e administrado aos animais por via oral nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg, num volume máximo de 1 mL/100 g de animal, uma vez ao dia, durante 30 dias.

O padrão de comportamento dos animais foi observado diariamente durante o período do experimento. O consumo de água e ração dos grupos, bem como a massa corpórea de cada animal foram determinados a cada 2 dias. Ao final do experimento, a massa relativa dos órgãos (fígado, rins, coração/pulmão) foi avaliada.

A toxicidade subcrônica foi avaliada através da determinação de parâmetros bioquímicos (STEVENS & GALLO, 1982) e verificação anatomopatológica. As análises bioquímicas foram realizadas no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. A análise histopatológica dos órgãos (coração, pulmão, fígado e rins) foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

As amostras de sangue dos animais foram coletadas da artéria abdominal com seringa de plástico contendo 500 µL de EDTA 0,2 M, sob anestesia.

Para verificação da função hepática, foram avaliadas as enzimas transaminase glutâmico-oxalacética ou aspartato-aminotransferase (TGO/AST) e a transaminase glutâmico-pirúvica ou alanina aminotransferase (TGP/ALT). Para a avaliação da função renal foi determinada a uréia. Quanto ao metabolismo dos carboidratos, foi realizada a dosagem de glicose. Foram determinadas ainda as dosagens de proteínas e colesterol.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico, através de análise de variância (ANOVA).

4.5 Estudos fitoquímicos

4.5.1 Isolamento de constituinte da fração clorofórmica do EHEL

A fração clorofórmica do EHEL de folhas de *S. jambos* foi submetida a novo fracionamento, de acordo com o esquema apresentado na figura 5.

Todos os procedimentos de separação foram realizados de acordo com técnicas cromatográficas usuais (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Figura 5 – Esquema representativo do fracionamento da fração clorofórmica do extrato de folhas de *S. jambos*.

4.5.1.1 Cromatografia em coluna filtrante

A técnica permite agrupar as substâncias de polaridades próximas, possibilitando uma separação inicial das diversas substâncias presentes nessa fração. O equipamento consiste em um funil de porcelana com placa sinterizada e um balão coletor. A fase estacionária, 100 g de sílica gel 60 Merck (0,063-0,200 mm), foi empacotada em funil de 12 cm de diâmetro por 6 cm de altura e, para forçar a passagem do eluente, utilizou-se pressão reduzida, gerada por uma bomba de vácuo acoplada abaixo da coluna.

A amostra (5 g) foi solubilizada em pequeno volume de clorofórmio, adicionada de sílica gel 60 e misturada até total adsorção da amostra na sílica, que foi então depositada no topo da coluna. Empregou-se fase móvel em esquema de gradiente crescente de polaridade, iniciando-se com 100% de hexano até 100% de acetato de etila, e finalmente com 100% de metanol para a limpeza da coluna (Tabela 1).

Tabela 1 – Coluna filtrante da fração clorofórmica do EHEL de folhas de *S. jambos*.

Fração	Eluente	Proporção	Volume (mL)
CF1	hexano	-	200
CF2	hexano/AcOEt	95:5	200
CF3	hexano/AcOEt	90:10	200
CF4	hexano/AcOEt	80:20	200
CF5	hexano/AcOEt	70:30	200
CF6	hexano/AcOEt	60:40	200
CF7	hexano/AcOEt	50:50	200
CF8	AcOEt	-	200
CF9	MeOH	-	200

4.5.1.2 Cromatografia em coluna

A subfração 6 da coluna filtrante anterior (CF6) foi submetida à cromatografia em coluna clássica, desenvolvida em coluna de vidro de 2 cm de diâmetro por 50 cm de altura, empregando-se, como fase estacionária, sílica gel 60 Merck para coluna (0,063-0,200 mm). A eluição foi realizada com misturas de solventes ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) em ordem crescente de polaridade (Tabela 2).

Tabela 2 – Gradiente empregado na coluna cromatográfica da subfração 6 da fração clorofórmica do EHEL de folhas de *S. jambos*.

Eluente	Proporção
CHCl_3	-
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	99:1
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	95:5
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	90:10
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	80:20
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	70:30
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	60:40
MeOH	-

4.5.1.3 Cromatografia em camada delgada

As frações obtidas na coluna cromatográfica foram avaliadas através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), realizada em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) com espessura de 0,2 mm.

Diferentes fases móveis foram empregadas, com a finalidade de identificar a fração com menor número de substâncias e melhor separação das mesmas. Os cromatogramas foram observados sob UV 254-366 nm e revelados com solução aquosa de ácido sulfúrico a 25% e posterior aquecimento.

A fração 17 da coluna cromatográfica foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), empregando como fase estacionária sílica gel 60 PF₂₅₄ da marca Merck, em camada de 1 mm aplicada em placas de vidro 20x20 cm. O desenvolvimento quádruplo em fase móvel constituída de clorofórmio-metanol (98:2) originou 3 bandas que, após raspagem da placa e recuperação das substâncias, foram novamente submetidas à CCDC. A banda 2 (33 mg), que aparentemente consistia em uma única substância, foi submetida à análise espectrométrica.

4.5.1.4 Análises espectrométricas

Os espectros de RMN foram registrados em piridina-*d*₅, em espectrômetro Bruker, operando a 300 MHz para ¹H e 75,5 MHz para ¹³C, respectivamente, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência.

5 RESULTADOS

5.1 Rendimento do EHEL e das frações

O EHEL representou um rendimento de 30% (a partir de 2500 g da droga pulverizada, foram obtidos 752 g de extrato liofilizado). O rendimento das frações a partir de 40 g do EHEL está apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento das frações obtidas a partir do EHEL de *S. jambos* no fracionamento por solventes.

solvente	massa (g)	%
clorofórmio	3,49	8,73
acetato de etila	1,79	4,48
etanol	21,84	54,60
etanol a 50%	11,87	29,68

5.2 Atividade antioxidante

O valor de CE_{50} (concentração necessária para atingir 50% da capacidade antioxidante) determinado para o EHEL, na atividade seqüestrante de radicais DPPH, foi de $5,36 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$. Os resultados das frações obtidas com clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol a 50% são apresentados na tabela 4. O Trolox, empregado como referência, apresentou CE_{50} de $4,98 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 4 – Valores de CE_{50} das frações do EHEL de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Fração	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Etanol a 50%	$8,47 \pm 0,05$
Etanólica	$6,89 \pm 0,12$
Acetato de etila	$19,02 \pm 0,22$
Clorofórmica	$64,06 \pm 0,68$

As tabelas 5 a 10 e figuras 6 a 11 mostram os valores de atividade antioxidante e os gráficos de dispersão para a obtenção do CE_{50} , com as respectivas equações das retas para todas as amostras (EHEL, frações e Trolox).

Tabela 5 – Atividade antioxidante (AA%) do EHEL de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Concentração do extrato (µg/mL)	Capacidade antioxidante AA (%)
2,23	20,62 ± 0,76
4,46	45,19 ± 0,38
7,14	67,21 ± 0,24
8,93	81,96 ± 0,44
10,72	90,69 ± 0,59

Os valores representam a média de 3 determinações de AA% ± erro padrão.

Figura 6 – Regressão linear da atividade antioxidante do EHEL das folhas de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Tabela 6 – Atividade antioxidante (AA%) da fração hidroetanólica a 50% obtida a partir do EHEL de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Concentração do extrato (µg/mL)	Capacidade antioxidante AA (%)
2,23	19,72 ± 0,22
4,46	31,66 ± 0,51
8,93	49,97 ± 0,20
14,29	82,10 ± 0,19
17,86	92,49 ± 0,09

Os valores representam a média de 3 determinações de AA% ± erro padrão.

Figura 7 – Regressão linear da atividade antioxidante da fração hidroetanólica a 50% obtida a partir do EHEL de folhas de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Tabela 7 – Atividade antioxidante (AA%) da fração etanólica obtida a partir do EHEL de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Concentração do extrato (µg/mL)	Capacidade antioxidante AA (%)
2,23	19,76 ± 0,49
4,46	37,81 ± 0,76
8,93	63,45 ± 0,17
10,72	72,46 ± 0,75
14,29	94,32 ± 1,36

Os valores representam a média de 3 determinações de AA% ± erro padrão.

Figura 8 – Regressão linear da atividade antioxidante da fração etanólica obtida a partir do EHEL de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Tabela 8 – Atividade antioxidante (AA%) da fração acetato de etila obtida a partir do EHEL de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Concentração do extrato (µg/mL)	Capacidade antioxidante AA (%)
4,46	15,69 ± 0,63
8,93	30,14 ± 0,41
17,86	51,29 ± 0,41
28,57	70,89 ± 0,57
35,72	82,98 ± 0,24

Os valores representam a média de 3 determinações de AA% ± erro padrão.

Figura 9 – Regressão linear da atividade antioxidante da fração acetato de etila obtida a partir do EHEL de folhas de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Tabela 9 – Atividade antioxidante (AA%) da fração clorofórmica obtida a partir do EHEL de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Concentração do extrato (µg/mL)	Capacidade antioxidante AA (%)
17,86	23,36 ± 0,43
35,72	37,37 ± 0,18
71,43	56,42 ± 0,36
107,14	71,06 ± 0,41
142,86	89,96 ± 0,47

Os valores representam a média de 3 determinações de AA% ± erro padrão.

Figura 10 – Regressão linear da atividade antioxidante da fração clorofórmica obtida a partir do EHEL de folhas de *S. jambos* na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Tabela 10 – Atividade antioxidante (AA%) do Trolox na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Concentração de Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Capacidade antioxidante AA (%)
0,89	$8,49 \pm 0,29$
2,14	$21,92 \pm 0,69$
3,57	$36,5 \pm 0,29$
5	$49,98 \pm 0,28$
7,14	$71,46 \pm 0,39$

Os valores representam a média de 3 determinações de AA% $\pm$ erro padrão.

Figura 11 – Regressão linear da atividade antioxidante do Trolox na capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

5.3 Ensaios biológicos

5.3.1 Atividade antiúlcera gástrica

5.3.1.1 Atividade antiúlcera aguda – modelo de indução por etanol e ácido clorídrico

O EHEL de *S. jambos* apresentou efeito inibitório dose-dependente na formação de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado (figura 12). Na dose de 400 mg/kg, a atividade protetora do EHEL foi extremamente significativa ($p < 0,001$) na Área Total de Lesão (mm^2) e na Área Relativa de Lesão (%), em comparação ao controle. O efeito inibitório nesta dose foi superior ao do lansoprazol, utilizado como fármaco de referência. A dose de 200 mg/kg apresentou resultado significativo ($p < 0,05$) e, na dose de 100 mg/kg, não houve proteção significativa neste modelo. A figura 13 apresenta o aspecto dos estômagos de todos os grupos.

Figura 12 – Efeito da administração oral do EHEL das folhas de *S. jambos*, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, no modelo de indução aguda de úlcera gástrica através de etanol acidificado. No gráfico estão representadas as médias da Área Total de Lesão, da Área Relativa de Lesão e o erro padrão por grupo de 7 animais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA, Teste de Tukey).

Figura 13 – Aspectos dos estômagos na avaliação da atividade antiúlcera do EHEL de *S. jambos* através do modelo de indução aguda por etanol acidificado. C – controle; L – lansoprazol; 100 – EHEL 100 mg/kg; 200 – EHEL 200 mg/kg; 400 – EHEL 400 mg/kg.

5.3.1.2 Atividade antiúlcera subcrônica – modelo de indução por ácido acético

Na avaliação da atividade antiúlcera subcrônica, o EHEL de *S. jambos* não apresentou resultados significativos, na dose de 400 mg/kg, na ATL e ARL, em comparação ao grupo controle (figura 14). A figura 15 apresenta os aspectos dos estômagos dos grupos controle, tratado e fármaco de referência.

Figura 14 – Efeito da administração oral do EHEL das folhas de *S. jambos*, na dose de 400 mg/kg, no modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético a 30%. No gráfico estão representadas as médias da Área Total de Lesão, da Área Relativa de Lesão e o erro padrão por grupo de 10 animais (***) $p < 0,001$; ANOVA, Teste de Tukey).

Figura 15 – Aspectos dos estômagos na avaliação da atividade antiúlcera do EHES de *S. jambos*, na dose de 400 mg/kg, através do modelo de indução por ácido acético a 30%.

5.3.2 Toxicidade subcrônica

Durante os 30 dias de administração do EHEL nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg, não foram observadas alterações de comportamento dos animais tratados quando comparados ao grupo controle, que recebeu água potável.

O consumo de água e ração dos grupos controle e tratados é apresentado nas figuras 16 e 17. Nota-se um aumento no consumo de água dos animais machos tratados com a menor dose do EHEL (400 mg/kg) por volta do 17º dia de administração em comparação aos outros grupos, que apresentaram o mesmo perfil de consumo. Os animais machos e fêmeas mostraram uma redução na ingestão de ração entre o 15º e 19º dia de tratamento, sendo esta redução mais evidente nos animais que receberam a dose mais alta do EHEL (2500 mg/kg).

A figura 18 mostra a evolução da massa corpórea dos animais machos e fêmeas, para as diferentes doses, durante os 30 dias de administração do EHEL. Nota-se o mesmo perfil de evolução na maioria dos grupos, para ambos os sexos. Apenas os animais machos que receberam a dose mais alta de EHEL apresentaram redução no ganho de massa corpórea a partir do 20º dia de tratamento. Ao final do experimento, essa diferença foi extremamente significativa ($p < 0,001$) em comparação ao grupo controle.

Figura 16 – Variação do consumo de água (mL) dos animais controle e tratados, avaliado a cada 2 dias, durante trinta dias, no teste de toxicidade subcrônica, através da administração oral diária do EHEL das folhas de *S. jambos*, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg. Cada ponto corresponde ao consumo do grupo (5 animais).

Figura 17 – Variação do consumo de ração (g) dos animais controle e tratados, avaliado a cada 2 dias, durante trinta dias, no teste de toxicidade subcrônica, através da administração oral diária do EHEL das folhas de *S. jambos*, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg. Cada ponto corresponde ao consumo do grupo (5 animais).

Figura 18 – Evolução da massa corpórea dos animais machos e fêmeas, avaliado a cada 2 dias, durante trinta dias, no teste de toxicidade subcrônica, através da administração oral diária do EHEL das folhas de *S. jambos*, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg. Cada ponto corresponde à média de 5 animais.

Não houve óbito de nenhum dos animais durante os 30 dias de administração do EHEL. Após esse período, os animais foram mortos e necropsiados. Não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos dos animais dos grupos controle ou tratados. Os órgãos (coração, pulmões, rins e fígado) foram pesados e as massas médias relativas dos mesmos foram calculadas. Não houve diferenças significativas na relação massa dos órgãos/massa dos animais para nenhuma dose de EHEL. Os resultados são apresentados nas figuras 19 e 20.

Na análise anatomopatológica, não foram detectadas lesões em nenhum dos órgãos avaliados (fígado, rins, coração e pulmões) mesmo na dose mais alta de EHEL (Fig. 21 a 23).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos são apresentados na tabela 11. Não houve diferenças significativas dos animais tratados em relação ao grupo controle.

Figura 19 – Comparação entre as massas relativas de órgãos dos animais machos, controle e tratados (EHDL de *S. jambos*), no teste de toxicidade subcrônica, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg por via oral. Cada ponto corresponde à média da massa relativa de coração/pulmão, fígado e rins por grupo de 5 animais.

Figura 20 – Comparação entre as massas relativas de órgãos dos animais fêmeas, controle e tratados (EHDL de *S. jambos*), no teste de toxicidade subcrônica, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg por via oral. Cada ponto corresponde à média da massa relativa de coração/pulmão, fígado e rins por grupo.

Figura 21 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de rato tratado com 2.500 mg/kg de EHEL de folhas de *S. jambos*, por via oral, por 30 dias. Coloração: Hematoxilina-eosina. A – Espaço-porta e lobulação hepática preservada. Aumento: 40x. B – Espaço-porta com arteríola, vênula e ducto biliar. No entorno trabéculas de hepatócitos preservados. Aumento: 100x. C – Veia hepática terminal preenchida de hemácias e trabéculas de hepatócitos com núcleo e citoplasma preservados. Aumento: 200x. D – Espaço-porta com veia hepática terminal, arteríola e ducto biliar, além de alguns hepatócitos da região periportal, preservados. Aumento: 200x.

Figura 22 – Fotomicrografias de cortes histológicos de miocárdio de rato tratado com 2.500 mg/kg de EHEL de folhas de *S. jambos*, por via oral, durante 30 dias. Coloração: Hematoxilina-eosina. A – Feixes de fibras miocárdicas e vasos, preservados. Aumento: 40x. B – Feixes de fibras miocárdicas preservados, e no interstício numerosos capilares preenchidos de hemácias. Aumento: 200x.

Figura 23 – Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de rato tratado com 2.500 mg/kg de EHEL de folhas de *S. jambos*, por via oral, durante 30 dias. Coloração: Hematoxilina-eosina. A – Padrão histológico alveolar e intersticial preservados. Aumento: 40x. B – Bronquíolo respiratório, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos, todos preservados. Aumento: 100x. C – Espaços alveolares e pneumocitos preservados. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200x. D – Espaços alveolares preservados, revestidos por pneumocitos tipos I e II, e capilares alveolares preenchidos de hemácias. Aumento: 400x.

Tabela 11 – Análise bioquímica do sangue dos animais controle e tratados, na avaliação da toxicidade subcrônica do EHEL de *S. jambos*, através da administração diária por via oral, durante 30 dias, nas doses de 400 mg/kg, 1000 mg/kg e 2500 mg/kg.

	Controle (água)	EHEL (400 mg/kg)	EHEL (1000 g/kg)	EHEL (2500 mg/kg)	Valores de referência*
glicose (mg/dL)	158,50 ± 4,03	142,50 ± 4,99	165,00 ± 9,13	173,75 ± 7,41	89,5-183,3
uréia (mg/dL)	46,25 ± 2,29	43,25 ± 1,93	47,75 ± 1,38	51,25 ± 4,54	12-25,8
AST/TGO (U/L)	64,50 ± 7,84	63,25 ± 2,66	51,25 ± 2,81	58,50 ± 7,38	
ALT/TGP (U/L)	43,00 ± 2,94	40,50 ± 5,52	32,00 ± 1,58	46,75 ± 8,39	
proteínas (g/dL)	5,75 ± 0,19	5,70 ± 0,04	5,68 ± 0,14	5,63 ± 0,09	5,9-8,4
colesterol (mg/dL)	61,25 ± 8,98	60,75 ± 7,16	39,25 ± 6,45	42,00 ± 5,75	50-100

Os valores correspondem à média ± erro padrão da média, n = 4.

* MATSUDA; TANAKA; ITAKURA, 2000.

5.4 Estudos fitoquímicos

5.4.1 Isolamento de constituinte da fração clorofórmica do EHEL

A coluna filtrante da fração clorofórmica (5 g) do EHEL de folhas de *S. jambos* originou nove subfrações, conforme apresentado na tabela 12.

Tabela 12 – Coluna filtrante da fração clorofórmica do extrato de folhas de *S. jambos*.

Fração	Eluente	Proporção	Volume (mL)	Massa (mg)
CF1	hexano	-	200	1,1
CF2	hexano/AcOEt	95:5	200	11,8
CF3	hexano/AcOEt	90:10	200	140,9
CF4	hexano/AcOEt	80:20	200	700,9
CF5	hexano/AcOEt	70:30	200	696,2
CF6	hexano/AcOEt	60:40	200	535,1
CF7	hexano/AcOEt	50:50	200	426,4
CF8	AcOEt	-	200	930,2
CF9	MeOH	-	200	1197,4

Todas as subfrações foram submetidas à CCD, empregando-se como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1. De acordo com o perfil cromatográfico, a CF6 foi selecionada para um novo fracionamento através de cromatografia em coluna.

No fracionamento em coluna da CF6 (528,8 mg) foram obtidas 62 subfrações, de acordo com o apresentado na tabela 13.

Tabela 13 – Cromatografia em coluna da CF6 de *S. jambos*.

Eluente	Proporção	Frações	Massa total (mg)
CHCl ₃	-	zero	0,8
CHCl ₃ /MeOH	99:1	1-19	393,3
CHCl ₃ /MeOH	95:5	20-33	66,5
CHCl ₃ /MeOH	90:10	34-45	13,2
CHCl ₃ /MeOH	80:20	46-52	5,2
CHCl ₃ /MeOH	70:30	53-57	3,1
CHCl ₃ /MeOH	60:40	58-60	2,8
MeOH	-	61-62	13,40

As frações foram monitoradas através de CCD e, de acordo com o perfil cromatográfico e das massas obtidas, as subfrações 17 e 18 desta coluna foram submetidas à CCD preparativa, empregando-se como fase móvel clorofórmio/metanol 98:2 (desenvolvimento quádruplo). A banda 2 (B2) de ambas as frações apresentou uma substância de mesmo R_f e mesma coloração, correspondente ao padrão de ácido ursólico no mesmo sistema cromatográfico. Dessa forma, a substância isolada da B2 – substância (**1**) – da fração 17 (33 mg) foi solubilizada em piridina-*d*₅ e submetida à análise espectroscópica em RMN de ¹H e ¹³C.

5.4.2 Elucidação estrutural

A substância (1) foi identificada como o triterpeno ácido ursólico (ácido urs-3 β -hidroxi-12-en-28-óico), apresentado na figura 24.

Os dados de RMN ^{13}C comparativos da amostra e do ácido ursólico são apresentados na tabela 14. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C encontram-se nas figuras 25 a 30.

Figura 24 – Estrutura química do ácido urs-3 β -hidroxi-12-en-28-óico (ácido ursólico) (MOGHADDAM et al., 2007).

Tabela 14 – Dados de RMN ^{13}C (δ em ppm, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75,5 MHz) da substância (1) comparados com os valores do ácido ursólico (TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004).

Carbonos	substância (1)	ácido ursólico
1	38,9	39,2
2	28,1	28,3
3	78,0	78,3
4	39,2	39,5
5	55,6	56,0
6	18,6	18,9
7	33,4	33,7
8	39,8	40,1
9	47,9	48,2
10	37,2	37,4
11	23,6	23,8
12	125,5	125,8
13	139,1	139,4
14	42,3	42,7
15	28,5	28,8
16	24,7	25,1
17	47,9	48,2
18	53,4	53,7
19	39,3	39,6
20	39,3	39,6
21	30,8	31,2
22	37,2	37,6
23	28,6	29,0
24	16,4	16,8
25	15,5	15,8
26	17,3	17,6
27	23,7	24,1
28	179,7	180,1
29	17,3	17,7
30	21,2	21,6

Figura 25 – Espectro de RMN ^1H (δ em ppm, piridina, 300 MHz) da substância (1).

Figura 26 – Expansão da região de 0,5 a 4 ppm do espectro de RMN ^1H .

Figura 27 – Expansão da região de 4 a 9 ppm do espectro de RMN ^1H .

Figura 28 – Espectro de RMN ¹³C (δ em ppm, piridina, 75,5 MHz) da substância (1).

Figura 29 – Expansão da região de 20 a 180 ppm do espectro de RMN ^{13}C .

Figura 30 – Expansão da região de 14 a 60 ppm do espectro de RMN ^{13}C .

6 DISCUSSÃO

Entre as diversas doenças de grande incidência entre a população, as úlceras gástricas e duodenais representam uma das mais importantes, pois afetam um número considerável de pessoas em todo o mundo, sendo citadas, por alguns autores, como “a nova praga do século 21” (HIRUMA-LIMA et al., 2006a).

No Brasil, diversos extratos vegetais, inclusive de espécies de Myrtaceae, são empregados na medicina popular para o tratamento de distúrbios digestivos, incluindo úlceras gástricas, e muitos deles apresentaram resultados significativos em modelos utilizando roedores. O extrato hidroetanólico de folhas de *Campomanesia xanthocarpa*, por exemplo, apresentou efeito gastroprotetor em lesões ulcerativas induzidas por etanol/HCl, inibindo as lesões em 62% (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004). O extrato etanólico de sementes de *Eugenia jambolana*, administrado por via oral a ratos na dose de 200 mg/kg, reduziu as lesões gástricas induzidas por estresse, aspirina, etanol e ligadura de piloro. Além disso, apresentou diminuição na secreção de ácido e pepsina, e aumento do conteúdo de muco e glicoproteínas (CHATURVEDI et al., 2007). Esta é uma razão importante para a investigação da atividade antiulcerogênica de novas espécies vegetais.

Muitos estudos têm sido feitos para explorar novos agentes antiúlcera de fontes naturais, e a atividade antiúlcera de diversos compostos químicos isolados de vegetais, como flavonóides, saponinas e taninos, tem sido determinada (BORRELLI; IZZO, 2000; LEWIS; HANSON, 1991).

Vários modelos experimentais podem ser utilizados na tentativa de elucidar o mecanismo de ação de extratos vegetais, uma vez que a patogênese das úlceras gástricas envolve fatores diversos como o aumento da permeabilidade vascular, da

motilidade intestinal, da atividade vagal, a diminuição do fluxo sanguíneo gástrico e dos níveis de prostaglandinas (BIRDANE et al., 2007).

O modelo de indução por etanol acidificado avalia, entre outras, a atividade de substâncias citoprotetoras. O etanol produz lesões necróticas na mucosa gástrica e a presença de ácido clorídrico acelera e agrava o processo de formação das lesões (MIZUI; DOTEUCHI, 1983).

O mecanismo da lesão induzida por etanol é bastante complexo, incluindo a redução da secreção de bicarbonato e da produção de muco (MARHUENDA; MARTIN; ALARCON DE LA LASTRA, 1993), danos ao fluxo sanguíneo gástrico e lesão de células da mucosa (BIRDANE et al., 2007). Ocorre, neste modelo, a constrição das vênulas submucosas seguida por congestão dos capilares da mucosa e formação de trombos plaquetários. A ativação de neutrófilos, que ocorre em danos gástricos, pode liberar PAF, também envolvido na injúria gástrica (IZZO et al., 1994).

As lesões gástricas induzidas por etanol são também associadas à produção excessiva de ROS (*reactive oxygen species*), que atacam constituintes celulares essenciais como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (LA CASA et al., 2000), incluindo receptores (PIHAN; REGILLO; SZABO, 1987) e prostaglandinas (BIRDANE et al., 2007). A exposição da mucosa gástrica ao etanol induz um aumento significativo dos níveis de peroxidação lipídica. O aumento do conteúdo de peróxidos lipídicos e radicais livres derivados de oxigênio resulta em alterações significativas em nível celular, e causa danos às membranas, morte celular, esfoliação e erosão epitelial (BIRDANE et al., 2007).

No modelo de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado, o EHEL de *S. jambos* apresentou atividade dose-dependente, sendo que a dose de 400 mg/kg apresentou, em relação ao grupo controle, resultados extremamente significativos

($p < 0,001$) na Área Total de Lesão (ATL – mm^2) ($58,88 \pm 28,20$ EHEL x $320,70 \pm 36,86$ controle) e Área Relativa de Lesão (ARL – %) ($9,11 \pm 2,33$ EHEL x $26,11 \pm 1,69$ controle). Nessa dose, o EHEL foi mais eficaz do que o fármaco empregado como referência (lansoprazol), que apresentou ATL e ARL de, respectivamente, $126,45 \pm 39,70$ e $15,31 \pm 2,15$ ($p < 0,01$ em comparação ao grupo controle).

A dose de 200 mg/kg também foi eficaz na proteção gástrica, com resultados significativos ($p < 0,05$) na ATL ($146,19 \pm 38,76$) e ARL ($16,90 \pm 2,15$), em comparação ao grupo controle. Não houve resultados significativos para a dose de 100 mg/kg.

A combinação dos efeitos gastroprotetores do EHEL de *S. jambos* e da atividade antiinflamatória relatada por Slowing, Carretero e Villar (1996) é extremamente favorável, uma vez que uma das grandes limitações de diversos agentes antiinflamatórios é a tendência a produzir irritação gástrica, sangramento e dano às células do epitélio gástrico (LIMA et al., 2006).

Em estudos anteriores (DONATINI, 2003), as frações obtidas a partir do EHEL empregando-se diferentes solventes (clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol a 50%) também foram testadas quanto à inibição na formação de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado. Os resultados foram significativos para a fração etanólica ($p < 0,01$) e clorofórmica ($p < 0,05$), em comparação ao grupo controle, na dose de 400 mg/kg. Estes resultados sugerem que as substâncias com ação antiúlcera do EHEL devem ter sido separadas entre as frações clorofórmica e etanólica, uma vez que o EHEL apresentou proteção mais evidente ($p < 0,001$) do que as referidas frações.

As lesões crônicas induzidas por ácido acético são mais semelhantes à úlcera humana, tanto no aspecto macroscópico como microscópico. O ácido acético

induz lesões gástricas que envolvem a camada muscular do estômago e a cura espontânea demora mais tempo para ocorrer. Neste modelo, resultados significativos foram obtidos com o emprego de substâncias que estimulam a proliferação de células do epitélio gástrico, enquanto substâncias que inibem a secreção de ácido e pepsina não foram eficazes (TAKAGI; OKABE; SAZIKI, 1969).

O EHEL de *S. jambos* não apresentou, neste modelo, resultados significativos em comparação ao grupo controle, na Área Total de Lesão ($57,00 \pm 6,13$ EHEL x $60,24 \pm 5,59$ controle) e na Área Relativa de Lesão ($12,08 \pm 0,75$ EHEL x $12,63 \pm 0,48$ controle).

Os resultados obtidos nos dois modelos experimentais de úlcera gástrica sugerem que a atividade do EHEL de folhas de *S. jambos* esteja relacionada a fatores citoprotetores. Pode-se descartar inicialmente a estimulação da proliferação das células da mucosa gástrica, já que o extrato não apresentou atividade no modelo de úlcera induzida por ácido acético. São necessários, portanto, outros modelos experimentais de ulceração para a compreensão do mecanismo de ação da atividade antiúlcera desta espécie.

Conforme mencionado anteriormente, os radicais livres representam um fator importante na formação de lesões ulcerativas e erosivas do trato gastrointestinal (BORRELLI; IZZO, 2000), principalmente nas lesões induzidas por etanol (LA CASA et al., 2000). Com base nessas informações, a atividade antioxidante do EHEL foi avaliada, pois o efeito preventivo do EHEL na formação de lesões gástricas poderia estar, em parte, relacionado à ação antioxidante.

A atividade antioxidante do EHEL de *S. jambos* foi avaliada anteriormente (DONATINI, 2003) através da medida da capacidade de inibição da lipoperoxidação espontânea de homogeneizado de cérebro de ratos. Neste

método, o EHEL apresentou $Q_{1/2}$ (concentração necessária para atingir 50% da capacidade antioxidante) de 0,17 $\mu\text{g/mL}$, indicando capacidade antioxidante superior a de extratos considerados promissores como os de *Pothomorphe umbellata* (pariparoba) ($Q_{1/2}$ = 4,4 $\mu\text{g/mL}$ – raiz; 19,3 $\mu\text{g/mL}$ – caule e 38,5 $\mu\text{g/mL}$ – folhas) (BARROS et al., 1996).

Em relação a outras espécies de mirtáceas, como *Eugenia uniflora* (AURICCHIO, 2001), *Myrciaria glomerata* (SILVA, 2001), *Campomanesia xanthocarpa* (MARKMAN, 2002) e *Plinia edulis* (ISHIKAWA, 2004) ($Q_{1/2}$ de 0,58 $\mu\text{g/mL}$, 0,29 $\mu\text{g/mL}$, 0,29 $\mu\text{g/mL}$, 0,21 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), a capacidade antioxidante do EHEL de *S. jambos* também foi maior.

No presente trabalho, a atividade antioxidante do EHEL e das frações foi avaliada através da medida da capacidade seqüestrante de radicais DPPH (Fig.31). O DPPH é um radical livre estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em etanol (MENSOR et al., 2001). Na presença de substâncias capazes de doar átomos de hidrogênio, o radical DPPH sofre redução, ocasionando a descoloração dessas soluções etanólicas (MOLYNEUX, 2004).

Figura 31 – Radical DPPH e sua forma reduzida.

Na avaliação da capacidade seqüestrante de radicais DPPH, o EHEL apresentou CE_{50} de $5,36 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$, valor comparável ao do Trolox (CE_{50} de $4,98 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$), análogo hidrossolúvel do α -tocoferol, empregado como referência. A atividade do EHEL foi ainda superior à do extrato de *Ginkgo biloba* ($CE_{50} = 44,72 \mu\text{g/mL}$) e da própria rutina ($CE_{50} = 14,16 \mu\text{g/mL}$), substância reconhecida por sua ação antioxidante, ambos avaliados por Mensor e colaboradores (2001) através do mesmo método.

Na avaliação das frações obtidas a partir do EHEL com diferentes solventes (clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol a 50%), a fração etanólica foi a mais eficaz, apresentando CE_{50} de $6,89 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$.

Estudos demonstraram que a interação do DPPH com um agente antioxidante depende da conformação estrutural deste agente. O número de moléculas de DPPH que são reduzidas parece estar relacionado como o número de grupos hidroxilas disponíveis (MENSOR et al., 2001). Isto explica a alta atividade das frações polares, que é provavelmente devida à presença de compostos fenólicos, como flavonóides e taninos, verificada anteriormente no EHEL (DONATINI, 2003).

Flavonóides e taninos são compostos polifenólicos bastante reconhecidos por sua ação antioxidante. Estudos demonstraram que os flavonóides não reagem especificamente com uma única ROS, mas com diversas delas (ânion superóxido, radical hidroxila, radicais peroxila). Alguns autores sugerem que o efeito sinérgico de misturas de flavonóides pode ser responsável pela alta atividade antioxidante observada em extratos vegetais (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os taninos constituem outra classe de substâncias com acentuada ação antioxidante e, como os flavonóides, atuam como captadores de radicais,

interceptando o oxigênio ativo e formando radicais estáveis (SANTOS; MELLO, 2004).

Estudos fitoquímicos preliminares do EHEL indicaram a presença de taninos (43,3%) e flavonóides (1,2% calculados como quercetina) (DONATINI, 2003).

Diversos taninos hidrolisáveis foram identificados em extratos de folhas de *S. jambos* (CHAKRAVARTY et al., 1998; OKUDA et al., 1982; YANG et al., 2000).

Os taninos têm a capacidade de precipitar microproteínas no local da úlcera, formando uma película protetora que previne a absorção de substâncias tóxicas e promove resistência à ação de enzimas proteolíticas (AUDI et al., 1999; JOHN; ONABANJO, 1990). O ácido tânico, que é classificado dentro de um grupo de taninos hidrolisáveis, suprime a secreção gástrica e a acidez total, além de ser capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões (EZAKI et al., 1985).

Entre os flavonóides presentes nas folhas de *S. jambos*, Slowing, Carretero e Villar (1996) identificaram dois glicosídeos (3-O-β-D-xilopiranosil (1,2) α-L-ramnopiranosídeo de miricetina e 3-O-β-D-xilopiranosil (1,2) α-L-ramnopiranosídeo de quercetina).

Diversos mecanismos foram propostos para elucidar a ação de gastroproteção dos flavonóides. Estes incluem o aumento do conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica, a redução da secreção de histamina pelos mastócitos através da inibição da histidina descarboxilase e a inibição do crescimento do *H. pylori* (BORRELLI; IZZO, 2000).

Os flavonóides são capazes de reduzir a formação de PAF, que é liberado por neutrófilos durante o dano gástrico (IZZO et al., 1994). Além disto, flavonóides exercem atividade seqüestrante de ROS significativa *in vivo* e *in vitro* e podem interferir com a produção de metabólitos do ácido araquidônico, através da inibição

da enzima lipoxigenase, e reduzir a concentração de leucotrienos (ALARCON DE LA LASTRA; LÓPEZ; MOTILVA, 1993).

De acordo com a literatura, um dos requisitos estruturais para a atividade antiúlcera dos flavonóides é a presença de dois grupos orto-hidroxi, como encontrado na quercetina e na miricetina (LEWIS; HANSON, 1991). Desta forma, a presença de glicosídeos de quercetina e miricetina em extratos de folhas de *S. jambos* pode constituir um importante fator na atividade antiulcerogênica do EHEL.

Sendo um dos flavonóides mais estudados, a quercetina demonstrou efeito significativo na prevenção de lesões na mucosa gástrica a partir de vários modelos experimentais (MARTIN; MOTILVA; ALARCON DE LA LASTRA, 1993; IZZO et al., 1994; DI CARLO et al., 1994).

A quercetina ocasiona um aumento no conteúdo de glicoproteínas neutras na mucosa gástrica (DI CARLO et al., 1999). Estas glicoproteínas são consideradas as mais importantes na capacidade defensiva da mucosa gástrica, e este aumento facilitaria o restabelecimento da barreira mucosa contra a agressão ocasionada pelo etanol (BORRELLI; IZZO, 2000).

Mais um mecanismo sugerido é o estímulo da produção local de prostaglandinas, uma vez que a quercetina é capaz de estimular a enzima ciclooxigenase (MORONEY et al., 1988). Outros mecanismos propostos incluem a inibição da bomba de prótons, a inibição da via da lipoxigenase, a inibição da síntese de PAF e a inibição da peroxidação lipídica (DI CARLO et al., 1999; MORONEY et al., 1988; ALARCON DE LA LASTRA; MARTIN; MOTILVA, 1994). Além disto, a quercetina é capaz de inibir o crescimento do *H. pylori* em ensaios *in vitro* (BEIL; BIRKHOLZ; SEWING, 1995).

A fração etanólica do EHEL, que apresentou maior atividade seqüestrante de radicais DPPH, foi também a mais efetiva na proteção gástrica no modelo de indução de úlcera por etanol/HCl (DONATINI, 2003). Esses resultados corroboram a influência da atividade antioxidante na proteção de úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado e sua relação com substâncias de caráter fenólico, provavelmente presentes em maior quantidade nesta fração. O perfil cromatográfico da fração etanólica do EHEL, realizado por Donatini (2003) apresentou, em diferentes sistemas cromatográficos, uma substância de mesma coloração e mesmo Rf do padrão de rutina, glicosídeo de quercetina, além de diversos outros compostos fenólicos. Desta forma, tornam-se necessários estudos fitoquímicos mais detalhados desta fração.

A fração clorofórmica do EHEL de *S. jambos* apresentou, no modelo de indução por etanol/HCL, redução significativa ($p < 0,05$) na formação de lesões hemorrágicas, em comparação ao grupo controle (DONATINI, 2003). Esses resultados orientaram os estudos fitoquímicos dessa fração, que foi submetida a uma nova separação através de coluna filtrante, cromatografia em coluna e CCD preparativa. Este novo fracionamento resultou no isolamento da substância (1) que, através de análise por RMN¹H e ¹³C e comparação com os dados da literatura (TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004), foi identificada como o triterpeno pentacíclico ácido ursólico (ácido urs-3 β -hidroxi-12-en-28-óico).

No espectro de RMN¹³C observou-se carbonos olefínicos em $\delta 139,1$ (C-13) e $\delta 125,5$ (C-12); carbono carbinólico em $\delta 78,0$ (C-3); carbono carbonílico em $\delta 179,7$ (C28) e 7 grupos metilas na faixa entre $\delta 15,5$ e $\delta 28,6$.

Diversos terpenóides têm apresentado atividade antiúlcera significativa. Nam e colaboradores (2006) verificaram que a administração oral de um glicosídeo

triterpênico (NIF₁) e de sua aglicona (23-HTA), extraídos dos frutos de *Rubus coreanus*, ocasionou a redução na extensão de úlceras gástricas induzidas por etanol/salicilato de sódio, bem como a diminuição da secreção de ácido em ratos.

O primeiro fármaco efetivo contra as úlceras gástricas, a carbenoxolona, foi obtido a partir de saponinas triterpênicas de rizomas de alcaçuz (BORRELLI; IZZO, 2000). Extensivamente estudada, a carbenoxolona demonstrou excelente ação estimulante da produção de muco, aumento do conteúdo gástrico de prostaglandinas e ação inibidora da secreção de pepsina (LEWIS; HANSON, 1991).

Triterpenos pentacíclicos, incluindo o ácido ursólico, apresentaram atividade antiulcerogênica em modelos de indução de úlcera gástrica induzida por estresse e ligadura de piloro, além de apresentarem também atividade antiinflamatória (LEWIS; HANSON, 1991).

Ringbom e colaboradores (1998) sugerem que a atividade antiinflamatória e antiúlcera do ácido ursólico *in vitro* e *in vivo* podem ser parcialmente explicadas por uma inibição seletiva da atividade da enzima ciclooxygenase-2.

O mecanismo da atividade antiinflamatória do ácido ursólico tem sido atribuído a vários fatores, que incluem a inibição de diversos eventos inflamatórios como a liberação de histamina pelos mastócitos, a atividade da ciclooxygenase-2 e da 5-lipoxigenase, a atividade da elastase e do complemento, e produção de óxido nítrico (ALTINIER et al., 2007). Além disto, o ácido ursólico apresentou atividade significativa na inibição de superóxidos produzidos em sistemas celulares (ALI et al., 2007). Grande parte destes fatores está envolvida também na formação de úlceras gástricas, de acordo com o apresentado na revisão da literatura neste trabalho. Desta forma, a presença do ácido ursólico no EHCL de folhas de *S. jambos* poderia também contribuir para a atividade antiulcerogênica do mesmo.

A cultura popular ainda hoje mantém a crença de que “se é natural, não faz mal”. Dessa forma, as plantas são empregadas indiscriminadamente no tratamento de doenças, sem qualquer informação sobre as possíveis conseqüências, principalmente em tratamentos prolongados. No entanto, a planta medicinal é um xenobiótico (produto estranho ao organismo), devendo ser encarado como potencialmente tóxico até prova em contrário. Vale lembrar ainda que substâncias altamente tóxicas, como a esticnina, a digitoxina, os curares e os heterosídeos cianogênicos, são extraídas de vegetais (LAPA et al., 2004).

Os medicamentos fitoterápicos devem ser submetidos, como os fármacos novos, a testes de eficácia e segurança. A RDC n.48 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004), que regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos, exige, entre outros itens, a validação de segurança de uso através de estudos toxicológicos pré-clínicos e clínicos, além da validação da indicação terapêutica.

Apesar do uso popular das folhas de *S. jambos*, não há na literatura dados sobre a toxicidade deste vegetal. Na avaliação da toxicidade aguda do EHEL de *S. jambos*, a administração oral do extrato na dose de 5 g/kg ocasionou a morte de 7 animais entre os 10 tratados. Posteriormente, o valor de DL₅₀ encontrado para o EHEL de *S. jambos* foi de 4,68 g/kg, dose esta mais de dez vezes maior do que a utilizada nos ensaios farmacológicos, com atividade significativa (DONATINI, 2003).

Neste trabalho, a toxicidade subcrônica do EHEL foi avaliada através da administração do EHEL nas doses de 400, 1000 e 2500 mg/kg, por via oral, durante 30 dias. Ao longo do tratamento foram determinados a cada 2 dias, a massa corpórea de cada animal e o consumo de água e ração.

Os animais machos que receberam a menor dose do EHEL (400 mg/kg) apresentaram, por volta do 17º dia de tratamento até o 27º, um aumento no consumo de água. Nas demais doses e entre as fêmeas, o perfil de consumo permaneceu semelhante ao do grupo controle.

Quanto ao consumo de ração, houve uma diminuição na ingestão para os animais machos e fêmeas entre o 15º e 19º dia de tratamento, sendo esta redução mais evidente nos animais que receberam a dose mais alta do EHEL (2500 mg/kg).

O acompanhamento da massa corpórea do animal é um importante indicador para a avaliação de toxicidade de uma substância. Uma diminuição da massa corpórea ou a redução no ganho de peso pode refletir uma série de respostas, incluindo anorexia induzida pelo tratamento ou toxicidade sistêmica. Por outro lado, um aumento no ganho de massa corpórea pode ser considerado uma resposta tóxica, freqüentemente associada com a redução da longevidade (JAHN; GÜNZEL, 1997).

O EHEL não alterou o ganho de massa corpórea na maioria dos grupos, para ambos os sexos. Apenas os animais machos que receberam a dose mais alta de EHEL apresentaram redução no ganho de massa corpórea, em comparação aos demais grupos, sendo, ao final do experimento, extremamente significativa em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$).

Não houve óbito de nenhum dos animais durante os 30 dias de administração do EHEL. Não foi observada diferença significativa entre a relação massa órgão/animal dos animais fêmeas e machos tratados em relação ao grupo controle. A análise macroscópica dos órgãos (fígado, rins, coração, pulmão) também não apresentou diferenças aparentes. Além disso, na avaliação histopatológica, não

foram observadas alterações dignas de nota em nenhum dos órgãos, de animais machos e fêmeas, para nenhuma das doses empregadas.

Apesar de não haver diferenças significativas nos resultados dos parâmetros bioquímicos em relação ao grupo controle, nota-se um aumento dose-dependente nos valores de glicose e de uréia. A elevação dos níveis plasmáticos de uréia fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico (ADEBAYO et al., 2003; VIJAYALAKSHMI; MUTHULAKSHMI; SACHDANANDAM, 2000).

De acordo com os resultados da toxicidade aguda (DONATINI, 2003) e subcrônica, o EHEL de *S. jambos* não se mostrou tóxico quando administrado a roedores. O valor obtido de DL₅₀ para o EHEL em ratos (4680 mg/kg) é ainda muito alto quando comparado, por exemplo, ao extrato de *Panax ginseng* (750 mg/kg em ratos) (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006), muito utilizado pela população. No entanto, em virtude da variação da massa corpórea dos machos que receberam a dose mais alta de EHEL e do aumento nos valores de uréia, são necessários estudos de toxicidade crônica do extrato para que se possa confirmar a baixa toxicidade do mesmo.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que o EHEL de folhas de *S. jambos* apresentou atividade antiulcerogênica em modelo de indução por etanol/HCl de maneira dose-dependente, sendo a dose de 400 mg/kg a mais eficaz ($p < 0,001$).

A presença de glicosídeos de quercetina e miricetina em folhas de *S. jambos*, de acordo com a literatura, e do ácido ursólico, isolado neste trabalho a partir da fração clorofórmica, provavelmente contribua para a atividade citoprotetora do EHEL. No entanto, não pode ser descartado o efeito sinérgico entre estas e outras diversas substâncias, uma vez que, em estudos anteriores, a atividade antiulcerogênica do EHEL foi superior à das frações testadas.

Em modelo de indução por ácido acético, o EHEL de folhas de *S. jambos* não apresentou atividade antiúlcera na dose de 400 mg/kg.

Na avaliação da capacidade seqüestrante de radicais DPPH, o EHEL de folhas de *S. jambos* apresentou CE_{50} de $5,36 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$. Das frações testadas (hidroetanólica, etanólica, clorofórmica e acetato de etila), a fração etanólica foi a que apresentou melhor atividade antioxidante ($CE_{50} = 6,89 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$).

A administração oral por 30 dias do EHEL de folhas de *S. jambos*, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em ratos Wistar adultos, pois durante o tratamento nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. Em adição, a análise macroscópica dos órgãos, bem como a avaliação histológica não demonstraram evidências de toxicidade. No entanto, houve diminuição significativa no ganho de massa corpórea dos animais machos que receberam a dose mais alta de extrato.

8 REFERÊNCIAS

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A. Antiviral activity of medicinal plant extracts. **Phytotherapy Research**, v.11, p.198-202, 1997.

ABDALLA, D.S.P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S., ed. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap.1.4, p.37-55.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.48, de 16 de março de 2004**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>. Acesso em: 24 out. 2007.

ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; LÓPEZ, A.; MOTILVA, V. Gastroprotection and prostaglandin E₂ generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. **Planta Medica**, v.59, p.497-501, 1993.

ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M.J.; MOTILVA, V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. **Pharmacology**, v.34, p.2477-2482, 1994.

ALBIERO, A.L.M.; SERTIÉ, J.A.A.; BACCHI, E.M. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v.82, p.41-44, 2002.

ALI, M.S.; IBRAHIM, S.A.; JALIL, S.; CHOUDHARY, M.I. Ursolic acid: a potent inhibitor of superoxides produced in the cellular system. **Phytotherapy Research**, v.21, n.6, p.558-561, 2007.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R.P.; MENCHERINI, T.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.5, p.1718-1723, 2007.

AUDI, E.A.; TOLEDO, D.P.; PERES, P.G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W.K.; DE MELLO, J.C.; NAKAMURA, C.; ALVES DO PRADO, W.; CUMAN, R.K.; BERSANI-AMADO, C.A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, v.13, n.3, p.264-266, 1999.

AURICCHIO, M.T. **Estudo farmacognóstico de folhas de *Eugenia uniflora* L.** São Paulo, 2001. 128p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ÁVILA-PEÑA, D.; PEÑA, N.; QUINTERO, L.; SUÁREZ-ROCA, H. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.380-385, 2007.

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

BANDYOPADHAYAY, U.; DAS, D.; BANDYOPADHAYAY, D.; BHATTACHARJEE, M.; BANERJEE, R.K. Role of reactive oxygen species in mercaptomethylimidazole-induced gastric ulceration. **Current Science**, v.76, p.55-63, 1999.

BARROS, S.B.M.; TEIXEIRA, D.S.; AZNAR, A.E.; MOREIRA Jr.; J.A.; ISHII, I.; FREITAS, P.C.D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (Pariparoba). **Ciência e Cultura**, v.48, p.114-116, 1996.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1984. v.2, p.114-133. (Livro didático IB).

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K.F. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Arzneimittel Forschung**, v.45, n.6, p.697-700, 1995.

BIRDANE, F.M.; CEMEK, M.; BIRDANE, Y.O.; GÜLÇİN, İ.; BÜYÜKOKUROĞLU, M.E. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.4, p.607-611, 2007.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v.14, p.581-591, 2000.

BRUNTON, L.L. Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamento de úlceras pépticas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.663-674.

CHAKRAVARTY, A.K.; DAS, B.; SARKAR, T.; MASUDA, K.; SHIOJIMA, K. Ellagic acid derivatives from the leaves of *Eugenia jambos* Linn. **Indian Journal of Chemistry**, v.37, Sect.B, p.1316-1318, 1998.

CHAN, F.K.; LEUNG, W.K. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v.360, p.933-941, 2002.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S., coords. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: UNICAMP, 1997. 279p.

CRAVO, A.B. **Frutas e ervas que curam: a panacéia vegetal**. 4.ed. São Paulo: Hemus, 1994. p.120.

CRAWFORD, J.M. O trato gastrintestinal. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T., eds. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.697-758.

CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 2.ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982. 599p.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Effect of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytotherapy Research**, v.8, p.42-45, 1994.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.65, n.4, p.337-353, 1999.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. p.323-330.

DJIPA, C.D.; DELMEE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.307-313, 2000.

DONATINI, R.S. **Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Syzygium jambos* (L.) Alston**. São Paulo, 2003. 95p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

EZAKI, N.; KATO, M.; TAKIZAWA, N.; MORIMOTO, S.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* Ramus. IV. Effects of condensed tannin related compounds on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. **Planta Medica**, v.51, p.34-38, 1985.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.448-449. (Código farmacêutico brasileiro, v.1).

FERRI, M.G. Informações sobre transpiração e anatomia foliar de diversas mirtáceas. **Ciência e Cultura**, v.23, p.313-316, 1971.

FISHER, A.A.; LE COUTEUR, D.G. Nephrotoxicity and hepatotoxicity of histamine H₂ receptor antagonists. **Drug Safety**, v.24, p.39-57, 2001.

FRAME, A.D.; RIOS-OLIVARES, E.; DE JESUS, L.; ORTIZ, D.; PAGAN, J.; MENDEZ, S. Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v.17, n.3, p.243-252, 1998.

GONZALEZ, F.G.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.41-47, 2001.

GONZALEZ, F.G.; DI STASI, L.C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, v.9, p.125-134, 2002.

GONZALEZ, P.; SORIANO, V.; LOPEZ, P.; NIVEIRO, E. Anaphylaxis to proton pump inhibitors. **Allergologia et Immunopathologia**, v.30, n.6, p.342-343, 2002.

GUEDES, C.M.; PINTO, A.B.; MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C.A.B. Study of the aroma compounds of rose apple (*Syzygium jambos* Alston) fruit from Brazil. **European Food Research and Technology**, v.219, p.460-464, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. Oxford; New York: Oxford University Press, 2007.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

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

HEO, H.J.; KIM, C.; LEE, H.J.; KIM, Y.S.; KANG, S.S.; SEO, U.K.; KIM, Y.H.; PARK, Y.C.; SEOK, J.H. LEE, C.J. Carbenoxolone and triterpenoids inhibited mucin secretion from airway epithelial cells. **Phytotherapy Research**, v.21, n.5, p.462-465, 2007.

HIRUMA-LIMA, C.A.; CALVO, T.R.; RODRIGUES, C.M.; ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v.104, p.215-224, 2006a.

HIRUMA-LIMA, C.A.; SANTOS, L.C.; KUSHIMA, H.; PELIZZON, C.H.; SILVEIRA, G.G.; VASCONCELOS, P.C.P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.207-214, 2006b.

HOANG, V.L.; NGUYEN, Q.T. Chemical compositions of *Syzygium jambos* (Linn) Alston. **Tap Chi Phan Tich Hoa, Ly Va Sinh Hoc**, v.9, n.1, p.20-23, 2004.

HUNG, C.R.; WANG, P.S. Gastric oxidative stress and hemorrhagic ulcer in *Salmonella typhimurium*-infected rats. **European Journal of Pharmacology**, v.491, p.61–68, 2004.

ISHIKAWA, T. **Estudo farmacognóstico do cambucá *Plinia edulis* (Vell.) Sobral – Myrtaceae**. São Paulo, 2004. 128p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

IZZO, A.A.; DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F. Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. **Phytotherapy Research**, v.6, p.179-181, 1994.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**, v.11, p.171-178, 1997.

JAYASINGHE, U.L.; RATNAYAKE, R.M.; MEDAWALA, M.M.; FUJIMOTO, Y. Dihydrochalcones with radical scavenging properties from the leaves of *Syzygium jambos*. **Natural Product Research**, v.21, n.6, p.551-554, 2007.

JOHN, T.A.; ONABANJO, A.O. Gastroprotective effects of an aqueous extract of *Entandrophragma utile* bark in experimental ethanol-induced peptic ulceration in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.29, p.87–93, 1990.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 2.ed. São Paulo: Nacional, 1975. 777p. (Biblioteca universitária: Série 3a, Ciências puras, v.4).

JORGE, L.I.F.; AGUIAR, J.P.L, SILVA, M.L.P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* – Myrtaceae). **Acta Amazônica**, v.30, p.49-57, 2000.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOSOWSKI, T.; KONTUREK, J.W.; PAWLIK, W.W. From nerves and hormones to bacteria in the stomach: nobel prize for achievements in gastrology during last century. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.56, n.4, p.507-530, 2005.

KUIATE, J.R.; MOUOKEN, S.; WABO, H.K.; TANE, P. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Phytotherapy Research**, v.21, p.149-152, 2007.

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

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. p.247-262.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, n.4, p.969-978, 1988.

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progress in Medicinal Chemistry**, v.28, p.201-231, 1991.

LIMA, Z.P.; SEVERI, J.A.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.M.S.; SOLIS, P.N.; CÁCERES, A.; GIRÓN, L.M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.29-37, 2006.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. p.350-357.

MARHUENDA, E.; MARTIN, M.J.; ALARCON DE LA LASTRA, C. Antiulcerogenic activity of aescine in different experimental models. **Phytotherapy Research**, v.7, p.13-16, 1993.

MARKMAN, B.E.O. **Estudo farmacognóstico de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. – Myrtaceae**. São Paulo, 2002. 162p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MARKMAN, B.E.O.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.55-57, 2004.

MARTIN, M.J.; MOTILVA, V.; ALARCON DE LA LASTRA, C. Quercetin and naringenin: effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. **Phytotherapy Research**, v.7, p.150-153, 1993.

MATSUDA, H.; TANAKA, A.; ITAKURA, A. Immunology and hematology. In: KRINKE, G.J., ed. **The laboratory rat**. San Diego, London: Academic Press, 2000. p.437-441. (The Handbook of Experimental Animals).

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Oxford: Claredon Press, 1950. v.1, p.620-631.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.33, p.939-945, 1983.

MOGHADDAM, F.M.; FARIMANI, M.M.; SALAHVARZI, S.; AMIN, G. Chemical constituents of dichloromethane extract of cultivated *Satureja khuzistanica*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.4, n.1, p.95-98, 2007.

MOLYNEUX, P. Use of DPPH to estimate antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MORONEY, M.A.; ALCARAZ, M.J.; FOLDER, R.A.; CAREY, F.; HOULT, S.R.S. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.40, p.787-792, 1988.

NAM, J.H.; JUNG, H.J.; CHOI, J.; LEE, K.T.; PARK, H.J. The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.5, p.967-970, 2006.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; YAZAKI, K.; ASHIDA, M. Ellagitannins of the Casuarinaceae, Stachyuraceae and Myrtaceae. **Phytochemistry**, v.21, n.12, p.2871-2874, 1982.

PIHAN, G.; REGILLO, C.; SZABO, S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. **Digestive Diseases and Sciences**, v.32, n.12, p.1395-1401, 1987.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1969. v.4, p.427.

RA, A.; TOBE, S.W. Acute interstitial nephritis due to pantoprazole. **Annals of Pharmacotherapy**, v.38, p.41-45, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p.419-433.

RAO, B.G.V.N.; NIGAM, S.S. Chemical examination of the essential oil from *Eugenia jambos*. **Perfumery and Essential Oil Record**, v.60, n.7/8, p.282-286, 1969.

RINGBOM, T.; SEGUA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. **Journal of Natural Products**, v.61, p.1212-1215, 1998.

RODRIGUEZ, J.A.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA BRITO, A.R. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Human & Experimental Toxicology**, v.23, n.9, p.455-461, 2004.

ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, v.77, p.761-767, 1979.

ROMERO JIMÉNEZ, M. Acción cardiovascular de extractos acuosos de hojas de *Syzygium jambos* (L.) Alston. **Revista Costarricense de Ciencias Médicas**, v.16, n.3, p.17-25, 1995.

ROSAM, A.C.; WALLACE, J.L.; WHITTLE, B.J.R. Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach. **Nature**, v.319, p.54-56, 1986.

SABESIN, S.M. Safety issues relating to long-term treatment with histamine H₂-receptor antagonists. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.7, suppl.2, p.35-40, 1993.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. p.615-656.

SHOME, U.; RAWAT, A.K.S.; MEHROTRA, S. Time-tested household herbal remedies. In: JAIN, S.K., ed. **Ethnobiology in human welfare**. Lucknow: Deep Publications, 1996. v.106, p.17-21. [Abstracts of the fourth International Congress of Ethnobiology, Lucknow, 1994].

SILVA, M.G. **Estudo farmacognóstico de *Myrciaria glomerata* Berg. – Myrtaceae**. São Paulo, 2001. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Anti-inflammatory compounds of *Eugenia jambos*. **Phytotherapy Research**, v.10, p.S126-S127, 1996.

SON, I.S.; KIM, J.H.; SOHN, H.Y.; SON, K.H.; KIM, J.S.; KWON, C.S. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.71, n.12, p.3063–3071, 2007.

SOUSA, C.M.M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA Jr., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA BRITO, A.R.M. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: UNICAMP, 1994. 122p.

STEVENS, K.R.; GALLO, M.A. Practical considerations in the conduct of chronic toxicity studies. In: HAYES, W.A., ed. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1982. p.53-57.

TÁBORA, E.; BERTRAND, L. Aislamiento de una lectina termoestable de las semillas de *Eugenia jambos*. **Revista Latinoamericana de Química**, v.11, p.134-136, 1980.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.19, p.418-426. 1969.

TAKAHASHI, H.; SUZUKI, T.; MURATA, K. Inhibitor for improving hair growth and preventing aging of skin, comprises *Myrica nagi*, *Rhododendron arboreum*, *Saraca indica*, *Bauhinia forficata*, and/or *Syzygium jambos* as active ingredients. JP 2006257057, 28 Sep 2006.

TAKETA, A.T.C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E.P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n.2, p.205-211, 2004.

TEIXEIRA, C.C.; FUCHS, F.D.; BLOTTA, R.M.; KNIJNIK, J.; DELGADO, I.C.; NETTO, M.S.; FERREIRA, E.; COSTA, A.P.; MÜSSNICH, D.G.; RANQUETAT, G.G.; GASTALDO, G. Effect of tea prepared from leaves of *Syzygium jambos* on glucose tolerance in nondiabetic subjects. **Diabetes Care**, v.13, n.8, p.907-908, 1990.

TEIXEIRA, C.C.; FUCHS, F.D.; BLOTTA, R.M.; COSTA, A.P. MUSSNICH, D.G.; RANQUETAT, G.G. Plants employed in the treatment of diabetes mellitus: results of an ethnopharmacological survey in Porto Alegre, Brazil. **Fitoterapia**, v.63, n.4, p.320-322, 1992.

TEIXEIRA, C.C.; FUCHS, F.D. The efficacy of herbal medicines in clinical models: the case of jambolan. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p.16-19, 2006.

TOMA, W.; GRACIOSO, J.S.; ANDRADE, F.D.P.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.9, p.1151-1155, 2002.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n. 2, p.289-306, 2006.

VERNIN, G.; METZGERM, J.; ROQUE, C.; PIERIBATTESTI, J.C. Volatile constituents of the Jamrosa aroma *Syzygium jambos* L. Aston from Reunion Island. **Journal of Essential Oil Research**, v.3, n.2, p.83-97, 1991.

WALLACE, J.L.; MACNAUGHTON, W.K. Gastrointestinal damage induced by platelet-activating factor: role of leukotrienes. **European Journal of Pharmacology**, v.151, p.43-50, 1988.

WONG, K.C.; LAI, F.Y. Volatile constituents from the fruits of four *Syzygium* species grown in Malaysia. **Flavour and Fragrance Journal**, v.11, n.1, p.61-66, 1996.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, v.157, n.1, p.65-75, 2000.

ZLABEK, J.A.; ANDERSON, C.G. Lansoprazole-induced thrombocytopenia. **Annals of Pharmacotherapy**, v.36, n.5, p.809-811, 2002.

ANEXO I – Aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA nº 73/2006

São Paulo, 09 de outubro de 2006.

Ilmo(a) Sr(a).
Raquel dos Santos Donatini
Orientador Profa. Elfriede Marianne Bacchi
FBF

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 09 de outubro de 2006, **APROVOU** o projeto "Atividades antiúlcera e antioxidante de *Syzygium jambos* (L.) Alston" (Protocolo CEEA nº 127), apresentado por Vossa Senhoria, lembrando, apenas, que existe uma recomendação internacional sobre a não utilização do éter para anestesia.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA