



***ATIVIDADE ANTI-ULCEROGÊNICA E AVALIAÇÃO
DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICOS
DO β -MIRCENO***



Flávia Bonamin



***ATIVIDADE ANTI-ULCEROGÊNICA E AVALIAÇÃO
DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICOS
DO β -MIRCENO***

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA

*Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia
do Instituto de Biociências de Botucatu como
requisito para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas (AC: Farmacologia).*

Botucatu – SP
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Bonamin, Flávia.

Atividade antiulcerogênica e avaliação dos mecanismos de ação
antiulcerogênicos do β -Mirceno / Flávia Bonamin. – Botucatu : [s.n.],
2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Botucatu, 2010

Orientadora: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Co-orientadora: Lúcia Regina Machado da Rocha

Assunto CAPES: 20300000

1. Produtos naturais - Efeitos fisiológicos 2. Úlcera - Tratamento

Palavras-chave: β -Mirceno; Monoterpeno; Produtos naturais; Úlcera

Flávia Bonamin



***ATIVIDADE ANTI-ULCEROGÊNICA E AVALIAÇÃO
DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICOS
DO β -MIRCENO***

*Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia
do Instituto de Biociências de Botucatu como
requisito para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas (AC: Farmacologia).*

Comissão Examinadora:

1º Titular/Presidente: Prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma-Lima (UNESP/Botucatu)

2º Titular: Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi (UNESP/Botucatu)

3º Titular: Prof^a. Dr^a. Elfriede Marianne Bacchi (USP/SP)

1º Suplente: Prof^a. Dr^a. Fabiana Gaspar Gonzales (UNISANTA/Santos)

2º Suplente: Prof^o. Dr^o. Leonardo Noboru Seito (UNESP/Botucatu)

Botucatu
2010

Auxílio Financeiro: **CAPES**
(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)



"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

Albert Einstein

O Altíssimo faz sair da terra os medicamentos, e o
homem
sensato não os rejeita. Não foi por um pedaço de
madeira que ficou doce a água, para que as
pessoas reconhecessem assim a força de Deus?
O Altíssimo deu aos homens a ciência,
para que pudessem honrá-lo por suas maravilhas. Com
os
remédios o médico acalma a dor e, com eles, o
farmacêutico prepara os ungüentos: assim, suas obras
não ficam
inacabadas e a saúde se difunde sobre a terra...

Eclesiástico 38:4-8



Dedicatória

*A **Deus**, essência da minha vida, por ter me guiado até aqui e por ter permitido a concretização de mais este sonho.*

*Dedico o meu trabalho também a cada um dos **camundongos e ratos** que “doaram” suas vidas em prol da nobre tentativa de se obter novos medicamentos que amenizem e curem as mazelas da humanidade.*

“... aprendi a entender que vocês são duas das poucas pessoas que são capazes de me tornar muito feliz! Parei de falar com a mente vazia e comecei a falar palavras guardadas dentro do meu coração que por bastante tempo ficaram caladas. Hoje tenho vocês e meu maior bem: amor de pai e mãe.”

Autor desconhecido

*Aos meus queridos pais, **Juliana e José Carlos,**
Pelo sacrifício, amor, dedicação e acima de tudo
pela grande torcida nesses importantes anos da minha vida.
Lágrimas existiram pela saudade ou até mesmo
de alegria, porém nos fizeram ser a cada dia mais: **PAI,**
MÃE E FILHA.
AMO vocês incondicionalmente!!!
Fabinho, essa é pra você também!!!*

“...Te amo con toda mi fe, sin
medida...”

Maná

*Ao meu **namorado** e grande amigo, **Celso-Saks**.*

*Muito obrigada pelo amor, confiança e companheirismo
dedicados nessa importante fase de nossas vidas.*

*Saiba que todas as conquistas também
foram para você.*

Obrigada por fazer parte da minha vida!

Mil beijos!



Agradecimientos

“E eu poderia suportar, embora não sem dor, que
tivessem morrido todos os meus amores, mas
enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!
Até mesmo aqueles que não percebem o quanto são meus
amigos
e o quanto minha vida depende de suas existências...
A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles
existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em
frente pela vida.”

Amigos – Vinicius de Moraes

Este trabalho não teria sido elaborado sem o auxílio de diversas pessoas às quais quero expressar meus sinceros agradecimentos. Começo então agradecendo,

*À minha querida **co-orientadora Profa. Dra. Lúcia Rocha** por TODOS os ensinamentos e pela AMIZADE em mais esta etapa da minha vida.*

*Aos meus **companheiros fugazes** de laboratório, minha segunda família: **Catarine “Trebs”** (ou Kreps!!! Amiga dos estrongilóides ObrEEgada!!); **Thiago “Mingo”** (o Demolidor!!); **Hélio “Pompom”** (o SUPER-Ben 10 do Daltinho); **Marília “Kktua”** (a menina SUPER expert em Word 2003, só nas gambiarras rsrs); **Raquel “Pocotó”** (úlceras??nãooo, diarréia!!!!); **Sílvia “Lécéfé”** (companheeeeeira) e **Paty** (Manah-manah) pelo companheirismo e pela graaaaande amizade que há entre a gente.*

*Em especial, agradeço à **Raquel “Pocotó”**, minha companheira de laboratório, de experimentos de finais de semana e feriados, de idéias loucas de cientistas rs, ou seja...PARCEIRA TOTAL! Obrigada!!!*

***Ao Lab Mirtes e seus alunos** pela grande AMIZADE e parceria durante o mestrado. São muuuuitas lembranças gostosas na memória!!!*

***Aos funcionários do Departamento de Fisiologia** pelos auxílios gerais durante o projeto.*

À **Janete** pela AMIZADE, pela ALEGRIA, mesmo tendo jogado fora minha comida algumas vezes!!! Ê janeeeeete rsrs!!!

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** por todos os auxílios.

Às “**Meninas do Di Stasi + Leo**” pela AMIZADE tão gostosa e por compartilhar comigo taaantas vezes o laboratório de vocês!!!!

À minha **República** por mais um ano de alegrias e companheirismo – momentos que ficarão guardados para sempre na minha memória!!! Adoro vocês – **Andréia “Garrinxá”** (é com vc BiAAAL!!! rsrs), **Taísa, Micheli e Gabriela**.

À **XXXVIII BIO** que mesmo longe está unida na mente de cada um, deixando saudades!!! E para sempre teremos “**ORGULHO DE SER XXXVIII BIO UNESP - BOTUCATU**”.

À **todos os amigos** que fiz em Botucatu...São mais de 8 anos de grandes momentos...de um sonho realizado. Todos vocês possuem um lugar especial no meu coração. Todos vocês que direta ou indiretamente ajudaram-me a vencer esta etapa da minha vida.

À **CAPES**, pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

Por último agradeço a **Deus**, o Criador do Universo, por todas as coisas belas e cheias de vida que Ele gerou e por todas as oportunidades maravilhosas que Ele me proporciona a cada dia.

Muito Obrigada!!!

*Agradeço, em especial, à minha querida **orientadora**
Clélia Akiko Hiruma-Lima, orientadora com letra
maiúscula! Ela foi a pessoa que me ensinou a traçar os caminhos
em uma estrada muitas vezes escura; verdadeiro exemplo de dedicação,
comprometimento e, sobretudo, AMIZADE. Muito obrigada por me apoiar!!!
Você é brilhante!!!*

“Metade de mim agora é assim
De um lado a poesia, o verbo, a saudade
Do outro a luta, a força e a coragem pra
chegar no fim
E o fim é belo e incerto... depende de como você vê
O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só.”

Fernando Anitelli

Prólogo

O projeto de mestrado possibilitou a formação específica em farmacologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos as úlceras pépticas. Durante a execução do projeto de mestrado, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional do aluno.

Trabalhos completos publicados em periódicos científicos

➔Gatroprotective effect of butanolic from *Vochysia tucanorum* Mart. on experimental gastric ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology, 2009.** Renata C. Gomes; Flávia Bonamin; Denise D. Darin; Luiz Claudio Di Stasi; Anne Lígia Dokkedal; Wagner Vilegas; Alba Regina M. Souza-Brito; Clélia Akiko Hiruma-Lima. **(anexo 2).**

➔Gastric Ulcer Healing Action from Alkaloid Fraction of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. **Journal of Natural Medicines, 2009.** Flávia Bonamin; Thiago de Mello Moraes; Marcelo Silva; Ariane Leite Rozza; Cláudia Helena Pellizzon; Taís Bauab; Lúcia Regina Machado da Rocha; Vagner Wilegas; Clélia Akiko Hiruma-Lima **(anexo 3).**

Trabalhos apresentados na forma de painel em evento científico internacional

➔ BONAMIN, Flávia; PELLIZON, Cláudia Helena; VILEGAS, Wagner; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. EVALUATION OF GASTRIC CICATRIZING ACTION OF METHANOL EXTRACT AND ALKALOID FRACTION OF *Strychnos pseudoquina* St. Hill (Loganiaceae) leaves. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil/X Internatiional Congress of Ethnopharmacology, São Paulo, 16-19 de setembro de 2008, pg 1025.

➔ BONAMIN, Flávia; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko; PELLIZON, Cláudia Helena; VILEGAS, Wagner. GASTRIC HEALING EFFECT OF METHANOLIC AND ALKALOIDIC FRACTION FROM *Strychnos pseudoquina*. In: 57° International Congress and Annual Meeting of the GA, 2009, Genebra. Planta Medica. Stuttgart : Thieme Journal, 2009. v. 75. p. 1063-1063.

➔ BONAMIN, Flávia; ROCHA, Lúcia Regina Machado; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. ANTI-ULCEROGENIC ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF β -MYRCENE. In: XVIII Congresso Italo-latinoamericano de etnomedicina, 2009, Havana- Cuba. XVIII Congresso Italo-latinoamericano de etnomedicina. Havana - Cuba : Silae, 2009. v. CD.

Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos nacionais

➔ BONAMIN, Flávia; ROCHA, Lúcia Regina Machado; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. AVALIAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO E DOS GRUPAMENTOS SULFIDRÍLICOS NO EFEITO GASTROPROTETOR DO β -MIRCENO. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de biologia Experimental-FESBE, 2009, Águas de Lindóia - SP. Anais da XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de biologia Experimental-FESBE. São Paulo : FESBE, 2009. v. CD.

➔ BONAMIN, Flávia; ROCHA, Lúcia Regina Machado; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE *Pouteria ramiflora* (MART.) RADLK (SAPOTACEAE) EM ÚLCERAS GÁSTRICAS. In: IX Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2009, São Paulo. Anais da IX Jornada Paulista de Plantas Medicinais. São Paulo, 2009. v. CD.

➔ BONAMIN, Flávia; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko; Pellizzon, Cláudia Helena; Vilegas, Wagner. AVALIAÇÃO DA AÇÃO CICATRIZANTE

GÁSTRICA DO EXTRATO METANÓLICO E DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DAS FOLHAS DE *Strychnos pseudoquina* St. Hill (LOGANIACEAE). In: VI Simpósio e VI Reunião de avaliação do Programa Biota/FAPESP, realizado no período de 8 a 12 de Julho de 2008 em Araraquara, São Paulo.

Organização de eventos científicos

- ➔ Comissão de Apoio do VII Workshop da Pós-Graduação, **2008**.
- ➔ Comissão Organizadora do VIII Workshop da Pós-Graduação, **2009**.
- ➔ Comissão Organizadora do IX Workshop da Pós-Graduação & X Workshop de Genética, **2010** (em andamento).

Participação em eventos científicos

- ➔ 40º Congresso Brasileiro da Farmacologia e Terapêutica Experimental, de 16-19 de Outubro de 2008. Águas de Lindóia/SP.
- ➔ XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil/X International Congresso of Ethnopharmacology, de 16-19 de Setembro de 2008. São Paulo/SP.
- ➔ XXII Reunião anual da FeSBE, de 19-22 de Agosto de 2009. Águas de Lindóia/SP.
- ➔ SILAE, de 14-18 de Setembro de 2009, HAVANA/CUBA.

Disciplinas Cursadas

- **Tópicos de atualização em ciências**. Prof. Dr. Ciro de Moraes Barros (1 crédito – Conceito A).
- **Parâmetros de sensibilidade** a drogas: modelos experimentais. Prof. Dr. Oduvaldo Marque Pereira (4 créditos – Conceito A).

- **Testes estatísticos aplicados á farmacologia.** Profa. Dra. Mirtes Costa (**2** créditos – Conceito B).
- **Tópicos de atualização em ciências.** Prof. Dr. Ciro de Moraes Barros (**1** crédito – Conceito A).
- **Metodologia e Redação Científica.** Prof. Gilson Volpato (**4** créditos – Conceito A).
- **Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático.** Profa. Dra. Sandra Cordellini (**3** créditos – Conceito A).
- Tópicos de atualização em ciências.** Prof. Dr. Ciro de Moraes Barros (**1** crédito – Conceito A).
- Neurofarmacologia e Comportamento.** Profa. Dra. Lígia e Mirtes Costa (**2** créditos – Conceito A).



Sumário

Sumário

Lista de abreviaturas	22
Resumo/abstract.....	24
Introdução.....	27
Secreção ácida gástrica.....	31
Mecanismos periféricos de regulação da secreção ácida gástrica	33
Estimulantes	33
Inibidores da secreção ácida gástrica	34
Mecanismos centrais da secreção ácida gástrica	35
Mecanismo de ação geral da secreção ácida gástrica	36
Importantes fatores protetores da mucosa gástrica	37
Justificativa da dissertação.....	52
Objetivos	54
Artigo	56
Conclusões	80
Referências bibliográficas.....	82
Anexo 1	99
Anexo 2	118
Anexo 3	125

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach = acetilcolina

Al(OH)₃ = hidróxido de alumínio

AMPc = adenosina monofosfato cíclica

ATP = adenosina trifosfato

CaCO₃ = carbonato de cálcio

CAT = catalase

CCK = colecistoquinina

CCKA = colecistoquinina A

CCKB = colecistoquinina B

CO₂ = gás carbônico

COX = isoenzima ciclooxygenase

DAINEs = Drogas antiinflamatórias não-esteroidais

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

ECL = células enterocromafins like

eNOS = NO sintase endotelial

ERNs = Espécies reativas de nitrogênio

EROs = Espécies reativas de Oxigênio

Gi = Proteína G inibitória

GPx = Glutathione peroxidase

GSH = Glutathione total

GSSG = Glutathione reduzida

H⁺/ K⁺/ ATPase = bomba de prótons

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

HCO₃ = bicarbonato

HTAB = tampão de reação

iNOS = forma induzida da NO sintase

IR = isquemia-resperfusão

L-NAME = Ng-nitro-L-arginine methyl-ester

MDA = malonildialdeído

Mg(OH)₂ = hidróxido de magnésio

MPO = mieloperoxidase

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

NaH_2CO_3 = bicarbonato de sódio

NaOH = hidróxido de sódio

NEM = N-etilmaleimida

nNOS = NO sintase neuronal

NO = Óxido Nítrico

NOS= No sintase

O_2 = oxigênio

PACAP = Peptídeo Ativador de Adenilato Ciclase Pituitário

PCNA = Proliferation cell nuclear antigen

PG = prostaglandina

PGE_2 = prostaglandina E_2

PGH_2 = prostaglandina H_2

PGI_2 = prostaglandina I_2

SHs = Compostos sulfidrílicos

SNC = Sistema Nervoso Central

SOD = superóxido dismutase

TCA = ácido tricloroacético

TGI = Trato gastrointestinal

UD = Úlcera duodenal



Resumo/Abstract

RESUMO

O estudo de novos compostos oriundos de plantas medicinais potencializa a descoberta de novas substâncias bioativas utilizadas na terapêutica. A caracterização fitoquímica do óleo essencial de *Citrus aurantium*, uma espécie medicinal que possui fortes indicativos de uso popular para gastrites e distúrbios do trato gastrointestinal (MORAES *et al.*, 2009), apontou a presença do monoterpene β -mirceno (1,43%) como um dos constituintes de sua composição. O resultado mais surpreendente deste composto é com relação a dose terapêutica de 7.5 mg/kg para a obtenção desta ação protetora gástrica em todos os animais avaliados. Os índices de proteção do β -mirceno na dose de 7.5 mg/kg variam de 60 a 86% de proteção da mucosa gástrica e duodenal o que representa uma equivalência a 13 vezes a ação da cimetidina (dose 100 mg/kg) ou 4 vezes o efeito do lansoprazol (30 mg/kg), duas drogas antiulcerogênicas padrão utilizadas em doses terapêuticas muito superior ao β -mirceno. Este monoterpene mostrou-se efetivo no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto com porcentagem de proteção de 66% e o controle positivo, a cimetidina, com 67% de proteção gástrica. Essa ação gastroprotetora ocorre devido à um aumento na produção de muco gástrico ($p < 0,05$) mesmo não favorecendo a expressão de PGE_2 na mucosa gástrica. Além disso, a potente atividade gastroprotetora do β -mirceno é completamente dependente da presença de NO e dos grupamentos sulfidrílicos (SHs) aliada à sua incrível atividade antissecretória gástrica, sem, no entanto, alterar a motilidade intestinal dos animais sob sua influência. Nossos resultados também apontam para uma potente ação antioxidante do β -mirceno quando o mesmo exerceu efetiva ação antiulcerogênica (86% de proteção) frente a lesões gástricas induzida pelo processo de isquemia e reperfusão da artéria celiaca que contribui para o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Neste modelo experimental, foi possível observar a atuação das espécies reativas de oxigênio (ERO) que promoveram lesões extremamente extensas na mucosa gástrica, mas que foram minimizadas pela ação do monoterpene. Com isso conclui-se que o β -mirceno apresenta um fabuloso potencial antiulcerogênico e antioxidante enfatizando a fantástica dose utilizada em todos os modelos experimentais.

ABSTRACT

The study of new compounds derived from medicinal plants enhances the discovery of new bioactive substances used in therapy. The phytochemical analysis of the essential oil of *Citrus aurantium*, a medicinal plant that has strong indications of popular use for gastritis and disorders of the gastrointestinal tract (MORAES *et al.*, 2009), noted the presence of the monoterpene β -myrcene (1.43%) as one of the constituents of its composition. The most surprising result of this compound is in relation to therapeutic dose of 7.5 mg/kg to obtain this protective action stomach in all animals evaluated. The rates of protection of β -myrcene at a dose of 7.5 mg/kg range from 60 to 86% protection of gastric and duodenal mucosa which represents an equivalent to 13 times the action of cimetidine (dose 100 mg/kg) or 4 times the effect of lansoprazole (30 mg/kg), two drugs antiulcerogenic standard used in therapeutic doses that are higher than β -myrcene. This monoterpene was effective in the model of induction of ulcer by absolute ethanol, whose percentage protection was 66%, and to positive control, cimetidine, 67% of gastric protection. This gastroprotective action occurs due to an increase in the production of gastric mucus ($p < 0.05$) although does not promote the expression of PGE₂ in the gastric mucosa. Furthermore, the potent gastroprotective activity of β -myrcene is completely dependent on the presence of NO and sulfhydryl groups (SHs) combined with its incredible gastric antisecretory activity without, however, alter the motility of the animals under its influence. Our results also point to a potent antioxidant activity of β -myrcene when it exercised effective anti-ulcer action (86% protection) against gastric lesions induced by the process of ischemia and reperfusion of the celiac artery that contributes to the flow of the gastric mucosa. In this experimental model, we could observe the action of reactive oxygen species (ROS) that promoted very extensive lesions in the gastric mucosa, but were minimized by the action of monoterpene. Thus it is concluded that the β -myrcene has an awesome potential and antioxidant antiulcerogenic emphasizing the fantastic dose used in all experimental models.



Introdução

INTRODUÇÃO

O Trato Gastrointestinal é constituído pelo tubo digestivo e suas glândulas secretoras anexas. É responsável pela digestão e absorção dos nutrientes encontrados no bolo alimentar e funciona, ao mesmo tempo, como barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o interno (SANIOTO, 1991). Quando existe falha nesta barreira de proteção, há o desenvolvimento de lesões nas paredes do trato gastrointestinal, conhecidas como *úlceras* (SILVERTHORN, 2003).

As úlceras pépticas (**figuras 1 e 2**) são lesões na mucosa gástrica e duodenal provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores (secreção de muco gastroduodenal, produção de bicarbonato, fluxo sangüíneo adequado) e lesivos (excesso de pepsina ou ácido clorídrico) da mucosa gástrica e duodenal (SHICHIJO *et al.*, 2003). Estas lesões podem ser agravadas pelo consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, estresse, uso de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs), fatores dietéticos, representados pelo consumo excessivo de café, refrigerantes e condimentos (HIRUMA-LIMA, 1998), presença da bactéria *Helicobacter pylori*, motilidade gastroduodenal, presença excessiva de ácidos e pepsina (EASTWOOD, 1997).

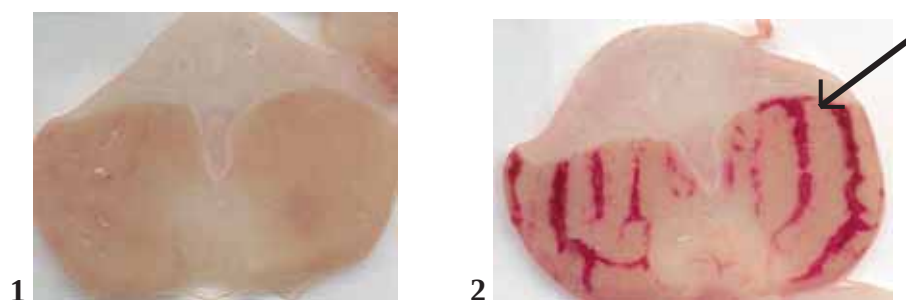


FIGURA 1) Foto de um estômago de rato sem lesão ulcerativa. **FIGURA 2)** Foto de um estômago de rato com lesões ulcerativas, indicadas pela seta.

A humanidade tem convivido com as úlceras pépticas desde tempos remotos. Talvez a primeira descrição dessa doença tenha sido inscrita nos pilares do templo de Esculápio em Epidauros por volta do século IV a.C.: *“um homem com úlcera no estômago. Ele incubou e teve uma visão; o Deus pareceu ordenar a seus seguidores que o capturassem e o mantivessem prisioneiro, que ele poderia operar o seu estômago. Assim, o mesmo fugiu mas foi capturado e amarrado a uma aldraba. Em seguida Esculápio abriu-lhe o*

estômago, retirou a úlcera, costurou-o novamente e soltou suas amarras". Muitas pessoas ilustres sofreram de indigestão e úlceras, inclusive o imperador romano Marco Aurélio, cuja morte foi atribuída por alguns à uma úlcera perfurada e cujo médico era o próprio Galeano. A neutralização ácida foi reconhecida como um tratamento eficaz há mais de doze séculos por Paulus Aeginata, o qual prescreveu uma mistura de solos de Samos, Lemnos e leite, não diferente dos esquemas terapêuticos com leite e antiácidos usados em meados do século XX.

O parágrafo acima retirado de HOOGERWERF & PASRICHA em "Goodman & Gilman`s – The pharmacological basis of the therapeutic" (2005), citando SMITH & RIVERS (1953), mostra o longo histórico das úlceras pépticas e sua importância na história da humanidade. Os mesmos autores chamam a atenção para os enormes avanços no conhecimento da patogênese e no tratamento dos quadros clínicos de úlceras pépticas, desde então. Entretanto a descoberta da *Helicobacter pylori* (TYTGAT & RAUWS, 1986) e dos inibidores protônicos (SIEPLER *et al.*, 1986) são os últimos grandes acontecimentos da patologia e ambos ocorreram no século passado.

Grande parte das pesquisas científicas que envolvem úlceras pépticas direciona-se principalmente para o estudo de *H. pylori* ou aponta esta infecção bacteriana e as DAINEs (Drogas antiinflamatórias não-esteroidais) como os maiores responsáveis pela incidência desta moléstia (WATANABE E CHIBA, 2002). *H. pylori* (**figura 3**) está presente em quase 50% da população mundial e as DAINEs são os fármacos de maior uso; porém, nem todos os indivíduos infectados pela bactéria ou que se utilizam de drogas antiinflamatórias manifestam gastrites ou desenvolvem úlceras pépticas (GO, 1997; BAUER E MARKER-HERMANN, 2003; PEURA, 2004).

Terapias para erradicação da bactéria *Helicobacter pylori*, revolucionaram o curso natural dessa doença. Tratamentos contra essas infecções têm relativo êxito no organismo, sendo erradicado ao redor de 80% dos pacientes. Numerosos estudos sugerem que a taxa de recaída anual - de 80% da úlcera duodenal e 60% para úlcera gástrica - é reduzida a menos de 5% depois do tratamento para erradicação da bactéria (NERVI *et al.*, 2006) e isto é mais efetivo para a cura do que a utilização de drogas antissecretórias (FORD *et al.*, 2004).

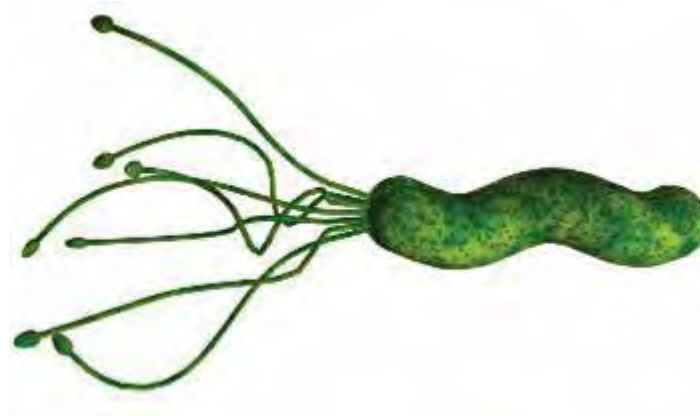


FIGURA 3) Bactéria *Helicobacter pylori*.

Sabe-se que a úlcera péptica é uma doença comum na população em geral, com grande incidência clínica e chance de cura maior que 95% durante o primeiro tratamento. Porém, as chances de reincidência estão entre 65-80%, um ano após a cura, e quase 100% depois de dois anos. O tratamento e cura de recidivas ainda é um sério problema no campo médico, pois causa morbidade e eleva os custos hospitalares. O tratamento e cura das recidivas ainda é um sério problema de saúde pública (SONE *et al.*, 2008). As estimativas de gastos com faltas ao trabalho, hospitalização e cuidados com pacientes, excluindo custos com medicamentos, somam mais de US\$ 5 bilhões por ano nos EUA (WALLACE & DEVCHAND, 2005).

Estudos recentes realizados por LEONG (2009) demonstram que a doença ulcerosa péptica, afeta igualmente tanto populações de países ocidentais como orientais, porém a magnitude do problema é regional e tem se agravado muito com o uso indiscriminado e cada vez mais freqüente das DAINes para diferentes finalidades.

A úlcera duodenal (UD) (**figura 4**) é uma doença que acomete 5-10% da população americana em ao menos uma vez em suas vidas, e esta forma de úlcera é duas a até quatro vezes mais prevalente do que úlcera gástrica (KROMENKO *et al.*, 2009).

Essa doença sempre representou um diagnóstico endoscópico de alta freqüência em qualquer serviço de endoscopia digestiva. O estresse emocional, o consumo de álcool, o uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINes), medicamentos imunossupressores, outras drogas e a

queda dos níveis de prostaglandinas têm mostrado também serem fatores contribuintes no aparecimento da úlcera (YUANG *et al.*, 2006).

Nas duas últimas décadas, importantes mudanças têm ocorrido na epidemiologia da úlcera duodenal (UD) no Brasil (POST, 2006). Observou-se decréscimo gradativo dos percentuais de prevalência da úlcera duodenal, ano após ano, onde em 1996 ocorreram com 8,6% de prevalência e em 2005 reduziu para 3,3% (SAUL, 2007).

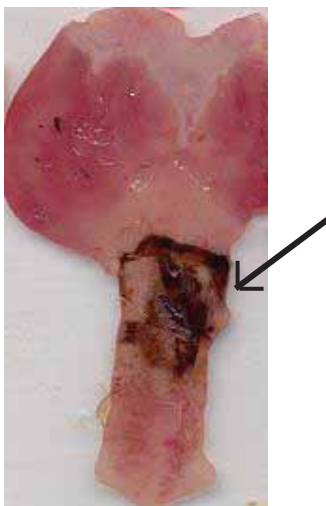


FIGURA 4) Foto de um duodeno de rato com lesão ulcerativa perfurante, indicada pela seta.

SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

Uma das mais importantes funções do estômago é a produção de ácido. O ácido gástrico facilita a digestão de proteínas e a absorção de ferro, cálcio e vitamina B12. Ele também impede a entrada de bactérias no organismo. Quando os mecanismos homeostáticos estão prejudicados o volume e a acidez gástrica pode aumentar desproporcionalmente, superando assim as defesas da mucosa gástrica, levando a formação de úlcera duodenal, úlcera gástrica e doença do refluxo gastro-esofágico (SCHUBERT, 2004).

De acordo com KUTCHAI (1996), o estômago pode ser anatomicamente e funcionalmente dividido em quatro regiões revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo e antro. A mucosa gástrica, por sua vez, é constituída por uma série de depressões e glândulas (WOLFE e SOLL, 1988) (**Figura 5**). Nas depressões estão as células epiteliais superficiais, enquanto que a porção glandular contém as células mucosas cervicais, parietais, pépticas ou principais e algumas endócrinas (DOCKRAY *et al.*, 1996).

A secreção ácida gástrica é produzida pelas células oxínticas, um dos diversos tipos de células presentes nas glândulas gástricas (YAO e FORTE, 2003). Essa secreção é o aspecto mais importante da função gástrica estudada na prática médica. A influência de alterações nessa função tem sido considerada no desenvolvimento de drogas (POHLE e DOMSCHKE, 2003).

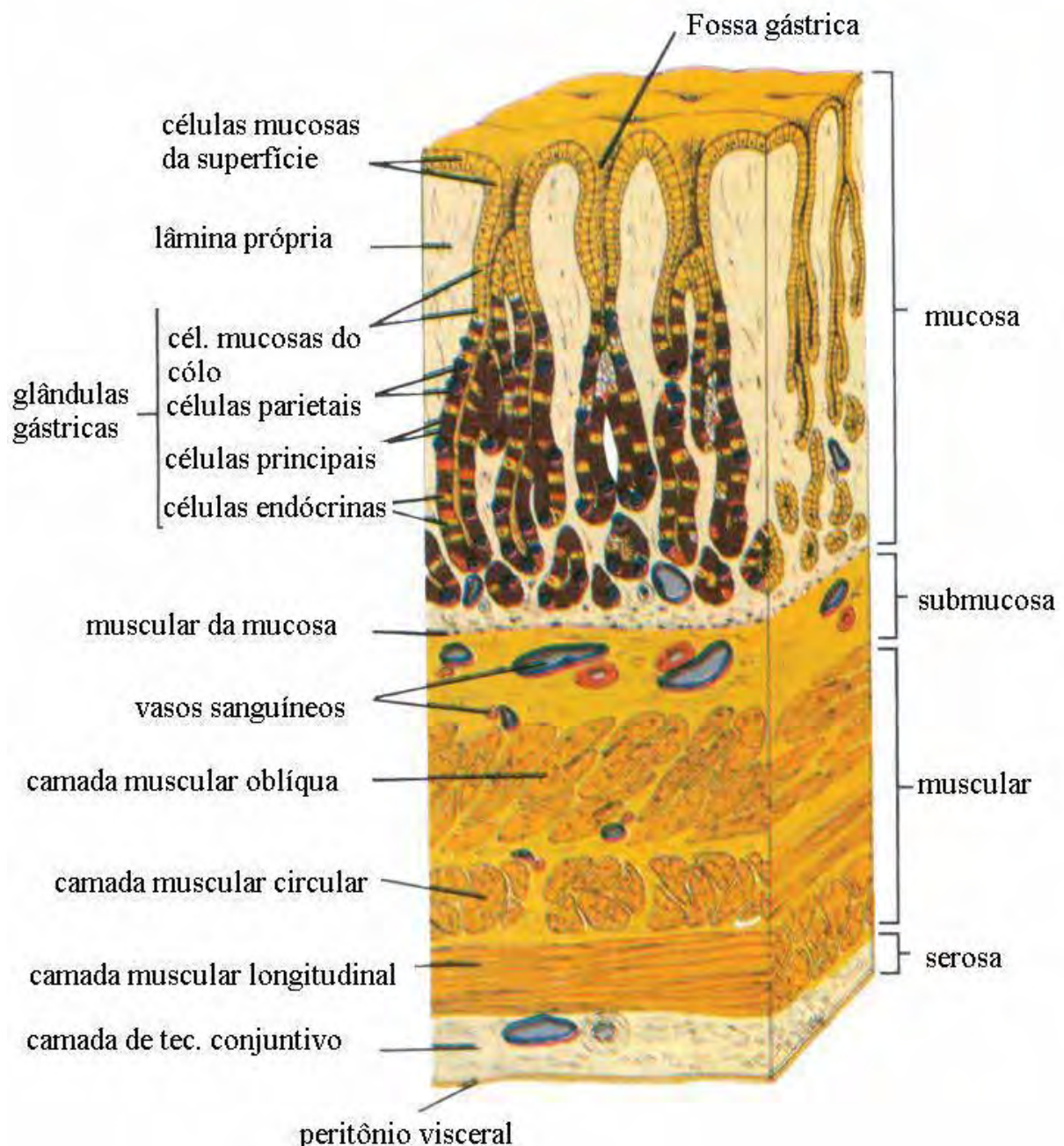


Figura 5) Estruturas da mucosa gástrica (de SCHAUF, 1993 Guanabara Koogan (com modificações))

MECANISMOS PERIFÉRICOS DE REGULAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

ESTIMULANTES

GASTRINA → Gastrina é um hormônio descoberto por J.S. Edkins em 1905 como um secretagogo ácido (MODLIN *et al.*, 1997). Ela é produzida pelas células G e é o principal hormônio estimulante de secreção ácida durante a ingestão de alimentos. A gastrina também regula o crescimento normal de tecido e de células tumorais no TGI (SCHUBERT, 2004).

Este hormônio é liberado em resposta a produtos da digestão tais como aminoácidos; sua inibição é promovida pela somatostatina (produzida pelas células D) quando o pH cai abaixo de 3 no antro. O ácido aplicado diretamente à célula G inibe a secreção de gastrina; já na célula D, o mesmo procedimento estimula a secreção de somatostatina, o que conseqüentemente inibe a liberação de gastrina (ZAVROS *et al.*, 2002).

Os efeitos biológicos da gastrina são encontrados nas células do estômago, pâncreas, vesícula biliar e sistema nervoso central, através de sua ação em dois subtipos de receptores, colecistoquinina A (CCKA) e colecistoquinina B (CCKB) (MANTYH *et al.*, 1994). Parte estrutural da gastrina tem homologia com a colecistoquinina (CCK) no aminoácido 5-terminal formando o local carboxiterminal; este domínio é necessário para a ligação com o receptor e, portanto, responsável por sua atividade biológica. Partes dos receptores CCKA e CCKB têm 48% de homologia e são conservados entre as espécies; no entanto as afinidades pela gastrina e CCK a esses receptores são diferentes. Receptor CCKA tem mais afinidade por CCK8 sulfatado que por gastrina. Já o receptor CCKB/gastrina, no qual se ligam gastrina e CCK8 sulfatada e não sulfatada, tem igual afinidade. A gastrina é, portanto, capaz de estimular células parietais através de receptor de gastrina (CCK) ou indiretamente pela ativação de células ECL (células enterocromafins like) para liberação de histamina (WANK *et al.*, 1992).

HISTAMINA → A histamina é principalmente estocada em células do tipo enterocromafim que residem na parte basal das glândulas oxínticas do estômago. Os receptores de histamina têm sido classificados em quatro

grandes subclasses: H₁, H₂, H₃ e H₄. O hormônio antral gastrina e o mediador neuronal simpático Peptídeo Ativador de Adenilato Ciclase Pituitário (PACAP) estimulam a síntese de histamina, armazenamento e secreção pelas células do tipo enterocromafins (ECL). A histamina liberada se difunde para as células parietais vizinhas e estimula a secreção ácida pela interação com os receptores H₂ expressos na superfície da célula parietal (PRINZ *et al.*, 2003).

ACETILCOLINA → A acetilcolina, liberada do sistema nervoso entérico, estimula diretamente a secreção de ácido através da ativação dos receptores M₃ nas células parietais, mediado pelo segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclica (AMPc). A acetilcolina também pode aumentar a secreção ácida gástrica de maneira indireta, através da estimulação de células ECL secretoras de histamina. Receptores do tipo M₁ presentes nas células ECL quando bloqueados por antagonistas específicos M₁ inibem a liberação de histamina, reduzindo a secreção ácida gástrica (YAMAJI *et al.*, 2007).

INIBIDORES DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

SOMATOSTATINA → O principal efeito fisiológico da somatostatina no sistema digestivo é a inibição da secreção ácida gástrica. A somatostatina pode inibir o peristaltismo do estômago, intestino, vesícula biliar e proliferação de células da mucosa; reduzir o fluxo sanguíneo no TGI, absorção de água, eletrólito, glicose, aminoácido e triglicerídeo no intestino delgado; também deprime a secreção de ácido gástrico, pepsina, bile hepática e gastrina, além de outros hormônios gastrointestinais (SUN *et al.*, 2002). O efeito inibitório da somatostatina é devido mais ao bloqueio da liberação de histamina do que à inibição direta da célula parietal (KOMASAKA *et al.*, 2002).

AMILINA → A amilina tem a mesma localização que a somatostatina em células endócrinas do fundo gástrico. Em estômagos de ratos e camundongos, a amilina, liberada de células D contendo somatostatina, interage com receptores distintos de amilina para aumentar a secreção de

somatostatina por uma via autócrina que leva a inibição de histamina e da secreção ácida (SCHUBERT, 2004).

PROSTAGLANDINAS → As prostaglandinas (PGs) exercem efeitos inibitórios sobre a célula parietal, e a inibição da sua síntese pode resultar em um aumento da secreção ácida gástrica (WALLACE, 2001). As PGs unem-se ao receptor de PGE₂ na célula parietal e ativam uma proteína G inibitória (Gi), que inibe a enzima adenilato ciclase. As PGs endógenas modulam a secreção ácida pelo bloqueio do aumento de AMPc estimulado por histamina dentro da célula parietal (ATAY *et al.*, 2000).

MECANISMOS CENTRAIS DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

O Sistema Nervoso Central (SNC) regula a atividade parassimpática no plexo mioentérico da parede gástrica. A regulação é realizada por modulação da atividade dos núcleos do hipotálamo através de peptídeos e transmissores químicos. A modificação da atividade vagal afeta a secreção ácida por meio de alterações nas complexas redes dos sistemas reflexos aferentes e eferentes (TACHE *et al.*, 1990).

O complexo dorsal vagal tem um importante papel na regulação da integridade da mucosa gástrica, envolvendo proteção da mucosa e formação de úlcera. O neurônio aferente tem função semelhante ao eferente no trato gastrointestinal; neuropeptídeos liberados a partir de terminações nervosas periféricas de neurônios aferentes primários podem induzir proteção da mucosa gástrica (GYIRES, 2004).

Entretanto os mecanismos sensoriais não participam somente da secreção, mas também da absorção de alimento, motilidade, defesa do tecido e perfusão vascular. Além disso, a fase cefálica da secreção ácida gástrica é induzida pelos sinais sensoriais do pensamento, visão, olfato, sabor e deglutição do alimento e isto é abolido pela vagotomia e pode contribuir em mais de 50% de toda a produção ácida em resposta ao alimento (SCHUBERT, 2004).

MECANISMO DE AÇÃO GERAL DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

A $H^+/K^+/ATPase$ (a bomba protônica) é a enzima responsável pela secreção ácida gástrica. A subunidade α é a responsável pela troca de H^+ por K^+ com gasto energético fornecido pela catalisação do ATP. Nas células parietais em repouso, a bomba de $H^+/K^+/ATPase$ é armazenada em tubulovesículas citoplasmáticas. Quando os receptores das células parietais são estimulados por seus agonistas, são gerados segundos mensageiros, que através de cascatas de fosforilação permitirão com que as tubulovesículas contendo as enzimas se fundam com a membrana apical, permitindo com que a enzima transmembrânica se torna ativa. Na ausência do estímulo, as bombas são recicladas de volta para o compartimento citoplasmático. Inibidores das bombas de próton são pró-drogas que sofrem catalisação ácida com um rearranjo químico nos canalículos secretórios, permitindo, assim, a inibição da $H^+/K^+/ATPase$ através da ligação covalente a resíduos de cisteína na subunidade α (SCHUBERT, 2004).

Portanto, a secreção ácida gástrica é um processo contínuo e complexo (**Figura 6**), controlado por múltiplos fatores tanto centrais (neuronaís), quanto periféricos (endócrino e parácrino). Cada fator se refere a um evento fisiológico final comum – a secreção de H^+ pelas células parietais, as quais estão localizadas no corpo e no fundo gástrico. Os fatores neuronaís (acetilcolina – Ach), parácrinos (histamina) e endócrinos (gastrina) desempenham papéis importantes na regulação da secreção gástrica, como já vimos anteriormente. Seus respectivos receptores específicos (M_3 , H_2 e CCK_2) foram identificados anatômica e farmacologicamente na membrana basolateral da célula parietal. Existem duas vias principais de sinalização na célula parietal: via dependente do AMPc e a via dependente do Ca^{+2} . Enquanto histamina utiliza a primeira via, a gastrina e a Ach exercem seus efeitos por meio da última. A via dependente de AMPc resulta na fosforilação das proteínas efectoras da célula parietal e a via dependente do Ca^{+2} leva à um aumento de Ca^{+2} citosólico. Ambas as vias ativam a $H^+/K^+/ATPase$ (bomba protônica). Essa bomba produz o maior gradiente iônico conhecido nos vertebrados, com um pH intracelular de cerca de 7,3 e um pH intracanalicular de mais ou menos 0,8 (HOOGERWERF & PASRICHA, 2005).

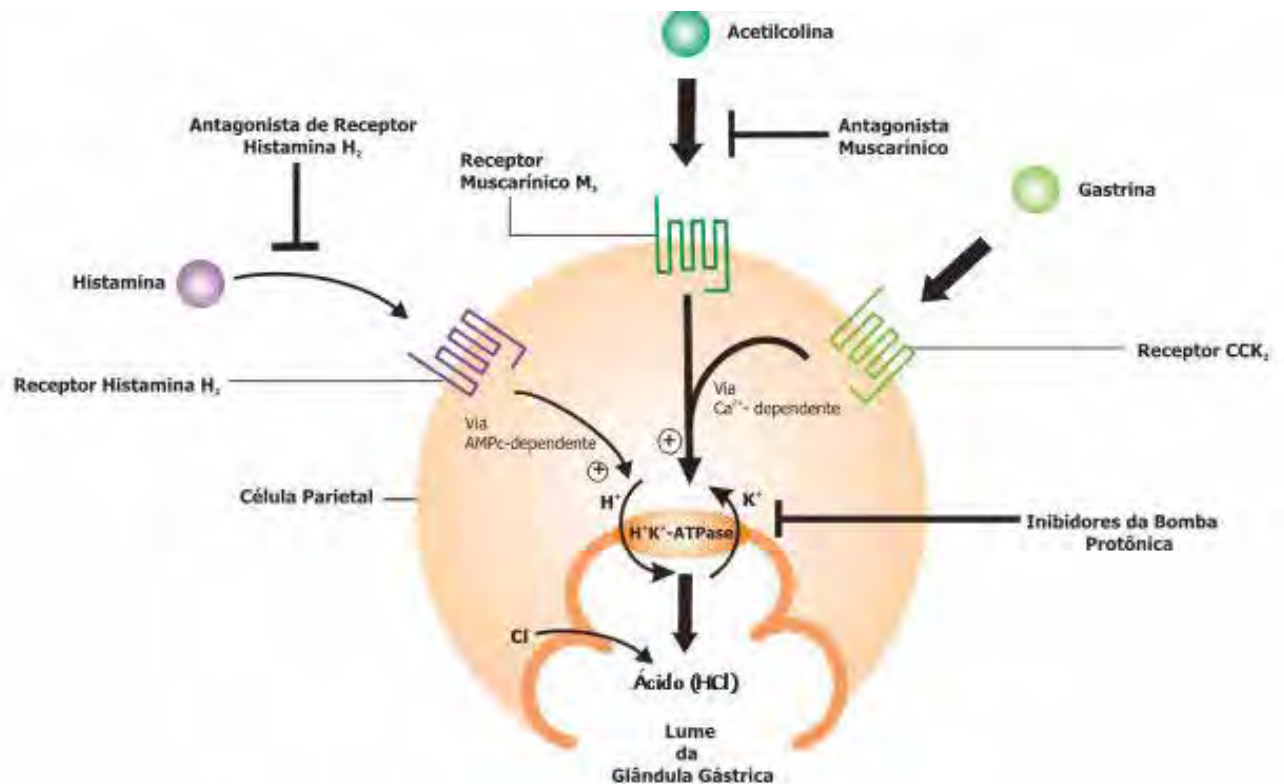


Figura 6) Representação esquemática da secreção ácida gástrica. Adaptado de OLBE *et al.*, 2003.

IMPORTANTES FATORES PROTETORES DA MUCOSA GÁSTRICA

A mucosa gástrica mantém sua integridade estrutural e funcional apesar de estar constantemente exposta a fatores nocivos como HCl e pepsina, os quais são capazes de digerir tecido. Sob condições normais, a integridade da mucosa é mantida pelos mecanismos de defesa, os quais incluem fatores pré-epiteliais, uma barreira epitelial (superfície das células epiteliais justapostas secretando muco, gerando bicarbonato, peptídeos e prostaglandinas), renovação contínua de células, fluxo sanguíneo contínuo através de microvasos da mucosa, além de barreira endotelial, geração de PGs e Óxido Nítrico (NO), além de mecanismos antioxidantes (LAINE *et al.*, 2008).

MUCO E BICARBONATO → A mucosa gástrica produz fatores de digestão como ácido gástrico e enzimas proteolíticas. Para manter a integridade da mucosa, um sistema de defesa efetivo é necessário. A primeira linha de

defesa contra o ácido é a barreira do muco que vem sendo investigada por vários grupos de estudo (PHILLIPSON *et al.*, 2002).

O muco é um fator significativamente importante para a mucosa gástrica, o qual se apresenta de forma viscosa, elástica, aderente, como um gel transparente, que contém 95% de água e 5% de glicoproteína, recobrindo toda a superfície da mucosa gastrointestinal. O muco é capaz de agir como antioxidante e reduzir danos da mucosa promovidos por radicais livres (REPETTO *et al.*, 2002). Quando células contendo muco são danificadas por radicais de oxigênio extracelular, o muco intracelular é liberado no tecido gástrico prevenindo danos por varredura (SENO *et al.*, 1995), protegendo a mucosa gástrica, devido às glicoproteínas, sendo os açúcares potentes seqüestradores de EROs ou espécies reativas de oxigênio (MOJZIS *et al.*, 2000).

O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco gástrico o qual adere na superfície da mucosa. Esse muco aderido, juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio, serve como uma barreira contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (ALLEN E FLEMSTROM, 2005). Num estômago humano saudável, o muco forma uma cobertura contínua de gel na mucosa gástrica de mais ou menos 0,1-0,2 mm de espessura, cuja manutenção se dá por equilíbrio dinâmico entre sua produção e secreção pelas células epiteliais e sua erosão na porção em contato com o lúmen (JORDAN *et al.*, 1998).

A secreção do muco gástrico é controlada por vários fatores em diferentes vias. Prostaglandinas (PGE_2) e secretina, as quais são inibidoras da secreção ácida, estimulam a secreção de muco (TANI *et al.*, 1997). O aumento da secreção de HCO_3 é regulado pelas PGE_2 através da interação com receptores específicos (TAKEUCHI *et al.*, 2006).

ÓXIDO NÍTRICO (NO) → O óxido nítrico (NO) é reconhecido como um mediador fundamental nos mecanismos de defesa gástrica, devido a sua habilidade de aumentar o fluxo sangüíneo da mucosa gástrica e a produção de muco e de inibir a aderência de neutrófilos às células endoteliais (CORUZZI *et al.*, 2000).

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

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

O NO é sintetizado pela NO sintase (NOS) a partir de oxigênio (O₂) e L-arginina. Existem três isoformas conhecidas da NOS: uma forma induzida (ou inflamatória) - iNOS (expressa em macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasores) e duas dita constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio (eNOS) e nos neurônios (nNOS) (CHO, 2001; UCHIDA *et al.*, 2001).

Estímulos apropriados, tais como respostas inflamatórias como por exemplo a presença de úlcera gástrica, aumentam a atividade da iNOS (KRISTJANSSON *et al.*, 2005). O bloqueio do NO aumenta o estresse oxidativo, ativando mastócitos, que são células encontradas em grandes quantidades no trato gastrointestinal, e que liberam mediadores como histamina e fator ativador de plaquetas, causando aumento da permeabilidade epitelial (KANWAR *et al.*, 1994).

PROSTAGLANDINAS → As prostaglandinas (PGs) mantêm a integridade da mucosa gástrica pela inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco e bicarbonato, inibição da ativação de mastócitos, diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular, inibição da apoptose, aumento

ou manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa, assim prevenindo a isquemia (ATAY *et al.*, 2000).

A enzima ciclooxygenase (COX) converte o ácido araquidônico em prostaglandina G_2 pela inserção de duas moléculas de oxigênio e então reduzindo este intermediário a prostaglandina H_2 (PGH_2). A PGH_2 é um metabólito instável que é convertido em outras espécies de prostaglandinas, incluindo prostaglandina E_2 , prostaciclina e tromboxanos (ATAY *et al.*, 2000). Está bem estabelecido que existe pelo menos duas isoformas distintas da COX, denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos (PESKAR, 2001) e esta isoforma provavelmente promove a produção de PG protetora da mucosa gástrica e que possui um papel importante na manutenção da homeostase (RODRÍGUEZ-TÉLLEZ *et al.*, 2001). Ao contrário, a expressão da COX-2 geralmente é baixa sob condições basais. O aumento da expressão da COX-2 ocorre em certas condições patofisiológicas como a inflamação, dano tecidual e transformação maligna (PESKAR, 2001).

Muitas prostaglandinas (PG) incluindo PGE_2 e PGI_2 previnem a formação da úlcera por um mecanismo adicional a inibição da secreção gástrica, chamado de citoproteção gástrica (TAKEUCHI *et al.*, 2001). A secreção de muco e bicarbonato, a vasodilatação e a rápida regeneração epitelial são alguns dos componentes de defesa da mucosa que são regulados pelas PG (WALLACE & GRANGER, 1996).

GRUPAMENTOS SULFIDRILICOS (SHs) → O papel gastroprotetor dos grupamentos SH endógenos (compostos sulfidrílicos), presentes no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema antioxidante, já foi demonstrado em diversos modelos de indução de úlcera (etanol, DAINES e estresse), nos quais ocorre uma depleção destes compostos (HERNANDEZ-MUNOZ *et al.*, 2000; BAYIR *et al.*, 2006). O pré-tratamento com bloqueadores de grupos SH como o *N-ethylmaleimide* demonstrou potencializar significativamente a indução de úlceras gástricas (HIRAISHI *et al.*, 1994), enquanto que aumentos significativos promovem gastroproteção (SENER-MURATOGLU *et al.*, 2001).

No processo inflamatório, espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas e iniciam uma reação em cadeia que culmina na peroxidação lipídica e morte celular (TARIQ *et al.*, 2006). Os compostos sulfidrila ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou produzidos após exposição a agentes nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (AVILA *et al.*, 1996).

Estes agentes são também importantes na produção (SALIM, 1992) e manutenção do muco gástrico, uma vez que suas subunidades glicoprotéicas são unidas entre si por pontes dissulfeto que, uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel (AVILA *et al.*, 1996).

RADICAIS LIVRES E DEFESA ANTIOXIDANTE → Radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados em sua última camada de valência. A presença deste elétron não pareado altera a reatividade química dos átomos ou moléculas tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares (aqueles com os elétrons pareados) (JÚNIOR, 1998).

Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e atualmente é identificado como fator relaxante do endotélio e um importante vasodilatador (JÚNIOR, 2001). Estes radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados EROs (espécies reativas do oxigênio) e ERNs (espécies reativas do nitrogênio) (BARREIROS *et al.*, 2006).

Um radical livre é capaz de existir independentemente, apresentar uma grande instabilidade, uma meia vida muito curta, reagir rapidamente com diversos compostos e poder atacar alvos celulares (HALLIWELL, 1994).

A geração destas espécies químicas acontece naturalmente nos sistemas vivos, ocorrendo por vias endógenas, tais como; respiração celular, inflamações e transporte de oxigênio pela hemoglobina. As vias exógenas que geram estas espécies são: ozônio, radiação gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro (HALLIWELL *et al.*, 1994, 1995, 1998).

Quando a concentração de radicais livres sobrepõe-se à capacidade antioxidante da célula, ocorre ataque oxidativo a lipídios de membrana, a proteínas estruturais e funcionais, e a ácidos nucleicos. Este ataque é denominado “estresse oxidativo” (McCORD, 2000; ANDREOLI, 2000; ARUOMA, 1996).

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

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta. De acordo com HALLIWELL (2000) *“Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”*.

Obviamente o organismo possui vários sistemas de defesa antioxidante que atuam na detoxificação das espécies reativas de oxigênio de formas diferenciadas. Dentre eles, o sistema enzimático antioxidante parece ser o principal meio de remoção de EROs formadas durante o metabolismo intracelular (ZOPPI *et al.*, 2003).

Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, SOD e catalase (CAT) ou não enzimaticamente, a exemplo da GSH (glutathiona total). Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, onde se destacam os flavonóides e os poliflavonóides (HUSAIN *et al.*, 1987; HALLIWELL, 1995).

FARMACOTERAPÊUTICA DA ÚLCERA PÉPTICA → Por mais de um século, as úlceras pépticas foram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento farmacológico resumia-se em neutralizar a acidez gástrica estomacal com a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio (NaH_2CO_3), carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) e hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ou

associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas de dissolução e absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. Alguns podem também quelar outras drogas presentes no trato gastrointestinal, formando complexos insolúveis que passam pelo TGI sem serem absorvidos. Assim, a supressão farmacológica efetiva e mais segura da secreção ácida gástrica teve início com a introdução dos antagonistas de receptores H_2 de histamina nos anos 70. Estes fármacos inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores H_2 na membrana basolateral das células parietais. Atualmente existem quatro diferentes antagonistas de receptores H_2 , a cimetidina, a ranitidina, a famotidina e a nizatidina e possuem estruturas químicas diferentes que possibilitam variação nas interações com outros fármacos e alteram o perfil dos efeitos colaterais (YUAN *et al*, 2006; BRUNTON *et al*, 2006).

Durante os anos 80, as cirurgias de úlceras pépticas diminuíram cerca de 85%, o que pode ser atribuído ao uso de cimetidina (**figura 7**) e ranitidina. A partir de 1980 foram lançados os fármacos que inibem a bomba H^+/K^+ ATPase (bomba de prótons) omeprazol, lansoprazol (**figura 8**), rabeprazol e pantoprazol esomeprazol considerados, atualmente os fármacos mais eficazes na supressão da secreção de ácido gástrico. O desenvolvimento destes fármacos melhorou a inibição da acidez gástrica, melhorando também a cicatrização das úlceras gástricas e duodenais. Estes inibidores de bomba são pró-fármacos, necessitando ativação em ambiente ácido. Entram na célula parietal a partir do sangue e, devido a sua fraca natureza básica, acumulam-se em canalículos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons que resulta na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+/K^+ ATPase, resultando em uma inativação irreversível da bomba. A secreção do ácido só se reinicia após a inserção de novas moléculas de bomba na membrana luminal. (YUAN *et al*, 2006; BRUNTON *et al*, 2006).

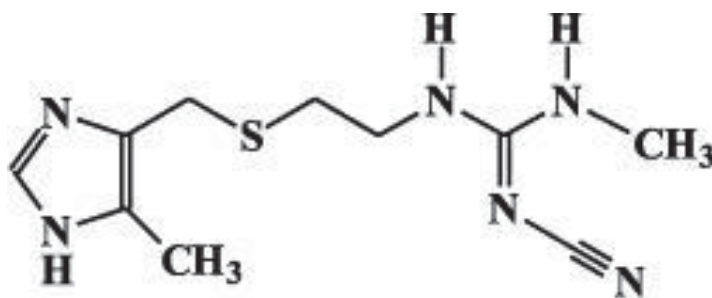


Figura 7) Estrutura química da Cimetidina

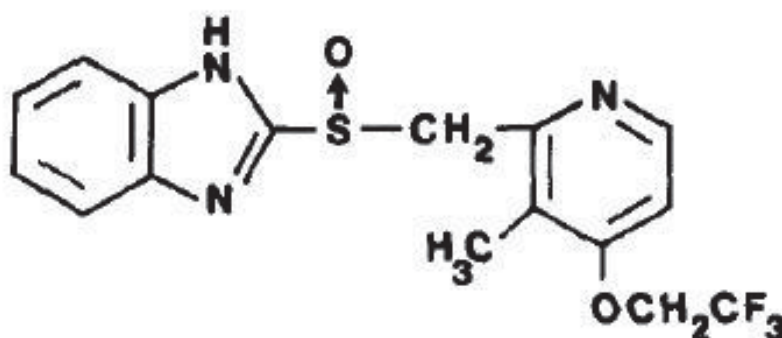


Figura 8) Estrutura química do Lansoprazol

Entretanto, estas duas classes de fármacos, principalmente quando utilizados de forma crônica promovem vários efeitos colaterais, entre eles a hipergastrinemia que pode estar associada ao desenvolvimento do câncer gástrico. Os efeitos colaterais agravados pela utilização prolongada levam ao estudo para o desenvolvimento de alternativas que associem múltiplas ações, reduzindo os mecanismos reflexos compensatórios (YUAN *et al.*, 2006).

Outra droga utilizada experimentalmente no tratamento de úlceras gástricas e duodenais é a carbenoxolona (DOLL *et al.*, 1968). Ela foi sintetizada em 1960 pela Biorex Laboratories e foi a primeira droga usada para o tratamento de úlceras pépticas que possui um mecanismo que não envolve a inibição da secreção ácida no estômago (BARON, 1977). Ela foi descoberta como resultados de estudos com *Glycyrrhiza glabra* –alcaçuz (**figura 9**) comumente usada pelos indígenas no tratamento de úlceras gástricas (AKTAR & MUNIR, 1989).



Figura 9) *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz)

A carbenoxolona (**figura 10**) estimula a produção de muco no estômago, promove a proliferação celular, aumenta a taxa de incorporação de açúcares na mucosa gástrica (glicoproteínas), inibe a esfoliação celular da mucosa, inibe a atividade péptica e, além disso, diminui a atividade das enzimas que degradam a PGE_2 , aumentando o nível de prostaglandinas (citoprotetora da mucosa) no suco gástrico humano (FRANCO *et al.*, 1992).

Ela já foi amplamente usada na Europa para o tratamento de úlceras gástricas. Entretanto, seus efeitos benéficos são acompanhados por graves efeitos colaterais em um número significativo de pacientes. Estudos *in vitro* demonstraram que a Carbenoxolona inibe a enzima Cortisona 5β -redutase e a 11β -hidroxiesteróide desidrogenase responsáveis pela regulação do metabolismo do cortisol e da aldosterona (BAKER, 1994; DZUBAK *et al.*, 2006). Essa inibição aumenta a meia-vida do cortisol, o que leva a um prolongamento de sua atividade biológica. Consequentemente, os pacientes podem desenvolver um quadro de hiper-aldosteronismo, responsável pela

encefalopatia hipertensiva, ganho de peso, edema e hipertensão (LEWIS E HANSON, 1991; FARINA *et al.*, 1998; DZUBAK *et al.*, 2006).

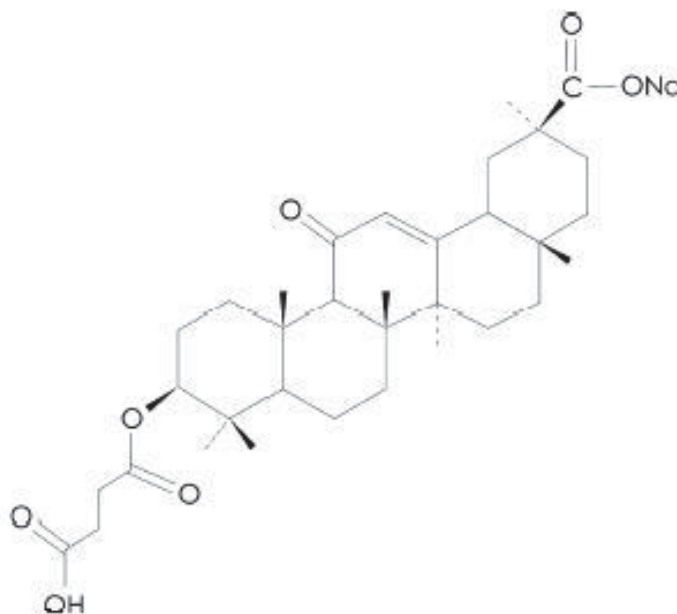


Figura 10) Estrutura química da Carbenoxolona

Para o tratamento de infecções por *H. pylori*, as diretrizes estão mudando progressivamente. Em geral, a erradicação das infecções por *H. pylori* utiliza uma terapia tripla, incluindo um IBP e dois antibióticos (MALFERTHEINER *et al.*, 2006), claritromicina e metronidazol ou claritromicina e amoxicilina, sendo que a opção por um ou pelo outro é devido à resistência a algum desses antibióticos e, assim sendo, a taxa de erradicação da bactéria chega a 97% (GISBERT *et al.*, 2005). A duração do tratamento da terapia tripla é controverso. Na Europa a duração do tratamento é de uma semana, considerando que as diretrizes dos Estados Unidos recomendam 10 dias de terapia (VAKIL, 2006). Muitos estudos mostram ser igualmente efetiva a terapia tripla feita em 7 ou 10 dias (CALVET *et al.*, 2005), e prolongar a terapia com IBP para 2-4 semanas, não melhoraram a taxa curativa das úlceras pépticas (GISBERT *et al.*, 2005).

PRODUTOS NATURAIS ➔ Há uma grande variedade de substâncias químicas isoladas de plantas, mistura de plantas e extratos vegetais cujas atividades terapêuticas foram comprovadas em modelos experimentais de indução de úlcera, indicando, portanto, o importante potencial das plantas e

de seus princípios ativos na descoberta de novas terapêuticas para as úlceras pépticas (SCHMEDA-HIRSCHMANN & YESILADA, 2005; MOTA *et al.*, 2009).

Estes compostos obtidos de plantas com atividade antiulcerogênica apresentam estruturas químicas diversas e distintos mecanismos de ação. Dentre as principais classes de compostos relacionados a essa atividade têm-se os terpenos, triterpenos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, saponinas e polissacarídeos (LEWIS & HANSON, 1991).

O desenvolvimento da química orgânica e de produtos sintéticos para tratamentos farmacológicos deu-se com a Revolução Industrial (RATES, 2001). A fácil aceitação e a preferência pelas drogas sintéticas se devem em partes a acessibilidade, eficácia e segurança desses produtos. Dentre os fatores que definem o emprego popular das plantas nos cuidados com a saúde, está o alto preço dos medicamentos industrializados (RATES, 2001).

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos (DI STASI, 1996). Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento. Por outro lado, as plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (DI STASI, 1996).

Em termos históricos, a pesquisa de plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século XIX (BALUNAS *et al.*, 2005). De acordo com NEWMAM *et al.* (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo, de estruturas de origem natural. Além disso, das drogas descobertas em

estudos com produtos naturais, 25% pertencem ao grupo das plantas superiores (GURIB-FAKIM, 2006).

Substâncias com atividade antiulcerogênica, obtidas a partir de plantas, exercem seus efeitos estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, aumentando a síntese de prostaglandinas e/ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato, ou ainda, inibindo a secreção ácida e atuando como potente antioxidante (BEIL *et al.*, 1995; BORRELLI & IZZO, 2000; LEWIUS & SHAW, 2001).

ÓLEOS ESSENCIAIS E MONOTERPENO β -MIRCENO →

Os óleos essenciais são encontrados em aproximadamente 60 famílias de plantas, mas apenas 150 espécies são exploradas comercialmente para produção de óleo (LAVABRE, 2001; SIMÕES & SPITZER, 2003). Entre as famílias, espécies e nomes comuns citados, as mais conhecidas como fornecedoras de óleos são: ASTERACEAE (*Artemisia canthorata* Vill/ cânfora); APIACEAE (*Foeniculum vulgare* Mill. / funcho); CYPERACEAE (*Cyperus articulata* L. / priprica); LABIATEAE (*Hyptis martiusii* Benth / cidreira-do-mato); LAMIACEAE (*Ocimum basilicum* L. / manjerição); LAURACEAE (*Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer / sassafrás); MYRTACEAE (*Eucalyptus citriodora* Hook / eucaliptus); PIPERACEAE (*Piper aduncum* L. / falso-jaborandi); PUNICACEAE (*Punica granatum* L. / romã); RUTACEAE (*Citrus limon* / limão); ZINGIBERACEAE (*Alpinia zerumbet* / alpínia) e a VERBENACEAE (*Lippia alba* / erva-cidreira) (SIMÕES & SPITZER, 2003).

Na indústria farmacêutica ou na farmacognosia os óleos essenciais são amplamente utilizados em função de suas propriedades farmacológicas, ou seja: antiespasmódicos, cardiovascular, antissecretórios, anestésicos, antiinflamatórios e anti-sépticos (SIMÕES & SPITZER, 2003).

A maioria dos compostos presentes nas plantas faz parte do metabolismo primário. Esses compostos são polissacarídeos, açúcares e proteínas, substâncias essenciais à sobrevivência e desenvolvimento das plantas (VERPOORTE & MEMELINK, 2002). Além desses metabólitos as plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários. Esses compostos, não necessariamente essenciais ao organismo produtor, têm um

papel importante na sobrevivência da planta em seu ecossistema. (SANTOS, 2003).

Os metabólitos secundários encontram-se presentes em concentrações bem menores nas plantas a maioria deles tais como os alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides, flavonóides, quinonas e ligninas têm encontrado aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromas, inseticidas etc. Esses compostos apresentam uma ampla diversidade em estruturas e tamanhos sendo encontrados e distribuídos por todo o reino vegetal (COLLIN, 2001; VERPOORTE & MEMELINK *et al.*, 2002).

Os terpenos são um enorme grupo de produtos naturais, formados a partir do hidrocarboneto isopreno. São classificados de acordo com o número de carbonos, em múltiplos de cinco (C5= isopreno), monoterpenos (C10) (GRAYSON, 2000), sesquiterpenos (C15) (FRAGA, 2005), diterpenos (C20) (HANSON, 2005), sesterpenos (C25) (HANSON, 1996) e triterpenos (C30) (CONNOLLY *et al.*, 2007). Desse modo, já foram identificadas mais de 23000 combinações conhecidas de terpenos (WANG *et al.*, 2005).

A produção de terpenos nas plantas está relacionado a uma funções ecológicas. Eles são encontrados abundantemente em frutas, legumes, e plantas aromáticas e medicinais onde a função importante deles é proteção contra infecções, parasitas e outra condição de stress (BAKALLI *et al.*, 2008), além de serem responsáveis por atrair polinizadores e por poder agir na prevenção contra o ataque de herbívoros em algumas espécies de plantas (CARRO, 1996; MATEO & JIMÉNEZ, 2000; CÂMARA *et al.*, 2004; FLAMINI, 2005)

Constituem uma classe de produtos naturais que podem ser transformados em combinações comercialmente importantes para a produção industrial (MIMOUN, 1996; BAUER *et al.*, 1997; PYBUS, 1999). Os terpenos são extensamente utilizados como aditivos condimentares em comidas e bebidas, em cosméticos como fragrâncias e como intermediários na fabricação de substâncias químicas de perfume. Eles também são empregados como aroma em produtos domésticos (ex: detergentes, sabões e em repelentes de inseto) e como ingredientes ativos em algumas drogas (STICHER, 1977; LEUNG, 1980).

Monoterpenos são combinações naturais de dez carbonos (C10) constituídas de duas moléculas de isopreno (C₅H₈, ou hemiterpeno) que é a base de cinco carbonos de todos os terpenos (STICHER, 1977). Há estudos que relaciona monoterpenos e atividades terapêuticas tais como o câncer por exemplo (CROWELL, 1999). Eles são encontrados em plantas comestíveis, medicinais e aromáticas e são os componentes químicos principais dos seus óleos essenciais (STICHER, 1977; ERICKSON, 1976).

O mirceno, ou β -mirceno, é um composto orgânico natural, proveniente de óleos essenciais de muitas plantas como o capim-limão, e em plantas do gênero *Verbena*. Há muitos estudos em relação a seus efeitos na saúde humana (DELGADO, 1993; DE OLIVEIRA, 1997; FREITAS, 1993), porém seus mecanismos de ação ainda não foram investigados. Ele é classificado como um monoterpeno (C10) poliinsaturado acíclico natural que contém três ligações duplas de carbono-carbono, dois deles sendo conjugados (ERMAN, 1985; LAWRENCE, 1989).

O β -mirceno (**figura 11**) é um dos mais importantes produtos químicos utilizados na indústria de perfumaria. Ele participa da produção comercial de geraniol, nerol e linalol, além de aromas sintéticos (cital, citronelal, hidroxicitronelal, mentol e mircenol). Também pode ser usado como ponto de partida para a síntese de vitaminas A e E (KIRK, 1981; ALMEIDA, 1994; FOCA *et al.*, 2004; GUEVARA DOS SANTOS, 2005).

Este monoterpeno é também facilmente disponível pelas pirólises industriais de β -pineno (um dos componentes principais da aguarrás) (ERMAN, 1985; LAWRENCE, 1989) à temperaturas acima de 773 K (GOLDBLATT, 1950; BURWELL JR, 1952; STAINBACH *et al.*, 1964; YIN *et al.*, 1999; SCHERR *et al.*, 2002).

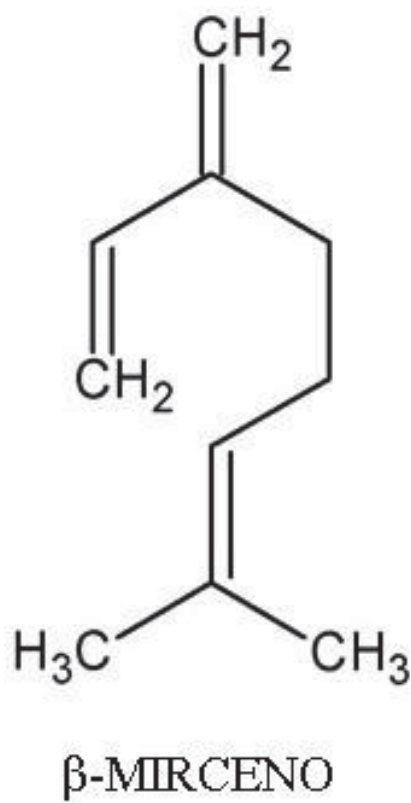


FIGURA 11) Estrutura química do monoterpeneo β -mirceno

JUSTIFICATIVA DA DISSERTAÇÃO

Nosso laboratório tem concentrado esforços para realização de ensaios biológicos que estão relacionados com as úlceras pépticas, fazendo uso de extratos padronizados e frações obtidas à partir de plantas com potencial medicinal, buscando em modelos experimentais, mimetizar as úlceras pépticas (gástricas e duodenais) por meio das frequentes lesões induzidas por etanol, drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs), secreção gástrica ou cicatrização.

Em estudos anteriores neste mesmo laboratório – Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais – foi descoberta a atividade antiulcerogênica (MORAES *et al.*, 2008) de uma espécie medicinal que é o óleo essencial de *Citrus aurantium* (laranja-amarga) (**figura 12**) e de seu constituinte majoritário, o limoneno (90% da constituição) em modelos experimentais de úlceras gástricas induzidas *in vivo* por diferentes agentes. A caracterização fitoquímica desse óleo apontou a presença de outros dois constituintes majoritários em sua composição sendo que o monoterpeno β -mirceno é um deles, com **1,43%** do óleo. A partir destes estudos, observou-se que, tanto o óleo essencial quanto o limoneno (dose de 250 mg/kg), possuem expressivas ações gastroprotetoras sobre a mucosa gástrica de ratos submetidos a fatores lesivos como etanol absoluto e DAINE. Esta ação protetora da mucosa gástrica se deve ao fortalecimento dos fatores protetores tais como a produção elevada de muco, bicarbonato e PGE₂ (prostaglandina E₂) que são ativados pela ação tanto do óleo essencial como do limoneno (MORAES *et al.*, 2009). Outros estudos mais aprofundados com este óleo essencial na dose de 250 mg/kg apontam que além da ação protetora gástrica, esta também possui uma ação cicatrizante em mucosas lesadas que foram submetidos à lesão intragástrica com ácido acético (agente lesivo). Análises morfométricas e imunohistoquímicas de animais submetidos ao tratamento diário com o óleo essencial apontam que a cicatrização do estômago ocorre principalmente por aumento da área de regeneração da mucosa gástrica ativado por fatores de proliferação celular (PCNA) e reestruturação da matriz tecidual (COX-2) que restabeleceram a arquitetura da mucosa gástrica destruída pelo ácido acético (MORAES, 2008).

A curiosidade investigativa nos instigou a avaliar também os demais constituintes do óleo essencial de *C. aurantium*, tais como o β -mirceno, que além de fazer parte da composição do óleo de *C. aurantium*, também possui ação analgésica (LORENZETTI *et al.*, 1991) e sobre o sistema nervoso central (GURGEL DO VALE *et al.*, 2002).



Figura 12) Foto de *Citrus aurantium*



Objetivos

OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Nosso objetivo geral é o de encontrar novas substâncias farmacologicamente ativas com potencial terapêutico para o combate e/ou prevenção das úlceras gástricas e duodenais e oferecer novas opções terapêuticas antiulcerosas que promovam uma melhor eficácia e ausência de efeitos adversos.

Sendo assim, os objetivos específicos deste projeto foram:

- 1) Avaliação da atividade antiulcerogênica do monoterpene β -mirceno em modelos experimentais de úlcera induzida por diferentes agentes em animais;
- 2) Estudar os mecanismos de ação antiulcerogênicos, em modelos experimentais diversos, que caracterizaram os efeitos: gastroprotetor, antioxidante e antissecretor do monoterpene β -mirceno.

Para a construção do artigo (próxima sessão) foram selecionados somente alguns experimentos – com os resultados mais marcantes, no entanto, os resultados que fazem parte do anexo 1 serviram como base para este.



Artigo

(FORMATO FOOD CHEMISTRY)

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIOXIDANTE DO
MONOTERPENO β -MIRCENO EM MODELOS EXPERIMENTAIS
DE ÚLCERA PÉPTICA**

Bonamin, F.; Santos, R.C.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C.A.

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu

RESUMO

O estudo de novos compostos oriundos de plantas medicinais potencializa a descoberta de novas substâncias bioativas utilizadas na terapêutica. A caracterização fitoquímica do óleo essencial de *Citrus aurantium*, uma espécie medicinal que possui fortes indicativos de uso popular para gastrites e distúrbios do trato gastrointestinal (MORAES *et al.*, 2009), apontou a presença do monoterpene β -mirceno (1,43%) como um dos constituintes de sua composição. Em vista disso, foram realizados ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro* com o β -mirceno, a fim de avaliar suas propriedades gastroprotetoras e antioxidantes. Este monoterpene na dose de 7.5 mg/kg, mostrou-se intensamente efetivo em proteger a mucosa gástrica frente a agentes indutores de lesão como o etanol ($p<0,01$), indometacina (DAINE) ($p<0,01$), isquemia-reperfusão ($p<0,01$) e na úlcera duodenal ($p<0,01$). Esta gastroproteção não é mediada pela expressão de PGE_2 na mucosa gástrica, mas o β -mirceno agiu como um surpreendente “varredor” de radicais livres através da ação da glutathione total dos tecidos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Com isso, conclui-se que o β -mirceno apresenta uma potente ação antiulcerogênica e antioxidante em dose muito inferior as demais drogas antiulcerogênicas disponíveis no mercado.

Palavras-chave: β -mirceno; úlcera; monoterpene; antioxidantes

INTRODUÇÃO

A úlcera péptica pode ser definida como um desequilíbrio entre fatores protetores (bicarbonato, muco, prostaglandina, etc.) e fatores agressores (ácido e pepsina) da mucosa gástrica. Outros fatores como *Helicobacter pylori* e antiinflamatórios não esteroidais (AINES) também podem ocasionar úlceras. Aproximadamente 60% das úlceras pépticas estão relacionadas com infecção estomacal por *H. pylori* (BRUNTON *et al.*, 2006).

Outro agente responsável por danificar as células são as espécies reativas de oxigênio (EROs). A geração de EROs é apontada como um dos fatores mais importantes envolvidos no desenvolvimento da úlcera gástrica, sendo induzida por diversos fatores, como: etanol, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, estresse e isquemia e reperfusão (DE LA LASTRA *et al.*, 1997; EL-ABHAR *et al.*, 2003; KWIECIEŃ *et al.*, 2002).

Uma alternativa para impedir esses processos oxidativos pode ser por meio da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (ALLEN E HAMILTON, 1983).

Estima-se que 50% do total dos fármacos mundialmente utilizadas na clínica são derivados de produtos naturais (GURIB-FAKIM, 2006), sendo que substâncias com atividade antiulcerogênica, obtidas a partir de plantas, exercem seus efeitos estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, pelo aumento da síntese de prostaglandinas e/ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato. Além disso, algumas dessas substâncias agem inibindo a secreção ácida e atuam como potente antioxidante (BEIL *et al.*, 1995; BORRELLI & IZZO, 2000; LEWIUS & SHAW, 2001).

Os terpenos são substâncias extensamente utilizadas como aditivos condimentares em alimentos e bebidas, em cosméticos como fragrâncias e como intermediários na fabricação de substâncias químicas que compõem os perfumes. Além disso, são também empregados como aroma em produtos domésticos (ex: detergentes, sabões e em repelentes de inseto) e como ingredientes ativos em algumas drogas (STICHER, 1977; LEUNG, 1980). Eles são um enorme grupo de produtos naturais, formados a partir do hidrocarboneto isopreno (WANG *et al.*, 2005).

Estudos relacionam os monoterpenos e as suas potenciais atividades terapêuticas tais como na prevenção da cura do câncer, por exemplo (CROWELL, 1999). Eles são encontrados em plantas comestíveis, medicinais e aromáticas e são os componentes químicos principais dos seus óleos essenciais (STICHER, 1977; ERICKSON, 1976).

O Mirceno, ou β -mirceno, é um composto orgânico natural, proveniente de óleos essenciais de muitas plantas como o capim-limão e em plantas do gênero *Verbena*. Há muitos estudos em relação a seus efeitos na saúde humana (DELGADO, 1993; DE OLIVEIRA, 1997; FREITAS, 1993), porém seus mecanismos de ação ainda não foram investigados. Ele é classificado como um monoterpeno (C10) poliinsaturado acíclico natural que contém três ligações duplas de carbono-carbono, dois deles sendo conjugados (ERMAN, 1985; LAWRENCE, 1989).

Frente a isso, os objetivos deste estudo foram a avaliação da atividade gastroprotetora e também a avaliação da atividade antioxidante do monoterpeno β -mirceno em modelos experimentais de úlceras pépticas.

MATERIAL E MÉTODOS

β - MIRCENO

O β -mirceno foi adquirido pelo laboratório Acros Organics, U.S.A.

Para a realização de todos os modelos experimentais, foi realizada previamente uma curva dose-resposta, no intuito de caracterizar a melhor dose-efetiva deste composto para esta atividade antiulcerogênica. As doses do β -mirceno utilizadas foram de 3,75 mg/kg, 7,5 mg/kg e 11,25 mg/kg que obedeceram à relação de proporcionalidade presente no óleo essencial de *Citrus aurantium* já avaliada pelo nosso grupo de pesquisa. Para tanto, a dose escolhida foi a de 7,5 mg/Kg para todos os experimentos.

ANIMAIS

Para os experimentos de indução de lesões gástricas experimentais, foram utilizados ratos machos linhagem Wistar (150 a 200g) provenientes do Biotério Central da UNESP - Botucatu, aclimatados às condições do biotério

setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP, Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] destrusada e água *ad libitum*. A morte dos animais foi realizada em câmara de CO₂. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais n°17, 18, 19, 20, 21 e 22/04-CEEA e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

LESÕES ULCEROSAS

Nos testes de atividade antiulcerogênica do monoterpene β -mirceno, as drogas-padrão cimetidina, carbenoxolona ou lansoprazol foram usadas como controles positivos e indicadas em cada modelo de lesão gástrica, sempre administradas por via oral, em dose-volume de 10 ml/kg. Foi utilizado ainda um grupo controle (negativo) que recebeu um volume equivalente de uma solução salina 0.9% ou Tween 80[®] a 8% na qual foi solubilizado o óleo ou as drogas-padrão. Para ensaio *in vitro* a concentração de Tween 80[®] foi reduzida para 2% para evitar interferentes.

Ratos ou camundongos foram mantidos em gaiola especial sem maravalha e submetidos a jejum de no mínimo 12 horas, dependendo do modelo. Para a quantificação das lesões gástricas, os estômagos foram colocados em placa de vidro, as quais foram escaneadas para realização da quantificação, através do aplicativo AVSoft[®] (mm²). A análise da lesão duodenal foi realizada através de SCORE (descrito detalhadamente no modelo experimental).

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA GERAL

ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL

Os ratos foram tratados, após 12 h de jejum, com o monoterpene β -mirceno na dose de 7,5 mg/Kg, com 100 mg/kg de cimetidina ou veículo (controle negativo – Tween 80[®] a 8%), uma hora antes da indução das lesões gástricas pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto

(MORIMOTO *et al.*, 1991). Após 1 h da indução, os animais foram mortos e os estômagos retirados para contagem e classificação das lesões, como descrito anteriormente.

INDUÇÃO DE LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS

Foi adotado o modelo descrito por GUIDOBONO (1997). Ratos foram aleatoriamente separados em grupos (n=7), privados de comida por 24h, com água *ad libitum*. Após 30 min. decorridos da administração oral de Tween 80® a 8% (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (como controle positivo), β -mirceno (7,5 mg/kg), o agente lesivo indometacina (50 mg/kg solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5% - ALLEN & HAMILTON, 2000) foi administrado oralmente para todos os grupos. Após 6 horas da administração do agente lesivo (indometacina), todos os animais foram mortos e os estômagos retirados para leitura das lesões gástricas. Tiras do estômago foram retiradas e pesadas para posteriores procedimentos bioquímicas. Para este modelo, utilizou-se também um grupo denominado SHAM, que foi submetido ao mesmo estresse dos demais grupos, sem a utilização de agentes indutores de lesão.

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROSTAGLANDINA (PGE₂).

Com a finalidade de se observar a produção deste composto nos animais tratados com o β -mirceno, foi realizado um ensaio para a quantificação de PGE₂ com base no método descrito por CURTIS *et al.*, (1995). Grupos de ratos (n=6) foram divididos aleatoriamente nos grupos veículo, veículo + indometacina, β -mirceno, β -mirceno + indometacina. Após os procedimentos, os animais foram mortos e tiveram os estômagos retirados, as mucosas raspadas e os órgãos foram picotados e suspensos em 1 mL de tampão fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,4. A solução obtida foi incubada a 37°C por 20 minutos. A PGE₂ no tampão foi mensurada com um “kit” de dosagem imunoenzimático (RPN222-Amersham) e a leitura realizada em leitor de ELISA Biossistem a 480 nm.

ÚLCERAS PÉPTICAS INDUZIDAS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Os ratos foram divididos em diferentes grupos tratados somente com veículo, Lansoprazol (30 mg/Kg) e o monoterpene β -mirceno na dose de 7,5 mg/Kg. Em seguida, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (via intramuscular) e permanecidos sedados durante todo o procedimento (UEDA *et al.*, 1989). Foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm, do lado esquerdo do abdômen onde a aorta e a veia cava são primeiramente identificadas para facilitar a localização da artéria celiaca. Após a identificação, a artéria celiaca foi isolada, submetida a um processo de limpeza e eliminação de aderências e eventual tecido adiposo. Um *clamp* microvascular foi colocado nessa artéria e permaneceu clampado durante 30 min. Após este período de isquemia, o *clamp* foi removido (para permitir a reperfusão) permanecendo assim os 60 min. subsequentes. No final desse período, os animais foram mortos e uma porção do tecido gástrico de cada rato foi removida para exame das lesões como descrito anteriormente e o tecido foi armazenado para a caracterização enzimática descritas.

ÚLCERAS DUODENAIS INDUZIDAS POR CISTEAMINA

A úlcera duodenal em ratos foi induzida por administração oral de cisteamina hidrocloreídrica (300 mg/Kg de peso corporal) em 19% de solução aquosa em intervalos de 4 horas, num total de 2 administrações (dose final de cisteamina: 600 mg/kg) (SZABO, 1987). Os ratos, após jejum de 2 horas, foram pré-tratados com lansoprazol (30 mg/kg – controle positivo), com o veículo tween 80® a 8% (como controle negativo) e o monoterpene β -mirceno (7,5 mg/kg) trinta min. antes da primeira administração de cisteamina. Decorridas 24h do início do jejum, os animais foram mortos, os duodenos foram retirados e abertos para classificação e análise da lesão. Tiras do duodeno foram retiradas, pesadas e armazenadas para posteriores procedimentos bioquímicos (glutathione total - GSH e MPO). Para este modelo, utilizou-se também um grupo denominado SHAM, que foi submetido ao mesmo estresse dos demais grupos, sem a utilização de agentes indutores de lesão duodenal.

DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL - GSH

As tiras retiradas nos procedimentos experimentais mencionados anteriormente, foram pesadas e armazenadas em 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (TCA). O conteúdo de glutathiona total do estômago foi determinado utilizando a substância 5,5'ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) (ANDERSON *et al.*, 1985). A reação enzimática é constituída de 200 µl da amostra contendo 2mg/ml de proteína, 0,2 M de tampão fosfato pH 8,0; 0,5mM DTNB (2mg em 10ml de citrato de sódio 1%) em um volume final de 2mL. A absorvância foi determinada em 412 nm utilizando um espectrofotômetro. A concentração de glutathiona total foi expressa utilizando o coeficiente de extinção de 13,6 mM.

DETERMINAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE – MPO

Tiras armazenadas dos modelos experimentais descritos anteriormente foram pesadas e congeladas à -80°C até o momento da utilização. Foi utilizado o tampão de reação HTAB (a 0,5% em tampão fosfato sódico 50 mM, pH 6,0) que atua como detergente lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a enzima, que então foi liberada. A atividade enzimática foi determinada seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação, sendo que 1 unidade de MPO determinada é capaz de degradar 1 nmol/minuto de água oxigenada a 25°C (KRAWISZ *et al.*, 1984). A atividade da MPO é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa. A absorvância foi determinada em 450 nm utilizando um espectrofotômetro.

INIBIÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO) INDUZIDA POR SULFATO FERROSO E ÁCIDO ASCÓRBICO

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo método descrito por STOCKS *et al.*, (1974). A metodologia se baseia na determinação colorimétrica da formação de malonildialdeído (MDA) após a peroxidação lipídica induzida por sulfato ferroso e ácido ascórbico em membranas

lipídicas de encéfalo de rato. A peroxidação lipídica é classicamente determinada pela reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico. A atividade antioxidante do β -mirceno foi determinada utilizando-se uma curva de diluição. A medição da atividade antioxidante do calculo da IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da peroxidação lipídica).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelos testes de Dunnet em experimentos com mais de dois grupos de tratamento. Para modelos nos quais foi empregada classificação por score, foi utilizado teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn. A análise estatística dos resultados considerou como nível de significância mínima de $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mucosa gástrica está sujeita a contínuas mudanças de agentes agressores endógenos e exógenos. Para combater esse ataque, a mucosa possui mecanismos de defesa interativa que protegem o tecido de danos e eventuais ulcerações (WHITTLE, 2003).

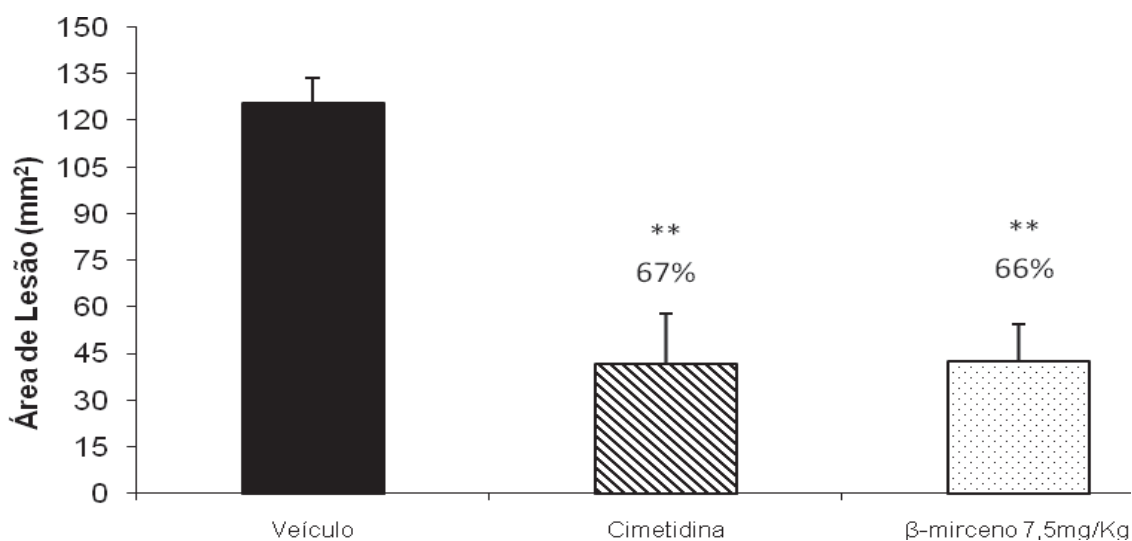
O álcool possui um papel muito importante nas doenças do trato gastrointestinal. A lesão da mucosa gástrica ocorre devido a uma diminuição de função da barreira de muco, a principal proteção contra o ácido gástrico. Altas concentrações de etanol levam a um aumento da permeabilidade epitelial, como consequência de mudanças da diferença de potencial celular que é causado pela re-difusão de íons H⁺ através da mucosa lesada, e danos da mucosa principalmente devido aos distúrbios vasculares e diminuição do fluxo sangüíneo local (SIEGMUND *et al.*, 2003). O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e diminuição dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (REPETTO & LLESUY, 2002).

O “estresse oxidativo” é um termo dado quando a concentração de radicais livres sobrepõe-se à capacidade antioxidante da célula, ocorre ataque oxidativo a lipídios de membrana, a proteínas estruturais e

funcionais, e a ácidos nucléicos. (ARUOMA, 1995; MCCORD, 2000; ANDREOLI, 2000).

Na **Figura 1** estão demonstrados valores de % de inibição das lesões gástricas dos animais tratados com o monoterpeno β -mirceno frente a lesões gástricas induzidas por um agente lesivo de máxima severidade que é o etanol absoluto administrado na mucosa gástrica de ratos. A partir desses resultados, é inegável a intensa ação protetora da mucosa gástrica que este monoterpeno exerce. Esse resultado é muito promissor, pois com uma dose consideravelmente baixa (7,5 mg/Kg), foi possível constatar uma proteção gástrica de 66% ($p<0,01$) quando comparado com a droga-padrão cimetidina (67% - $p<0,01$) e o veículo.

Figura 1) Atividade antiulcerogênica do β -mirceno no modelo de indução de úlcera por etanol em ratos



Efeito gastroprotetor do monoterpeno β -mirceno no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, ** $p<0.01$, comparados ao veículo (Tween 80® a 8%).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados em sua última camada de valência. A presença deste

elétron não pareado altera a reatividade química dos átomos ou moléculas tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares (aqueles com os elétrons pareados) (JÚNIOR, 1998). Eles são capazes de existir independentemente, apresentar uma grande instabilidade, uma meia vida muito curta, reagir rapidamente com diversos compostos e poder atacar alvos celulares (HALLIWELL, 1994).

Dentre as principais fontes endógenas geradoras de espécies reativas de oxigênio estão as mitocôndrias e a atividade de algumas enzimas como: xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminooxidases, enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas e tromboxanos, e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos, as quais produzem uma grande quantidade de EROs (espécies reativas de oxigênio) em resposta ao estímulo fagocitário (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1991).

No entanto, os processos oxidativos podem ser evitados por meio da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento dessas reações oxidativas (ALLEN E HAMILTON, 1983).

A glutathione esta presente no organismo em suas formas; reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER & ANDERSON, 1983). Ela é um marcador da saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante. Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações, da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em animais. É um consenso, atualmente, que o efeito lesivo promovido pelo etanol sobre a mucosa gástrica é consequência do aumento da peroxidação lipídica e diminuição do nível de glutathione (RODRIGUEZ, 2007).

O GSH atua como um varredor de radicais livres e substâncias tóxicas ingeridas com a comida ou produzidas diretamente no Trato gastrointestinal (SHIRIN *et al.*, 2001). Sob condições de estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas pelo GSH com a concomitante formação de glutathione oxidada, GSSG. Além da sua ação como um antioxidante

químico, o GSH também atua na primeira linha de defesa antioxidante como um cofator da glutathiona peroxidase na redução de peróxidos, também resultando na formação de GSSG. Em circunstâncias fisiológicas normais, o GSSG é reduzido a GSH pela glutathiona redutase às custas de NADPH (**Figura 2**) (CNUBBEN *et al.*, 2001).

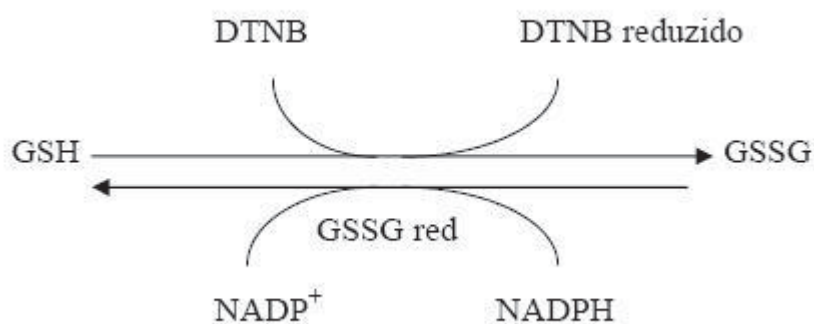
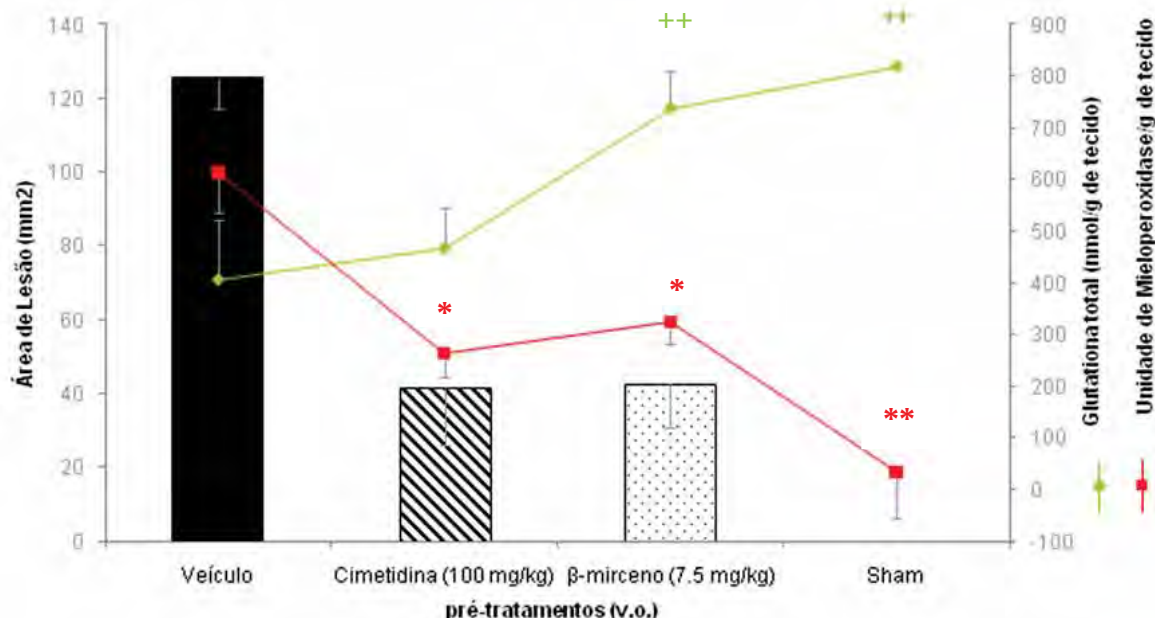


Figura 2: Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutathiona total nas amostras de estômago

Ao quantificar os níveis de glutathiona total no tecido dos animais tratados com o β -mirceno, a cimetidina (antagonista de receptor H₂) e com o veículo (Tween 80® a 8%) no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto (**figura 3**), verificou-se que os níveis de glutathiona total (apresentados pela linha verde no gráfico) apresentaram-se elevados na presença do monoterpeno em comparação aos níveis encontrados tanto no grupo controle negativo (veículo) quanto no controle positivo (neste também se mantiveram altos os níveis de glutathiona total). Este resultado demonstra que o β -mirceno aciona esta via para proteger a mucosa gástrica contra os danos causados pelo etanol, enfatizando a relação dose-efeito deste monoterpeno em relação à cimetidina, sendo esta última 13 vezes maior do que a droga teste.

Figura 3) Efeito do β -mirceno nos níveis de glutatona total e de mieloperoxidase no modelo de etanol



As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média. (++) Para glutatona total ($p < 0,01$); (*) para MPO ($p < 0,05$) e (**) para MPO ($p < 0,01$) em reação ao veículo.

A mieloperoxidase (MPO) é descrita como marcadora da infiltração/agregação de neutrófilos e está elevada em lesões ulcerogênicas (GUHA *et al.*, 2009) sendo um marcador sensível e específico da inflamação aguda e reflete infiltração celular no tecido (DENGIZ *et al.*, 2007).

Ao proceder com a quantificação de mieloperoxidase (MPO) verificou-se que a prévia administração de β -mirceno foi capaz de inibir a formação das lesões, mantendo baixos os níveis de MPO ($p < 0,05$). O mesmo resultado pode ser observado para os animais tratados com lansoprazol, indicando que MPO participa da proteção da mucosa gástrica, tanto do monoterpeno quanto da droga cimetidina.

Além do álcool, o uso crônico de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs) é outra causa muito freqüentemente envolvida na

etiologia das patologias gástricas no homem (RAIHA *et al.*, 1998; SCHMASSMANN, 1998; LEVENSTEIN, 1998).

As DAINES como a indometacina e o piroxicam são um dos agentes farmacológicos mais utilizados para o tratamento de inflamações em geral (GARNER, 1990). Porém, essa classe de substâncias pode causar ulceração gastrointestinal, devido à habilidade desses agentes em suprimir a síntese de prostaglandinas, as quais protegem o estômago contra agentes lesivos (WALLACE, 2001).

Clinicamente as DAINES induzem significativamente ulceração, hemorragia, e/ou obstrução de 1- 4% dos pacientes que utilizam estas drogas cronicamente (SILVERSTAIN *et al.*, 2000). Altas taxas de ulceração são vistas em pacientes com histórico de úlceras pépticas, em pacientes que utilizam simultaneamente anticoagulantes, baixas doses de aspirina ou glicocorticóides, e também em idosos (SILVERSTAIN *et al.*, 2000; LAINE *et al.*, 2002).

Os mecanismos pelos quais as DAINES produzem danos no estômago podem ser divididas em ações locais (tópica) e ações sistêmicas. As ações tópicas no epitélio gástrico podem envolver mecanismos severos. Algumas DAINES, particularmente as de natureza ácida, podem matar diretamente as células do epitélio (ALLEN *et al.*, 1993; TARNAWSKI *et al.*, 1988).

DAINES também podem reduzir localmente a secreção de muco e de bicarbonato, desse modo, diminuindo a efetividade do gradiente de pH da mucosa na proteção do epitélio (ALLEN *et al.*, 1993; PHILLIPSON *et al.*, 2002; BAUMGARTNER *et al.*, 2004; JAWORSKI *et al.*, 2005), além disso, o efeito sistêmico mais importante do uso de antiinflamatórios é a habilidade de suprimir a síntese de prostaglandinas (RAINSFORD *et al.*, 1983; WALLACE *et al.*, 1993).

O modelo de indução de úlceras gástricas pelo uso de indometacina foi realizado para se avaliar a ação antiulcerogênica do β -mirceno na dose de 7,5 mg/kg e utilizando a cimetidina (100 mg/Kg) como controle positivo (**Figura 4**). O monoterpreno foi capaz de inibir intensamente a formação de lesões gástricas induzidas por indometacina, protegendo o estômago em 74%

quando comparado ao veículo (Tween 80® a 8%) e à droga padrão cimetidina, a qual protegeu o estômago em 99% em relação ao veículo.

Figura 4) Atividade antiulcerogênica do β -mirceno no modelo de indução de úlcera por indometacina (DAINE) em ratos

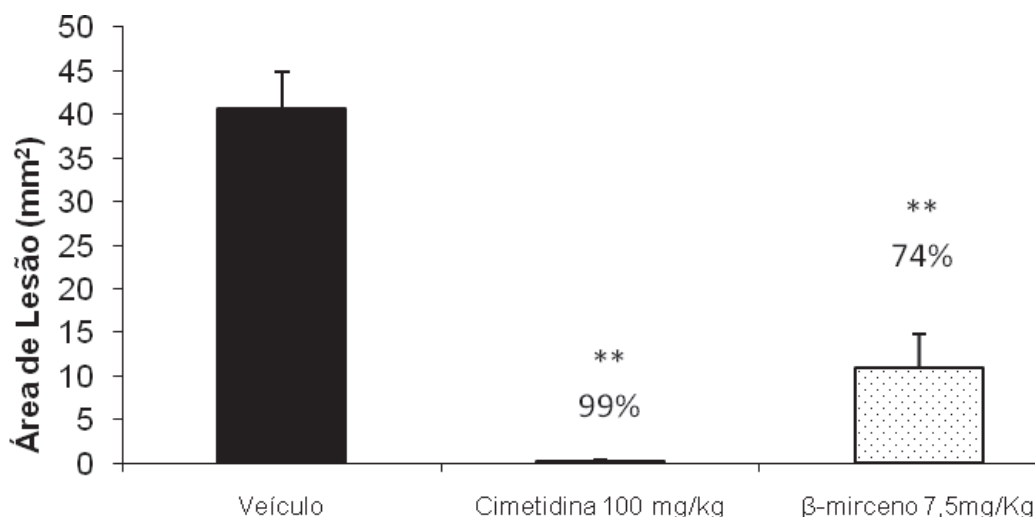


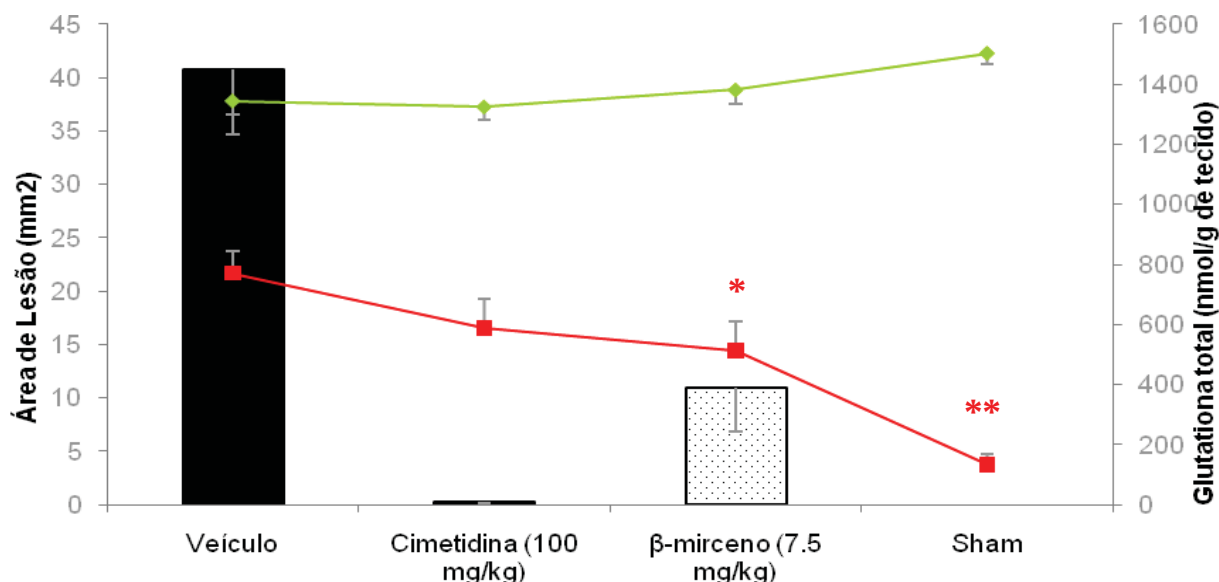
Figura 3) Efeito gastroprotetor do monoterpeno β -mirceno no modelo de úlcera gástrica induzida por DAINÉ em ratos. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, ** $p < 0.01$, comparados ao veículo (Tween 80® a 8%).

Ao proceder com a quantificação de glutathiona total (**figura 5**), não se verificou alterações nas concentrações quando comparado ao veículo, no entanto, a prévia administração de β -mirceno foi capaz de manter os níveis de MPO significativamente ($p < 0.05$) mais baixos que o veículo.

Está bem determinado que a atividade da MPO está aumentada no tecido, após indução de lesão gástrica por DAINÉs e os aumentos nos níveis dessa enzima podem estar associados com o aumento nos níveis de infiltração de neutrófilos e H_2O_2 no tecido danificado pré-tratado com indometacina (WHITTLE, 2004). Desta forma, o β -mirceno foi capaz de inibir a formação de lesões gástricas induzidas por indometacina, com redução nos

níveis de MPO que neutralizam os efeitos deletérios das DAINes nas células da mucosa gástrica.

Figura 5) Efeito do β -mirceno nos níveis de glutatona total e de mieloperoxidase no modelo de indometacina



As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média. Para MPO (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0,01$ em reação ao veículo.

As prostaglandinas são um grupo de ácidos graxos que foram primeiramente isolados do fluido seminal por Von Euler (VON EULER, 1936). Vários estudos indicam que elas aceleram a cura das úlceras gástricas (HAWKEY *et al.*, 1998; SONTAG *et al.*, 1994).

Um dos principais tipos de prostaglandinas produzidas tanto pelos humanos quanto por roedores na mucosa gástrica é a PGE_2 (KNAPP *et al.*, 1978; PESKAR *et al.*, 1980).

A ação protetora das prostaglandinas envolve aumento do fluxo sanguíneo, diminuição da secreção ácida gástrica, estimulação de muco, secreção de bicarbonato (HAWKEY, 2000) e aumento da resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (HAWKEY e

RAMPTON, 1985). Um dos mecanismos através do qual a prostaglandina diminui a resposta inflamatória e reduz a gravidade do dano na mucosa é a modulação da atividade de imunócitos na mucosa.

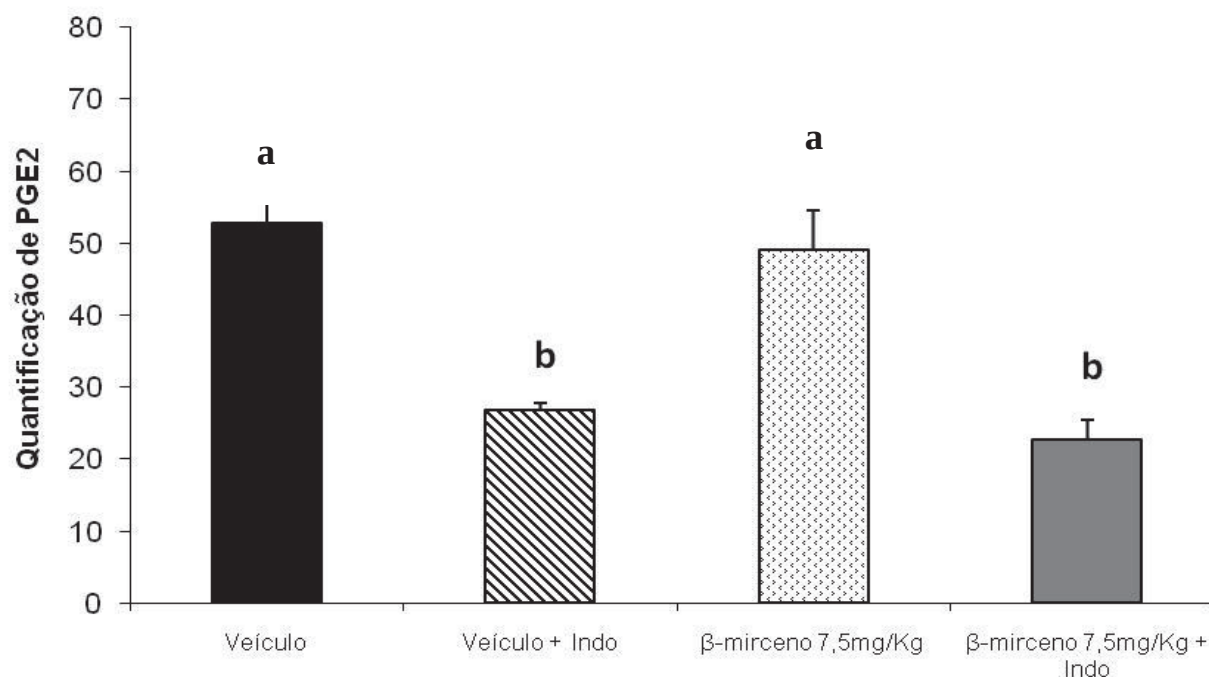
A importância das prostaglandinas (PGs) na defesa da mucosa é evidenciada pela capacidade das DAINEs induzirem danos na mucosa gástrica, dano esse correlacionado com sua habilidade em suprimir a síntese de prostaglandinas gástricas (WALLACE, 2001).

O efeito deletério de DAINEs clássicas na cicatrização da úlcera pode ser reproduzido por inibidores seletivos de COX-1 e COX-2, sugerindo que ambas isoformas de COX são importantes fontes de prostaglandinas durante a cicatrização de úlcera (BRZOZOWSKI *et al.*, 2000).

Dessa forma, a PGE₂ é um fator importante na proteção da mucosa gástrica, pois tanto ela quanto o NO atuam na homeostasia vascular e estão intimamente ligados à produção de muco gástrico (LAINE *et al.*, 2008).

A **figura 6** demonstra que a administração da indometacina, o inibidor da síntese de PGE₂ foi capaz de reduzir significativamente a síntese deste prostanóide. A administração de β -mirceno isoladamente não promove estimulação da síntese de PGE₂, mas mantém os níveis próximos aos animais tratados somente com o veículo. Já a administração de β -mirceno (dose de 7,5 mg/kg) em associação com indometacina não foram capazes de manter os níveis de PGE₂ elevados. Em vista disso, o β -mirceno não é capaz de interferir na ação inibitória da PGE₂ pelas DAINEs, mas mesmo assim apresenta potente atividade antiulcerogênica por manter os níveis elevados de PGE₂ na mucosa gástrica.

Figura 6) Quantificação de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos tratados com β -mirceno



Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da quantificação de PGE₂ (picogramas) dividido pelo peso do raspado de mucosa (em miligramas). Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

Já o modelo de úlcera por isquemia e reperfusão (IR) é utilizado para avaliar resposta de fármacos em um processo de ulcerogênese sem utilização de agentes químicos, patógenos ou estresse somático, como nos modelos de etanol, *H. pylori* e estresse por contenção e frio, isolando os fatores ulcerativos relacionados a radicais livres formados por processos inflamatórios e vasculares (CABEZA *et al.*, 2001; ZIMMERMAN & GRANGER, 1994).

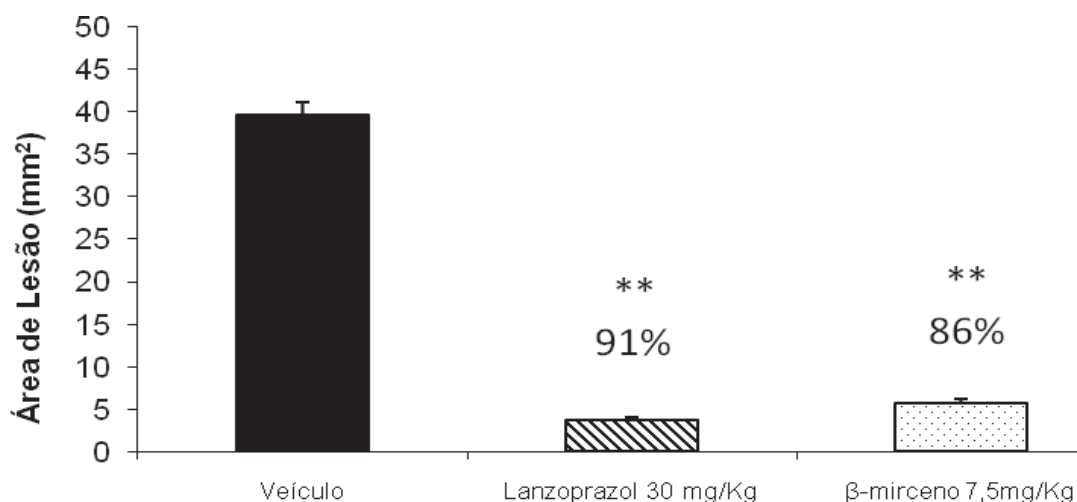
Para reverter o estado isquêmico, há necessidade de restauração de fluxo sanguíneo. Entretanto, o restabelecimento do suprimento vascular normal paradoxalmente pode ser responsável por lesões ainda mais graves do que as da isquemia *per se* (CAMPOS & YOSHIDA, 2004).

A isquemia por si só é capaz de provocar lesões no tecido gástrico; entretanto, é após a reperfusão que ocorrem os principais eventos lesivos. KITANO e colaboradores (2005) mostraram que após a reoxigenização da mucosa gástrica as lesões são aumentadas em cerca de três vezes em

relação a aquelas ocasionadas no período de isquemia (CAMPOS & YOSHIDA, 2004). O processo de reperfusão, após período de isquemia, inicia com um aumento na concentração de cálcio interno e abertura dos canais inespecíficos na membrana interna mitocondrial, acompanhado por uma perda de proteínas da matriz com alteração na densidade plasmática. Também ocorre uma despolarização da membrana mitocondrial com inchamento (swelling) das mitocôndrias e diminuição da atividade da ATPase. Assim, os danos causados a mitocôndria durante a isquemia-reperfusão podem ser irreversíveis e induzir a morte celular por apoptose ou por necrose do tecido (GRIFFITHS & HALESTRAP, 1995). A utilização de compostos antioxidantes e “scavengers” de radicais livres têm se mostrado benéfica em animais expostos a este processo (DERIN *et al.*, 2004; DERIN *et al.*, 2005; NAITO *et al.*, 1999; SAKURAI *et al.*, 1994).

Os resultados encontrados com o β -mirceno no modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão (IR) foram muito expressivos (**Figura 7**). Com a administração de uma dose reduzida de 7.5 mg/kg de monoterpeno foi possível constatar a diminuição significativa das lesões ulcerativas com uma proteção gástrica de 86% quando comparadas ao grupo controle negativo (Tween 80® a 8%) e ao lansoprazol (controle positivo) com proteção de 91%, sendo que este apresenta dose 4 vezes maior que o β -mirceno.

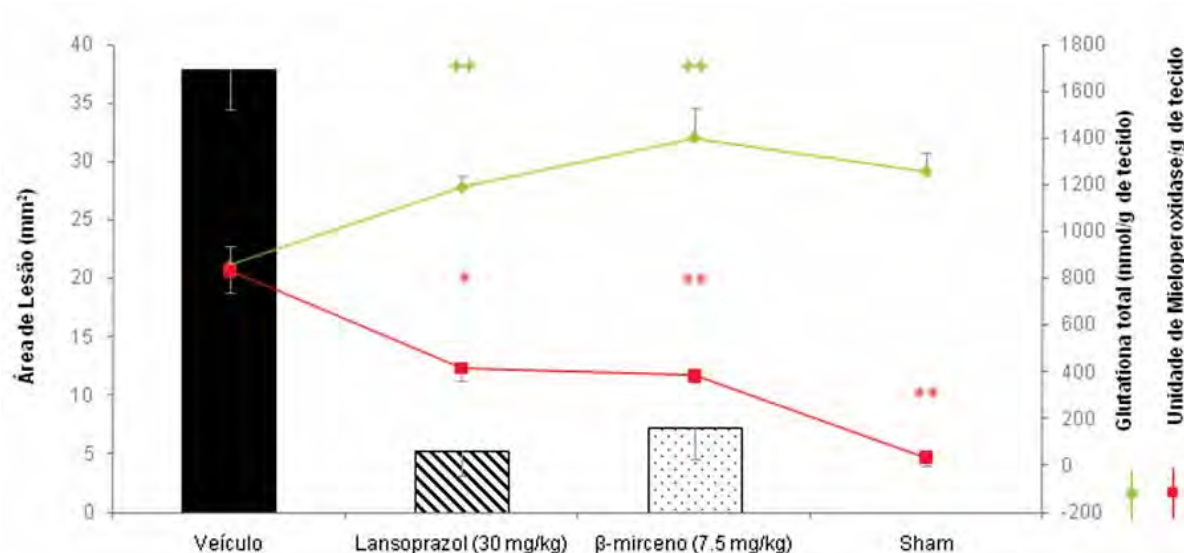
Figura 7) Atividade antiulcerogênica do β -mirceno no modelo de indução de úlcera isquemia-reperfusão em ratos



Efeito gastroprotetor do monoterpeneo β -mirceno no modelo de úlcera gástrica induzida por Isquemia-reperfusão em ratos. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, ** $p < 0.01$, comparados ao veículo (Tween 80® a 8%).

Ao quantificar a glutathione total (GSH) e MPO no tecido dos animais submetidos ao modelo de isquemia-reperfusão (**figura 8**), os resultados foram ainda mais surpreendentes levando em consideração a baixa dose do β -mirceno. Os níveis de glutathione total se mostraram significativamente aumentados para o monoterpeneo em relação ao veículo (Tween 80® a 8%) e visivelmente mais altos em relação ao encontrado com o Lansoprazol (controle positivo), dose 4 vezes mais alta que a do β -mirceno. Da mesma forma, porém com a quantificação de MPO no tecido, os níveis de mieloperoxidase no grupo β -mirceno foi significativamente menores ($p < 0,01$) do que os níveis encontrados no veículo e também no grupo lansoprazol ($p < 0,05$).

Figura 8) Efeito do β -mirceno nos níveis de glutatona total e de mieloperoxidase no modelo de indução de úlcera por isquemia-reperusão



As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média. (++) Para glutatona total ($p < 0,01$); (*) para MPO ($p < 0,05$); (**) para MPO ($p < 0,01$) em reação ao veículo.

Estes resultados ressaltam o pressuposto de que o tratamento com o β -mirceno exerce fantástica ação protetora sobre a mucosa gástrica em modelo de liberação de radicais livres, conferindo-lhe uma poderosa ação antioxidante.

Além das úlceras gástricas, outra doença que tem merecido destaque é a úlcera duodenal. A úlcera duodenal (UD) se apresenta em duas a até quatro vezes mais prevalente do que úlcera gástrica (KROMENKO *et al.*, 2009), sendo que ela sempre representou um diagnóstico endoscópico de alta frequência em qualquer serviço de endoscopia digestiva. Nas duas últimas décadas, importantes mudanças têm ocorrido na epidemiologia da úlcera duodenal (UD) no Brasil (POST, 2006). Observou-se decréscimo gradativo dos percentuais de prevalência da úlcera duodenal, ano após ano, onde em 1996 ocorreram com 8,6% de prevalência e em 2005 reduziu para 3,3% (SAUL, 2007).

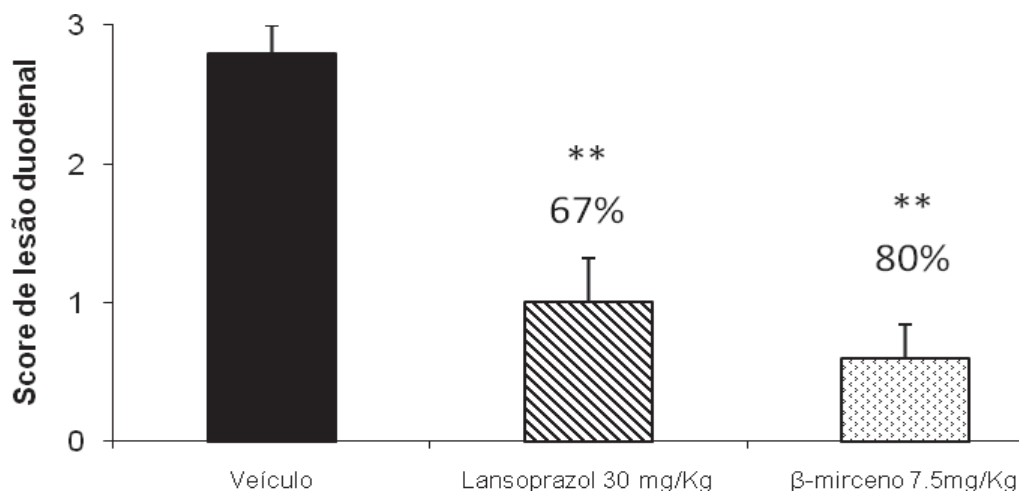
O estresse emocional, o consumo de álcool, o uso de DAINES, medicamentos imunossupressores, outras drogas e a queda dos níveis de prostaglandinas têm mostrado também serem fatores contribuintes no aparecimento da úlcera (YUANG *et al*, 2006).

De acordo com CHAN & LEUNG (2002) e SONNENBERG & EVERHART (1997) a úlcera duodenal apresenta forte associação com infecção por *H. pylori* e muitos estudos tem se baseado na indução da úlcera duodenal utilizando a cisteamina (HS-CH₂-CH₂-NH₂, mercaptoetilamina) que produz úlceras perfurantes no duodeno do animal dentro de 24-48h após sua administração (SELYE & SZABO, 1973; SZABO, 1987; SZABO & PIHAN, 1987). No entanto, o mecanismo molecular pelo qual a cisteamina induz ulceração duodenal não está completamente entendido.

Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento com β -mirceno foi surpreendentemente capaz de inibir a formação de lesão duodenal pela cisteamina (**figura 9**). Esta inibição encontrada pelo monoterpeno foi significativamente maior do que a observada com o controle positivo lansoprazol, obtendo 80% de proteção gástrica com a mesma dose de outros experimentos contra apenas 67% encontrada com o controle positivo (dose 4 vezes maior), todos comparados com o veículo (Tween 80® a 8%).

Na **figura 10** estão expressos os resultados das quantificações de glutathione total e de MPO do modelo de indução de úlcera duodenal por cisteamina. Os níveis de glutathione total se mostraram significativamente aumentados ($p < 0,01$) tanto para o β -mirceno, lansoprazol como também para o Sham em relação aos níveis de glutathione total encontrados no veículo (Tween 80® a 8%). Isto indica mais uma vez, a poderosa atividade antioxidante deste monoterpeno sobre as úlceras pépticas. Além disso, os resultados da quantificação de mieloperoxidase destes mesmos tecidos indicam a queda de seus níveis nos três grupos em relação ao controle negativo, confirmando assim sua ação antioxidante.

Figura 9) Atividade antiulcerogênica do β -mirceno no modelo de úlcera duodenal em ratos



o gastroprotetor do monoterpeneo β -mirceno no modelo de úlcera gástrica induzida por cisteamina em ratos. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, ** $p < 0.01$, comparados ao veículo (Tween 80[®] a 8%).

Figura 10) Efeito do β -mirceno nos níveis de glutathiona total e de mieloperoxidase no modelo de úlcera duodenal

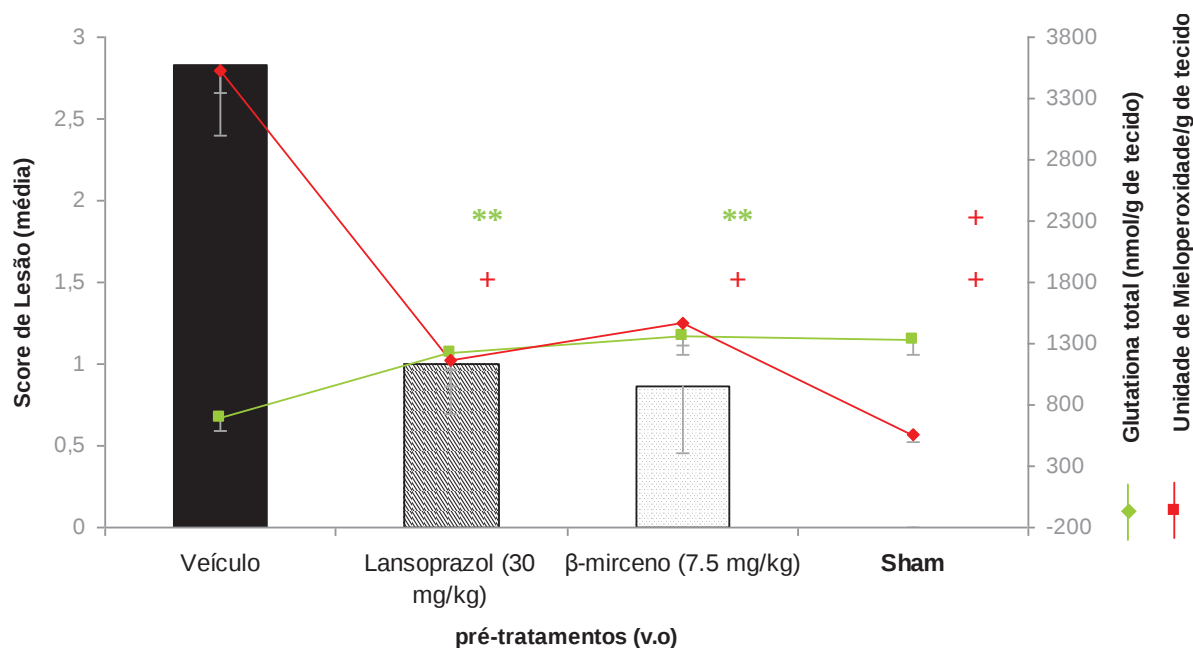


Figura 8) As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média. (++) Para glutathiona total ($p < 0,01$); (*) para MPO ($p < 0.05$); (**) para MPO ($p < 0,01$) em reação ao veículo.

A peroxidação lipídica mediada por espécies reativas de oxigênio é uma importante causa da destruição e lesão nas membranas celulares e está envolvido na patogênese de injúrias na mucosa induzidas por etanol, isquemia/reperfusão e indometacina (KVIETYS *et al.*, 1990; SALIM *et al.*, 1990).

Apesar de apresentar elevação de fatores antioxidantes pelo pré-tratamento com o β -mirceno, este mesmo monoterpene não possui atividade antioxidante direta no tecido ao não exercer efeito inibitório sobre a lipoperoxidação em homogenato de cérebro de rato *in vitro* (dados não apresentados). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam a inegável ação gastroprotetora do β -mirceno que exerce sua ação via elevação dos níveis de glutathione total e queda considerável de mieloperoxidase nos tecidos.



Conclusões

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O β -mirceno é um importante agente gastroprotetor, pois é capaz de exercer ação gastroprotetora frente a indutores de lesões gástricas através da diminuição da secreção de H^+ na mucosa gástrica, apresentando assim, atividade antissecretória.

O monoterpeno β -mirceno apresentou indiscutível atividade antiulcerogênica nos modelos de indução de úlcera gástrica por etanol, indometacina (DAINE), isquemia/reperfusão e úlcera duodenal por meio da inibição das lesões ulcerativas com significativo aumento da produção de muco, um fator protetor da mucosa gástrica.

Além disso, este monoterpeno apresentou atividade antioxidante por manter elevados os níveis de glutathione total (GSH) e baixos os níveis de mieloperoxidase (MPO) nos tecidos analisados em vários modelos experimentais de indução de úlcera péptica.

A descoberta de atividade antiulcerogênica e o potencial antioxidante do monoterpeno β -mirceno são inéditos. Este trabalho abre as portas para futuros estudos mais aprofundados destas atividades biológicas, envolvendo mecanismos estimulatórios da produção de muco, antioxidantes, antiinflamatórios, antissecretórios e cicatrizantes.



Referências Bibliográficas

- AKHTAR M.S., MUNIR M. (1989). Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea*, and *Ocimum basilicum* in rats. *J Ethnopharmacol* Nov;27(1-2):163-176.
- ALICAN, I.; KUBES, P. (1996). A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *The American Journal of Physiology*. v.270, p.225-237.
- ALLEN JC, HAMILTON, RJ. (1983). RANCIDITY IN FOODS. *APPLIED SCIENCE*, 199.
- ALLEN, A.; FLEMSTROM, G.; GARNER, A.; KIVILAAKSO, E. (1993). Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol. Rev.* 73: 823—857.
- ALLEN, J.C.; HALIMTON, R.J. (2000). Rancidity and foods, *Blackie Academic and Professional*, London, UK.
- ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, v. 288, n. 1, p. C1-19.
- ALMEIDA, N. H. (1994). Determinação de eficiência do recheio estruturado mellapak 500y na destilação da terebintina em coluna piloto (tese), *EPUSP*, São Paulo.
- ANDERSON, M. (1985). Determination of glutathione disulfide in biological samples, *Methods Enzymmol.*, v. 113, p.548-555.
- ANDREOLI T. E. (2000). Physiology in medicine: Free Radicals and oxidative stress. *American Journal Medicine*; 108: 650-51.
- ARUOMA O. I. (1995). Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biology e Medicine*; 20(5): 675-705.
- ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S. & DUBOIS, A. (2000). Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins & other Lipids Mediators*, v. 61, p. 105-124.
- AVILA, J. R.; DE LA LASTRA, C. A.; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D. *et al.* (1996). Role of endogenous sulphydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm.Res.*, v.45, n. 2, p. 83-88.
- BAATAR D, KAWANAKA H, SZABO IL, PAI R, JONES MK, KITANO S, TARNAWSKI AS. (2002). Esophageal ulceration activates genes encoding keratinocyte growth factor and its receptor in rats: a key to esophageal ulcer healing? *Gastroenterology*, v. 122, pg. 458–468.
- BAKER, M. E. (1994). Licorice and enzymes other than 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: an evolutionary perspective. *Steroids*, v. 59, n. 2, p. 136-141.

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBACK, D., WAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- BALUNAS, M.J. & KINGHORN, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431-441.
- BARON JH. (1977). Effect of carbenoxolone sodium on human gastric acid secretion. *Gut* 18:721-722.
- BARREIROS, A.B.S, DAVID, J.M. (2006). Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*; 1: 113-123.
- BAUER, H.; MARKER-HERMANN, E. (2003). [Therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs]. *Orthopade*, v. 32, n. 12, p. 1088-1094.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. (1997). Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation Properties and Uses, *Wiley*, New York.
- BAUMGARTNER, H.K.; MONTROSE, M.H. (2004). Regulated alkali secretion acts in tandem with unstirred layers to regulate mouse gastric surface pH. *Gastroenterology* 126: 7747-7783.
- BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M. *et al.* (2006). The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine.*, v. 13, n. 8, p. 584-590.
- BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K-FR. (1995). Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. *Drug Res.*, v.45, n.1, p.697-700.
- BORELLI, F. & IZZO, A.A. (2000). REVIEW ARTICLE: The plant Kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytoter. Res.*, v.14, p.581-591.
- BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S; PARKER, K.L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11 Ed. *United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc.*
- BURWELL J.R. (1952). R.L. *J. Am. Chem. Soc.* 73, 4461.
- CABEZA J, MOTILVA, V., MARTÍN, M.J., ALARCON DE LA LASTRA, C. (2001). Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sciences*; 68: 1405-15.
- CALVET X, DUCONS J, BUJANDA L. (2005). Seven versus ten days of rabeprazole triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a multicenter randomised trial. *Am J Gastroenterol*; 100: 1696-1701.

- CÂMARA, J. S., HERBERT, P., MARQUES, J. C., & ALVES, M. A. (2004). Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 513, 203–207.
- CAMPOS EBP, YOSHIDA WB. (2004). O papel do radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *J Vasc Br*; 3(4): 357-66.
- CARRO, N., LÓPEZ, E., GÜNATA, Z. Y., BAUMES, R. L., & BAYONOVE, C. L. (1996). Free and glycosidally bound aroma compounds in grape must of four non-floral *Vitisvinifera* varieties. *Analisis*, 24, 254–258.
- CHAN, F.K.; LEUNG, W.K. (2002). Peptic-ulcer disease. *Lacet*, v.360, p.933-941.
- CHO, C. H. (2001). Current roles of nitric oxide on gastrointestinal disorders. *Journal of Physiology-Paris*, v. 95, p. 253-256.
- CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; van ZANDEN, J. & van BLADEREN, P. J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 10, p. 141-152.
- COLLIN, H. A. (2001). Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.*, v.34, p.119-134.
- CONNOLLY, J. D., HILL, R.A. (2007). Triterpenes. *Nat. Prod. Rep.* 24, 465.
- CROWELL, P.L. (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of nutrition* 129, 775S-778S.
- DAS D, BANDYPADHYAY D, BHATTACHARJEE M, BANERJEE RK. (1997). Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology e Medicine*; 23(1): 8-18.
- DAS D, BANDYPADHYAY D, BANERJEE RK. (1998). Oxidative inactivation of gastric peroxidase by site-specific generation of hydroxyl radical and its role in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology e Medicine*; 24(3): 460-9.
- DE LA LASTRA CA, CABEZA J, MOTILVA V, MARTIN MJ. (1997). Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pineal Res*; 23(2): 47-52.
- DELGADO, I.F.; NOGUEIRA, A.C.; SOUZA, C.A.; COSTA, A.M.; FIGUEIREDO, L.H.; MATTOS, A.P.; CHAHOLD, I.; PAUMGARTTEN, F.J. (1993). Peri and Postnatal developmental toxicity of Beta-myrcene in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 31:623-628.
- DENGIZ, G.O.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; et al. (2007). Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *Arch Pharm Res*, v.30, p. 1426-1434.

- DE OLIVEIRA, A.C.; RIBEIRO-PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, J.R. (1997). In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol. Lett.* 92:39-46.
- DERIN N, AGAC A, BAYRAM Z, ASAR M, IZGUT-UYSAL VN. (2005). Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochem.Funct.* (Epub ahead of print)
- DERIN N, IZGUT-UYSAL VN, AGAC A, ALICIGUZEL Y, DEMIR N. (2004). L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J.Physiol Pharmacol*; 55(3): 595-606.
- DI STASI, L.C. (1996). Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um guia de estudo interdisciplinário. São Paulo: *Editora da Universidade Estadual Paulista*, p. 131-136.
- DOCKRAY, G.J., VARRO, A., DIMALINE, R. (1996). Gastric endocrine cells: gene expression, processing and targeting of active products. *Physiol. Reviews* 76(3): 767-798.
- DOLL R., LANGMAN, M.J.S; SHAWDON H.H. (1968). Effect of different doses of carbenoxolone and different diuretics. In: ROBSON JM, SULLIVAN FM, eds. *Symposium on carbenoxolone sodium*. London: Butterworths, 51-60.
- DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D. *et al.* (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat.Prod.Rep.*, v. 23, n. 3, p. 394-411.
- EL-ABHAR HS, ABDALLAH DM, SALEH S. (2003). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J.Ethnopharmacol*; 84(2-3): 251-8.
- EASTWOOD, G.L. (1997). Is smoking still important in the pathogenesis of peptic ulcer disease? *J Clin Gastroenterology.*, v.25, s.1, p 1-7.
- ERIKSON, R.E. (1976). The industrial importance of monoterpenes and essential oils. *Lloydia* 39, 8-20.
- ERMAN, W.E. (1985). Chemistry of the Monoterpenes: An Encyclopedic Handbook, *Marcel Dekker*, New York.
- FARINA, C.; PINZA, M.;PIFFERI, G. (1998). Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Farmaco*, v. 53, n. 1, p. 22-32.
- FLAMINI, R. (2005). Some advances in the knowledge of grape, wine and distillates chemistry as achieved by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 705–713.

- FOCA, C.M.; GUSEVSKAYA, E.; SANTOS E.N, BAYÓN, J.C. (2004). [HTTP://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1463](http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1463), 10 march.
- FORD AC, DELANEY BC, FORMAN D. (2004). Eradication therapy in *Helicobacter pylori* positive peptic ulcer disease: systematic review and economic analysis. *Am J Gastroenterol*; 99: 1833-1855.
- FRAGA, B.M. (2005). Sesquiterpenes. *Nat. Prod. Rep.* 22, 465.
- FRANCO, L.; MANARA, P.; ERBETTI, I.; VELO G.P. (1993). Anti-ulcer activity of carbenoxolone and ISF 3401 on PGE₂ release in rat gastric mucosa. *Pharmacological Research*. Vol. 27, nº2.
- FREITAS, J.C.; PRESGRAVE, O.A.; FINGOLA, F.F.; MENEZES, M.A.; PAUMGARTTEN, F.J. (1993). Effect of beta-myrcene on pentobarbital sleeping time. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26:519-523.
- GARNER A, HELYINGS JR, HAMPSON SE, STANIER AM. (1990). Identification of agonists of duodenal alkaline secretion. *J Intern Med.* v. 228 (Suppl), pg. 97-103.
- GISBERT JP & PAJARES JM. (2005). Systematic review and meta-analysis: is 1-week proton pump inhibitor-based triple therapy sufficient to heal peptic ulcer? *Aliment Pharmacol Ther*; 21: 795-804.
- GLAVIN G.; SZABO S. (1992). Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. *Faseb J.* v. 6, p. 825-831.
- GO, M. F. (1997). What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori* associated disease? *Gastroenterology*, v. 113, n. 6 Suppl, p. S15-S20.
- GOLDBLATT, L.A.; SAVICH, T.R. (1950). Cl 260-267 US n2,507-546, USA, 16 May.
- GOODMAN & GILMAN (1996). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* 10 ed., Rio de Janeiro Laggos. pág 635-680.
- GRAYSON, D.H. (2000). Monoterpenes. *Nat. Prod. Rep.* 17, 385.
- GRIFFITHS EJ, HALESTRAP AP. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*; 307:93-98.
- GUEVARA DOS SANTOS, M. (2005). Refino da terebintina sulfatada desodorizada por destilação e sua utilização na Síntese de alfa-terpineol (*Dissertação*), UFSC, Florianópolis.
- GUIDOBONO, F.; PAGANI, F.; TICOZZI, C.; *et al.*; (1997). Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br J Pharmacology.* , v. 120, p. 581-86.

- GUHA, P.; DEY, A.; SARKAR, B.; DHYANI, M.V.; *et al.* (2009). Improved antiulcer and anticancer properties of trans-resveratrol analog imine. *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 323, p.829-839.
- GURGEL DO VALE, T.; COUTO FURTADO, E.; SANTOS JR, J.G.; VIANA, G.S.B. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. *BrownPhytomedicine* 9: 709-714.
- GURIB-FAKIM, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday. *Molecular Aspect of Medicine*, 27, 1-93.
- GYIRES K. (2004). Neuropeptides and gastric mucosal homeostasis. *Curr Top Med Chem.*;4(1):63-73.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. (1991). Free Radicals in Biology and Medicine. *Claredon Press*.p. 543.
- HALLIWELL B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 344: 721-724.
- HALLIWELL B., AESCHBACH R., LOLIGER J., ARUOMA O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Chem. Toxic*; 33(7): 601-617.
- HALLIWELL, B. (1998). Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radic Res*; 29(6):469-86.
- HALLIWELL, B. (2000). The antioxidant paradox. *Lancet*. 355: 1179 -1180-1187.
- HANSON, J.R. (2005). Diterpenes. *Nat. Prod. Rep.*22, 594.
- HANSON, J.R. (1996). Sesterpenes. *Nat. Prod. Rep.* 13, 529.
- HERNANDEZ-MUNOZ, R.; MONTIEL-RUIZ, C.;VAZQUEZ-MARTINEZ, O. (2000). Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Lab Invest*, v. 80, n. 8, p. 1161-1169.
- HIRAISHI, H.; TERANO, A.; OTA, S.; MUTOH, H.; SUGIMOTO, T.; HARADA, T. *et al.* (1994). Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. *Gastroenterology*, v. 106, n. 5, p. 1199-1207.
- HIRUMA-LIMA, C.A. (1998). Atividade antiulcerogênica da desidrocrotonina e do óleo essencial obtido a partir das cascas de Croton cajucara BENTH, uma planta da família Euphorbiaceae. *Tese de Doutorado*, Unicamp.
- HOOGERWERF, W. A. & PASRICHA, P. J. (2005). Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcer and gastroesophageal reflux

- disease. In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 11TH edition, McGraw-Hill, International edition, p.1005-1020.
- HUSAIN, S.R.; CILLARD J.; CILLARD, P. (1987). *Phytochemistry*; 26: 2489.
- ITO M, SUZUKI Y, ISHIHARA M, SUZUKI Y. (1998). Anti-ulcer effects of antioxidants: effect of probucol. *European Journal of Pharmacology*; 354: 189-196.
- JAWORSK, T.; SAROSIEK, I.; SOSTARICH, S.; ROESER, K.; CONNOR, M.; BROTZ, S.; WALLNER, G.; SAROSIEK, J. (2005). Restorative impact of rabeprazole on gastric mucus and mucin production impairment during naproxen administration: its potential clinical significance. *Dig Dis Sci* 50:357-365.
- JORDAN, N.; NEWTON, J.; PEARSON, J.; ALLEN, A. (1998). A novel method for the visualization of the in situ mucus layer in rat and man. *Clin.Sci.(Lond)*, v. 95, n. 1, p. 97-106.
- JÚNIOR AAJ, CHIARELLO PG, BERNARDES MSM, VANUCCHI H. (1998). Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina Ribeirão Preto*; 31: 434-49.
- JÚNIOR LR, HOEHR NF, VELLASCO AP. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metanólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*; 1: 112-119.
- KANWAR, S.; WALLACE, J. L.; BEFUS, D.; KUBES, P. (1994). Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am. J. Physiol.*, 266 (2 Pt 1): G222-G229.
- KHOMENKO, T.; SZABO, S.; DENG, X.; ISHIKAWA, H.; ANDERSON, G.J.; MCLAREN, G.D. (2009). Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296: G1277-86.
- KIRK, R.E., OTHMER, D.F. (1981). *Encyclopedia of Chemical Technology*, v22, John Wiley and Sons, New York, 3ed, p.709.
- KITANO M, BERNSTAND M, KISHIMOTO Y, NORLEN P, HAKANSON R, HAENUKI Y *et al.* (2005). Ischemia of rat stomach mobilizes ECL cell histamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 288(5): G1084-G1090.
- KHOMENKO, T.; SZABO, S.; DENG, X.; ISHIKAWA, H.; ANDERSON, G.J.; MCLAREN, G.D. (2009). Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296: G1277-86.
- KO, J. K. S.; CHO, C. H. (1995). The role of non-protein sulfhydryl compound in gastric adaptive cytoprotections against ethanol-induced mucosal damage in rats. *Inflamm. Res.* v. 44, p242-244.

- KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T. (2002). Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. *Eur.J.Pharmacol.*, v. 452, n. 2, p. 235-243.
- KONTUREK, P. K ; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; DEMBINSKI, A. (1990). Role of epidermal growth factor, prostaglandin and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. *Gastroenterology*. v. 99, p. 1607-1615.
- KRAWISZ, J.E., SHARON, P., STENSON, W.F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. *Gastroenterology*, 87, 1344-1350.
- KRISTJANSSON, G.; HOGMAN, M.; VENGE, P.; HALLGREN, R. (2005). Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in celiac patients challenged with gluten and corn. *Gut*, 54 (6): 769-774.
- KUTCHAI, H.C. (1996). Gastrointestinal secretions. In: principles of Physiology. Ed. By R.M. Berne and M.N. Levy, 2nd Edition, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, Missouri, 516-589.
- KVIETYS, P.R.; TWOHIG, B.; DANZELL, J.; *et al.* (1990). Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. *Gastroenterology*, v.19, p. 909-920.
- KWIECIEN S, BRZOZOWSKI T, KONTUREK SJ. (2002). Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J.Physiol Pharmacol*; 53(1): 39-50.
- LAINE, L.; BOMBARDIER, C.; HAWKEY, C.H.; DAVIS, B.; SHAPIRO, D.; BRETT, C.; REICIN, A. (2002). Stratifying the risk of NSAID-related upper gastrointestinal clinical events: results of a double-blind outcomes study in patients with rheumatoid arthritis. *Gastroenterology* 123: 1006-1012.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWASKI, A. (2008). Reviews in basic and clinical gastroenterology. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, 135: 135-141.
- LAVABRE, M. (2001). Aromaterapia: A cura pelos óleos essenciais. 5.ed. Rio de Janeiro: *Record*.
- LAWRENCE, A. R. V. (1989). *in*: D.F. Zinkel, J. Russels (Eds.), *Naval Stores, Pulp Chemicals association*, New York, p. 123 c4.
- LEONG, R.W. (2009). Differences in peptic ulcer between the East and the West. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 38: 363-379.
- LEUNG, A.Y. (1980). *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*. Wiley, New York.

- LEVENSTEIN, S. (1998). Stress and peptic ulcer: life beyond *Helicobacter*. *BMJ*, v. 316, n. 7130, p. 538-541.
- LEWIS, D.A. & HANSON, P.J. (1991). *Anti-ulcer drugs oh plant origin*, Progress Medicinal Chemistry, Elsevier Science Publishers, 28: 201-231.
- LEWIS, D. A. E; SHAW, G. P. (2001). A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J. Nutr. Biochem.*, v.12, p.95-100.
- LORENZETTI, B. B., SOUZA, G. E., SARTI, S. J., FILHO, D. S., FERREIRA, S. H. (1991). Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne ,v.34, n. 1, p. 43-48.
- MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN C. (2006). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-The Maastricht III Consensus Report. *GUT online* Dec 14.
- MANTYHC. .R., PAPPAST, .N. and VIGNAS, .R. (1994). Localization of cholecystokininA and cholecystokinin Bigastrin receptors in the canine upper gastrointestinal tract. *GastroenteroZogy*, 107,1019-1030.
- MATEO, J. J., & JIMÉNEZ, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, 881, 557-567.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. (1999). Gastroprotection Of escins Ia, Ib, Iia, And Iib on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Eur. J. Pharmacology*, v. 373, p 63 – 70.
- MCCORD, JM. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The Amer J of Med*; 108: 652-9.
- MIMOUN, H. (1996). *Chimia* 50. 620.
- MODLIN IM, TANG LH. (1997). Approaches to the diagnosis of gut neuroendocrine tumors: the last word (today). *Gastroenterology* 1997; 112:583-90.
- MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.;MIROSSAY, L. (2000). Role of mucus in ischemia/reperfusioninduced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res.*, v. 49, n. 4, p. 441-446.
- MORAES, T. M. (2008). Determinação do mecanismo de ação antiulcerogênico do óleo essencial e dos compostos majoritários de *Citrus aurantium* L. (Rutaceae). Dissertação de mestrado. 76pg.
- MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F.C.; SANTOS, R.C.; ROCHA, L.R.M.; MARQUES, M.O.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. (2009). Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion *Chemico-Biological Interactions* 180 499-505.

- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. (1991). Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. *Jap. J. Pharmacol.* 57: 495-505.
- MOTA, K.S.; DIAS, G.E.; PINTO, M.E.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A.R.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. (2009). Flavonoids with gastroprotective activity *Molecules* 14: 979-1012.
- NAITO Y, YOSHIKAWA T, MATSUYAMA K, YAGI N, KASAI K, SUGIMOTO N *et al.* (1999). Effect of vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in nitric oxide-depleted rats. *Aliment.Pharmacol.Ther*; 13(4): 553-9.
- NERVI G, LIATOPOULOU S, CAVALLARO L. (2006). Does *Helicobacter pylori* infection eradication modify peptic ulcer prevalence? A 10 years endoscopical survey. *World J Gastroenterol*; 12(15): 2398-2401.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Product*, 66, 1022-1037.
- OLBE, L., CARLSSON, E., LINDBERG, P. (2003). A proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 132-139.
- PEURA, D. A. (2004). Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal symptoms and ulcer complications. *Am.J.Med*, v. 117 Suppl 5A, p. 63S-71S.
- PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNAS, J.; HOLM, L. (2002). The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *Am.J.Physiol Gastrointest. Liver Physiol*, v. 282, n. 2, p. G211-G219.
- POHLE, T., DOMSCHKE, W. (2003). Gastric function measurements in drug development. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56(2): 156-164.
- POST P.N., KUIPERS E.J., MELJER G.A. (2006). Declining incidence of peptic ulcer but not of its complications: a nation-wide study in the Netherlands. *Aliment Pharmacol Ther.*;23:1587-93.
- PRINZ, C.; ZANNER, R.; GRATZL, M. (2003). Physiology of gastric Enterochromaffin-like cells. *Annual Review of Physiology.* v.65, p.371-82.
- PYBUS, D. H.; SELL, C. S. (Eds.) (1999). The Chemistry of Fragrances, *RSC Paperbacks*, Cambridge.
- RAIHA, I.; KEMPPAINEN, H.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; SOURANDER, L. (1998). Lifestyle, stress, and genes in peptic ulcer disease: a nationwide twin cohort study. *Arch.Intern.Med.*, v. 158, n. 7, p. 698-704.

- RAINSFORD, K.D. (1983). Microvascular injury during gastric mucosal damage by anti-inflammatory drugs in pigs and rats. *Agents Actions* 13:457-460.
- RATES, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.
- REPETTO MG, LIESUY SF. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 35: 523-34.
- RODRÍGUEZ-TÉLLEZ, M.; ARGÜELLES, F.; HERRERÍAS, J. M. Jr.; LEDRO, D.; ESTEBAN, J. & HERRERÍAS, J. M. (2001). Antiinflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. *Current Pharmaceutical Design*, v. 7, p. 951-976.
- SAKURAI T, SUGAWARA H, SAITO K, KANO Y. (1994). Effects of the acetylene compound from *Atractylodes* rhizome on experimental gastric ulcers induced by active oxygen species. *Biol.Pharm.Bull*; 17(10): 1364-1368.
- SALIM, A.S. (1990). Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. *Digestion*, v.47, p. 24-28.
- SALIM, A. S. (1992). Sulphydryl-containing agents: a new approach to the problem of refractory peptic ulceration. *Pharmacology*, v. 45, n. 6, p. 301-306.
- SANIOTO, D.L. (1991). Sistema digestivo: secreção e digestão. In: *Fisiologia*. Ed. Guanabara Koogan.
- SANTOS, R.I. (2003). Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES , C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; SIMÕES, C.M.O. E SPITZER, V. Óleos Voláteis. 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: Editora da UFRGS cap. 18, p. 467-495.
- SAUL, C.; TEIXEIRA, C. R.; PEREIRA-LIMA, J.C.; TORRESINE, R.J.S. (2007). Redução da prevalência da úlcera duodenal: um estudo brasileiro (análise retrospectiva na última década: 1996-2005). *Arq. Gastroenterol*. V.44, n.4.
- SENER-MURATOGLU, G.; PASKALOGLU, K.; ARBAK, S.; HURDAG, C.;YANOGLU-DULGER, G. (2001). Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. *Dig.Dis.Sci.*, v.46, n. 2, p. 318-330.

- SHAH, V.; KAMATH, P.; DE GROEN, P. (2002). Physiology of the splanchnic circulation. In: Theory and practice of vascular diseases (Topol E, Lanzer F, eds). Germany: Springer Verlag, p.1688-1694.
- SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G. (2004). Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology*. v.126, p.903-913.
- SCHAUF, C.L., MOFFETT, D.F., MOFFETT, S.B.O (1993). Trato gastrointestinal. In: Fisiologia Humana, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- SCHERR, A.P.; ALMEIDA, N.H.; WIEDMER, C.A.; KOLISHESKI, M.B. (2002). *Anais do COBEQ XIV, COBEQ 2002*, p.259.
- SCHMASSMANN, A. (1998). Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am.J.Med.*, v. 104, n. 3A, p. 43S-51S.
- SCHUBERT, M. L. (2004). Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*. v.20, p.519-525.
- SHICHIJO, K.; IHARA, M.; MATSUU, M.; *et al.*; (2003). Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. *Dig Dis Sci.*, v. 48, p. 340-48.
- SHIRIN, H.; PINTO, J. T.; LIU, L. U.; MERZIANU, M.; SORDILLO, E. M. & MOSS, S. F. (2001). *Helicobacter pylori* decreases gastric mucosal glutathione. *Cancer Letters*, v. 164, p. 127-133.
- SIMÕES, C.M.O. E SPITZER, V. (2003). Óleos Voláteis. 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: Editora da UFRGS, cap. 18, p. 467-495.
- SELYE H & SZABO S. (1973). Experimental model for production of perforating duodenal ulcers by cysteamine in rats. *Nature* 224: 458-459.
- SENO K, JOH T, YOKOYAMA Y, ITOH M. (1995). Role of mucus in gastric mucosal injury induced by local ischemia/reperfusion. *J Lab Clin Med*; 126(3):287-93.
- SIEGMUND, S. (2003). Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 17, n. 4, p. 519-542.
- SIEPLER, J. K.; MAHAKIAN, K.; TRUDEAU, W. T. (1986). Current concepts in clinical therapeutics: peptic ulcer disease. *Clin. Pharm.*, 5(2): 128-142.
- SILVERSTEIN, F.E.; FAICH, G.; GOLDSTEIN, J.L.; SIMON, L.S.; PINCUS, T.; WHELTON, A.; MAKUCH, R.; EISEN, G.; AGRAWAL, N.M.; STENSON, W.F.; BURR, A.M.; ZHAO, W.W.; KENT, J.D, LEFKOWITH, J.B., VERBUG, K.M.; GEIS, G.S. (2000). Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs

- nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. Celecoxib longterm Arthritis Safety Study. *JAMA* 284: 1247-1255.
- SILVERTHORN, D. U. (2003). Fisiologia Humana: Uma abordagem Integrada;. 20: 603-634.
- SMITH, L. A. & RIVERS, A. B. (1953). History. In, peptic ulcer: pain patterns diagnosis and medical treatment. Appleton-Century-Crofts, New York, p.1-10.
- SONE, Y.; KUMADA, T.; TOYODA, H.; YOKOYAMA, M.; KATO, M.; ASAKA, M. (2008). Eradicating *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease reduces medical costs in the community. *Helicobacter* 13: 346-351.
- SONNENBERG, A.; EVERHART, J.E. (1997). Health impact of peptic ulcer in the United States, *Am. J Gastroenterology*, v.92, p. 614-620.
- STAINBACH, L.; THEIMER, E.T.; MITZNER, B.M. (1964). *Can. J. Chem.* 42, 959.
- STICHER, O. (1977). Plant mono-, di- and sesquiterpenoids with pharmacological or therapeutical activity. In: Wagner, H.; Wolff, P. (Eds), *New Natural Products and Plant Drugs with pharmacological, Biological or therapeutic activity. Springer-Verlag, Berlin*, pp. 137-176.
- SUN, F. P.; SONG, Y. G.; CHENG, W.; ZHAO, T.; YAO, Y. L. (2002). Gastrin, somatostatin, G and D cells of gastric ulcer in rats. *World J.Gastroenterol.*, v. 8, n. 2, p. 375-378.
- SZABO S, PIHAN G. (1987). Development and significance of cysteamine and propionitrile models of duodenal ulcer. *Chronobiol Int* 4: 31-42.
- SZABO, S. (1987). Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand. J. Gastroenterology*. 22(127): 21-28.
- TACHE´ Y., GARRICK, T. AND RAYBOULD, H. (1990). Central nervous system action of peptides to influence gastrointestinal motor function. *Gastroenterology* 98:517-528.
- TAKEUCHI, K.; MEGUMU, O.; HIROMICHI, M.; OKABE, S. (1988). Role of suphydryls in mucosa injury caused by ethanol. Relation to microvascular permeability, gastric motility a cytoprotection. *J Pharmacology. Exp. Ther.* v. 48 p. 836-839.
- TAKEUCHI, K.; KATO, S.; OGAWA, Y.; KANATSU, K.; UMEDA, M. (2001). Role of endogenous prostacyclin in gastric ulcerogenic and healing responses – a study using IP-receptor knockout mice. *Journal of Physiology*. v.95, p.75-80.

- TAKEUCHI K.; AIHARA E.; SASAKI, Y.; NOMURA Y.; ISE, F. (2006). Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced HCO₃⁻ secretion in stomach. *Jour. of Phys. and Pharm.* v. 57, pg. 661-676.
- TANI, S.; OKUDA, M.; MORISHIGE, R.; TANAKA, T. (1997). Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. *Biol.Pharm.Bull.*, v. 20, n. 5, p. 482-485.
- TARIQ, M.; ELFAKI, I.; KHAN, H. A.; ARSHADUDDIN, M.; SOBKI, S.; AL MOUTAERY, M. (2006). Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. *World Journal of Gastroenterology*, v. 12, n. 36, p. 5798-5804.
- TARNAWASKI, A.; BRZOZOWSKI, T.; SARFEH, I.J.; KRAUSE, W.J.; ULICH, T.R.; GERGELY, H.; HOLLANDER, D. (1988). Prostaglandin protection of human isolated gastric glands against indomethacin and ethanol injury. Evidence for direct cellular action of prostaglandin. *J. Clin Investt* 81: 1081-1089.
- TARNAWSKI A, HOLLANDER D, STACHURA J, et al. (1990). Vascular and microvascular changes- key factors in the development of acetic acid induced gastric ulcers in rats. *J Clin Gastroenterol*, v. 12(1), pg. S148-S157.
- TYTGAT, G. N.; RAUWS, E. A. (1986). Significance of *Campylobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1(1): 527S-539S.
- UCHIDA, M.; MATSUEDA, K; SHODA, R.; MURAOKA, A. & YAMATO, S. (2001). Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. *Jpn. J. Pharmacol.*, v. 85, p. 133-138.
- UEDA, S., YOSHIKAWA, T., TAKAHASHI, S., ICHIKAWA, H., YASUDA, M., OYAMADA, H., TANIGAWA, T., SUGINO, S., KONDO, M. (1989). Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 162, 55-58.
- VAKIL N. (2006). Helicobacter pylori treatment: a practical approach. *Am J Gastroenterol*; 101: 497-499.
- VERPOORTE , R.& MEMELINK , J. (2002). Engineering secondary metabolite in plants. *Cur. Opinion in Biotech.*, v.13, p.181-187.
- WANG, G., TANG, W., BIDIGARE, R.R. (2005). Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. In: ZHANG, L., DEMAIN, A.L. (Eds) Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine. *Humana Press, Totowa*, pp. 197-227.
- WANKS, A., HARKINSR, T., JR.. SHAPIRAH, DE WEERTHA, SLATTERYT. (1992). Purification, molecular cloning, and functional expression of the

- cholecystikinin receptor from rat pancreas. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 89,3125-3129.
- WATANABE, T.; CHIBA, T. (2002). [Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly]. *Nippon Rinsho*, v. 60, n. 8, p. 1515-1520.
- WALLACE, J.L.; McKNIGHT, G.W. (1993). Characterization of a simple animal model for nonsteroidal anti-inflammatory drug induced antral ulcer. *Can J. Physiol Pharmacol* 71: 447-452.
- WALLACE, J. L. and GRANGER D.N. (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *The FASEB Journal*. v.10, p.731-740.
- WALLACE, J. L. (2001). Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. v.15, p.691-703.
- WALLACE, J.L. & DEVCHAND, P.R. (2005). Emerging roles for COX-2 in gastrointestinal mucosal defense – Review. *British J of Pharmacology*, v.145, p. 275-282.
- WANG, Y.C., HUANG, T.L. (2005). Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Plumbago zeylanica* L. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43,407-412.
- WHITTLE, B.J. (2003). Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fudam. Clin. Pharmacol.* 17: 301-313.
- WOLFE, M.M., SOLL, A.H. (1988). The physiology of gastric acid secretion. *N. Engl. J. Med.* 319 (26): 1707-1715.
- YAMAJI N, YOKOO Y, IWASHITA T. (2007). Structural determination of two active compounds that bind to the muscarinic M-3 receptor in beer. *Alcohol Clin Exp Res*;31:S9-S14.
- YAO, X., FORTE, J.G. (2003). Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu. Ver.Physiol.* 65: 103-131.
- YIN, D.; YIN, D.; FU, Z.; LI, Q. J. (1999). *Mol Catal. A:Chem.* 148, 87.
- YUANG Y, PADOL IT, HUNT R. (2006). Peptic ulcer disease today. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.*; 2:80-9.
- ZAVROS Y, RIEDER G, FERGUSON A, SAMUELSON LC, MERCHANT JL (2002) Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. *Gastroenterology* 122, 119-133.
- ZIMEMERMAN BJ, GRANGER DN. (1994). Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: role in ischemia-reperfusion injury. *Hepatol Gastroenterol*; 41: 337-42.

ZOPPI CC, ANTUNES-NETO J, CASTANHO FO, GOULART FO, MOTTA E MOURA N, VAZ DE MACEDO D. (2003). Alteração em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev Paul Edu Fis*; 17: 119-130.



Anexo 1

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA GERAL

ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL

Os diferentes grupos de ratos (n=7) foram tratados, após 12 h de jejum, com o monoterpene β -mirceno nas 3 doses (3,75 mg/Kg; 7,5 mg/Kg e 11,25 mg/Kg), 100 mg/kg de cimetidina (controle positivo) ou veículo (controle negativo – Tween 80® a 8%), uma hora antes da indução das lesões gástricas pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto (MORIMOTO *et al.*, 1991). Após 1 h da indução, os animais foram mortos e os estômagos retirados para contagem e classificação das lesões, como descrito anteriormente.

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SUCO GÁSTRICO E DOSAGEM DE MUCO PELO MODELO DE LIGADURA DO PILORO

Foi adotado o modelo descrito por SHAY *et al.* (1945) com modificações onde os parâmetros do suco gástrico foram avaliados pelo efeito dos diferentes tratamentos administrados oral ou intraduodenalmente, no intuito de avaliar o efeito local ou sistêmico do β -mirceno. Após 24 horas de jejum os ratos foram anestesiados, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura de piloro. A administração das drogas foi realizada logo após a amarradura, por via intraduodenal ou oral. As incisões foram suturadas e quatro horas após a cirurgia os ratos foram mortos e a incisão reaberta. Logo em seguida, foi realizada uma ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) e o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01N em bureta digital (modelo EM, Alemanha). A concentração total de ácido foi expressa em mEq/mL/4h e o pH foi determinado em pHômetro modelo PA 200.

DETERMINAÇÃO DE MUCO ADERIDO À PAREDE GÁSTRICA.

Seguindo a metodologia descrita por RAFATULLAH *et al.*, (1990), após 24 horas de jejum, os grupos de ratos (n=8) sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal, logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura de piloro. A administração das doses do β -mirceno, carbenoxolona (200mg/kg)

e do veículo, todos em dose volume final de 10 ml/kg, foi realizada 1 hora antes da amarração do piloro. Após 4 horas, os animais foram mortos, a porção glandular do estômago separada, pesada e imersa em solução de Alcian Blue para o procedimento de quantificação do muco. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 598 nm. A leitura foi feita após realização de uma curva padrão com várias concentrações de Alcian blue. Os resultados foram expressos em μg de Alcian blue/ml/g de tecido.

DETERMINAÇÃO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

Grupos de ratos (n=6) submetidos a jejum por 24 horas foram divididos em grupos de acordo com os respectivos tratamentos. O grupo controle recebeu injeção intraperitoneal de solução salina e os demais tratamentos com L-NAME (inibidor da NO-sintase), pela mesma via (MATSUDA & YOSHIKAWA, 1999; MORIMOTO *et al.*, 1991). Após 30 min, os grupos receberam por via oral os respectivos tratamentos (Veículo, carbenoxolona na dose de 100 mg/Kg e β -mirceno na dose de 7,5 mg/kg). Após uma hora, os animais foram submetidos à administração oral com etanol (1ml/animal) e decorrido 1h do tratamento com o agente lesivo, os animais foram mortos, seus estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura, colocados em placas de vidro e escaneadas para posterior avaliação macroscópica das lesões.

DETERMINAÇÃO DO PAPEL DOS GRUPAMENTOS SULFIDRÍLICOS NA CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

Após 24 horas de jejum, grupos de ratos (n=6) foram submetidos ao tratamento onde o grupo controle recebeu uma injeção subcutânea de solução salina e os demais grupos experimentais, uma injeção de N-etilmaleimida (NEM) (10 mg/kg), um bloqueador dos grupos sulfidrílicos (MATSUDA & YOSHIKAWA, 1999; MORIMOTO *et al.*, 1991). Após 30 min, todos os grupos de animais receberam os respectivos tratamentos orais com o veículo, β -mirceno (7,5 mg/kg) ou carbenoxolona (controle positivo na dose de 100 mg/kg). Após uma hora, os animais foram submetidos à administração oral de 1 ml de etanol por animal e decorrido 1h da

administração do agente lesivo etanol, os animais foram mortos, seus estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura, colocados em placas de vidro e escaneadas para posterior avaliação macroscópica das lesões.

QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL DO TECIDO DE ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM NEM, UM BLOQUEADOR DOS GRUPAMENTOS SULFIDRÍLICOS

Neste experimento foram utilizados grupos de ratos com peso entre 130 – 200 g, submetidos a jejum de 12 h e com livre acesso a água. Os animais foram divididos ao acaso em grupos de pelo menos 7 animais/cada, tratados com uma injeção subcutânea de solução salina (controle negativo) ou 10 mg/kg de N-etilmaleimida, um bloqueador dos grupos sulfidrilas (MATSUDA *et al.*, 1999). Trinta min. após o pré-tratamento, os grupos receberam por via oral veículo, carbenoxolona (controle positivo – 100mg/Kg) ou o monoterpene β -mirceno (7,5 mg/Kg). Trinta minutos após o tratamento, todos os grupos de animais receberam uma administração oral de etanol absoluto; uma hora após a administração do etanol os animais foram mortos, seus estômagos removidos e abertos ao longo da grande curvatura para a coleta de amostras do tecido gástrico de cada grupo. Estas amostras foram armazenados a -80°C para a quantificação de glutathione total – GSH do tecido como descrito a seguir.

As tiras retiradas nos procedimentos experimentais mencionados anteriormente, foram pesadas e armazenadas em 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (TCA). O conteúdo de glutathione total do estômago foi determinado utilizando a substância 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) (ANDERSON *et al.*, 1985). A reação enzimática é constituída de 200 μ l da amostra contendo 2mg/ml de proteína, 0,2 M de tampão fosfato pH 8,0; 0,5mM DTNB (2mg em 10ml de citrato de sódio 1%) em um volume final de 2mL. A absorvância foi determinada em 412 nm utilizando um espectrofotômetro. A concentração de glutathione total foi expressa utilizando o coeficiente de extinção de 13,6 mM.

DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL

Seguindo a metodologia de BAGGIO (2003), camundongos Swiss (n=7), em jejum de 6h foram divididos em grupos, que receberam seus respectivos tratamentos orais: veículo (controle negativo), atropina 5 mg/kg (i.p., controle positivo) e β -mirceno (7,5 mg/kg). Após trinta min., todos os animais receberam carvão ativado 10% (p.o.) em volume de 10 ml/kg. Meia hora após a administração do carvão, todos os animais foram mortos. O passo seguinte foi a remoção de todo intestino delgado juntamente com o estômago, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado, para a obtenção da relação entre a distância percorrida e comprimento total do intestino. Os dados obtidos dessa relação foram corrigidos em arcoseno para posterior análise estatística.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão médio (e.p.m) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste a posterior de Dunnett ou de Tukey, com nível de significância mínimo de $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

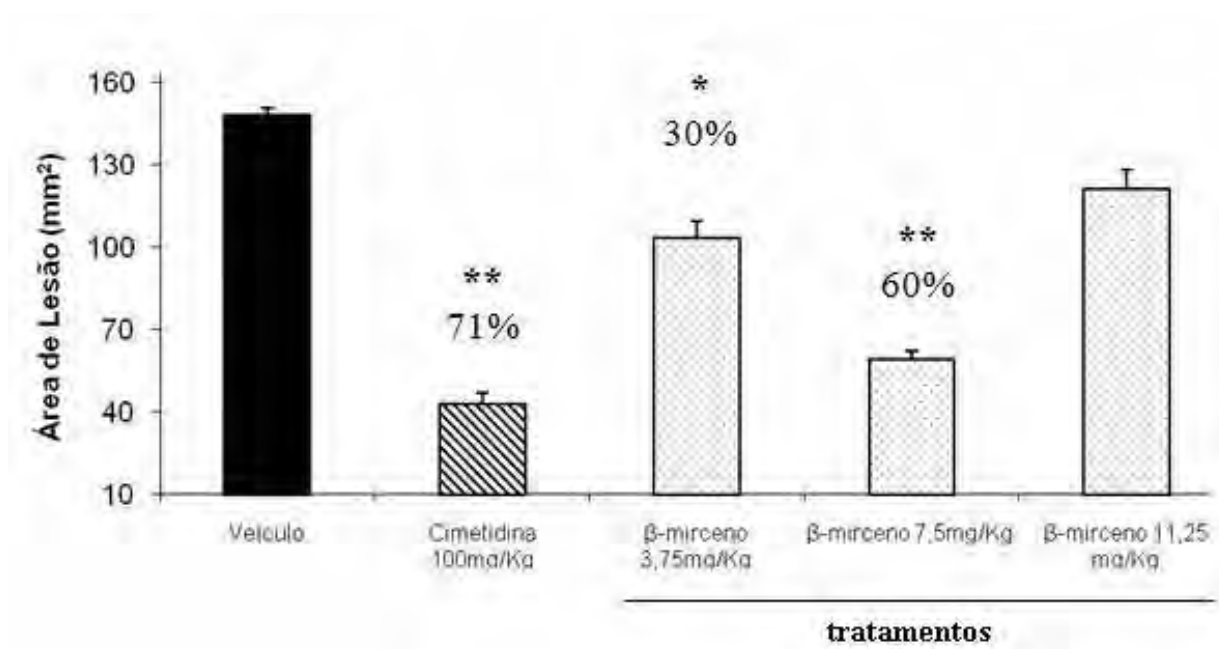
A mucosa gástrica está sujeita a contínuas mudanças de agentes agressores endógenos e exógenos. Para combater esse ataque, a mucosa possui mecanismos de defesa que protegem o tecido de danos e eventuais ulcerações (WHITTLE, 2003).

A administração tópica do etanol absoluto causa edema no tecido, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias que podem contribuir para indução dos danos na mucosa e geração de espécies reativas de oxigênio (KOUNTOURAS *et al.*, 2001). As úlceras aparecem devido à sua ação necrotizante na mucosa gástrica, com menor participação da secreção gástrica (LEWIS e HANSON, 1991; EVANS, 1996). A menor participação da secreção gástrica é devido ao desaparecimento do ácido no lumen gástrico (KIVILAAKSO *et al.*, 1978) que

tem sido atribuído a uma retro-difusão do ácido direto na barreira gástrica rompida (DAVENPORT, 1972). Esse ácido no lumen gástrico é um dos muitos fatores que levam ao rompimento celular (JACOBSON, 1992).

Na **Figura 1** estão demonstrados valores de % de inibição das lesões gástricas dos animais tratados com 3 doses diferentes (curva dose-efeito) do monoterpene β -mirceno frente a lesões gástricas induzidas por um agente lesivo de máxima severidade que é o etanol absoluto administrado na mucosa gástrica de ratos. A partir desses resultados, é inegável a grande ação protetora da mucosa gástrica que este monoterpene exerce. Esse resultado é muito promissor, pois com uma dose de 3,75 mg/Kg, foi possível constatar uma proteção gástrica de 30% ($p < 0,05$) quando comparado com a droga-padrão cimetidina (71% - $p < 0,01$) na dose de 100 mg/Kg. No entanto, a máxima proteção foi alcançada com a dose de 7,5 mg/kg (60% - $p < 0,01$) ou seja, uma proteção equivalente em dose 13 vezes menor do que a cimetidina.

Figura 1) Curva dose-efeito do β -mirceno em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto



Efeito gastroprotetor do monoterpene β -mirceno no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, ** $p < 0,01$, comparados ao veículo ($n=7$)

Após a constatação da ação do β -mirceno como aquela capaz de proteger a mucosa gástrica, frente a um dos indutores mais severos de lesão, avaliou-se os mecanismos de ação que podem estar envolvidos na proteção da mucosa gástrica. Assim, passou-se a investigar de que forma este monoterpene estaria interferindo sobre a secreção ácida gástrica, já que este efeito (redução da secreção ácida) poderia também ser responsável pela proteção gástrica, visto que os protetores do estômago mais prescritos na terapia da úlcera/gastrite são os bloqueadores de receptores H_2 e inibidores de bomba de prótons, e ambos drogas que atuam diminuindo a acidez gástrica.

A secreção ácida gástrica é finamente regulada por vias interdependentes que incluem o sistema nervoso central, o sistema nervoso entérico e uma intrincada rede de células neuroendócrinas e imunes, que atuam na modulação parácrina e hormonal (SCHUBERT, 2004). A interação da histamina, gastrina e acetilcolina com seus receptores nas células parietais são os principais responsáveis pela ativação da bomba de prótons, enzima secretora de H^+ que confere o pH ácido ao suco gástrico. Assim, uma ação inibidora do β -mirceno em qualquer nível da estimulação da secreção ácida, poderia estar levando a proteção gástrica por diminuir os fatores agressores da mucosa.

As úlceras induzidas por ligadura de piloro são formadas devido a auto-digestão da mucosa gástrica e ao colapso da barreira dessa mucosa provavelmente devido à produção excessiva e acumulação de HCl no estômago (SAIRAM *et al.*, 2003). O aumento da acidez gástrica é considerado um fator que contribui na patogênese da úlcera gástrica (GOA & MONK, 1987; TARIQ *et al.*, 2007). Além disso, a migração de neutrófilos na mucosa após a ligadura do piloro poderia estar envolvida no dano causado à mucosa do estômago possivelmente por liberar radicais livres que causam peroxidação lipídica e danos para a membrana da célula (RASTOGI *et al.*, 1998).

Acredita-se que esta hipersecreção ácida seja estimulada por reflexo vago-vagal, em decorrência da distensão gástrica provocada pelo aumento do volume gástrico devido à obstrução do piloro. Este procedimento estimula a

secreção do hormônio gastrina, cuja função no trato gástrico é estimular as células parietais a secretar em HCl (BAGGIO *et al.*, 2003).

Figura 2) Efeito do β -mirceno em ratos submetidos à ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.

Via	Tratamentos	Dose (mg/kg)	Volume suco gástrico (mL/4h)	Concentração de Hidrogênio [H] ⁺ (mEq/L)
Oral	Veículo	-	6,43±0,52	13,33 ± 1,23
	Cimetidina	100	5,0±0,49	0,63 ± 0,07**
	β -mirceno	7,5	6,5±0,43	9,11 ± 0,96**
Intraduodenal	Veículo	-	7,6 ± 0,60	19,20 ± 1,24
	Cimetidina	100	7,0 ± 0,45	3,20 ± 0,20**
	β -mirceno	7,5	6,4 ± 0,51	6,40 ± 0,24**

Valores expressos em média ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** p<0,01 (n=7).

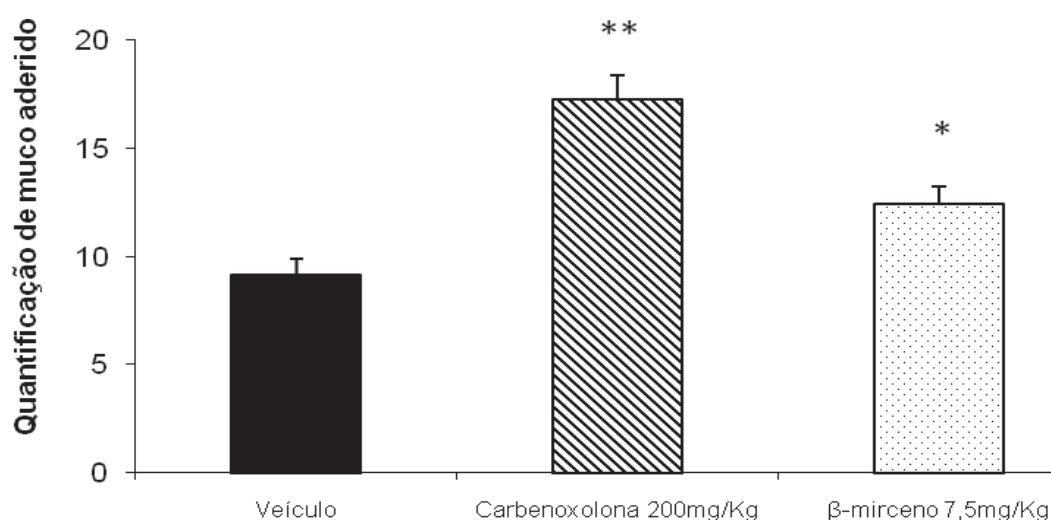
O β -mirceno na dose de 7,5 mg/kg diminuiu significativamente a concentração hidrogeniônica do suco gástrico (p<0,01) tanto no tratamento oral quanto no tratamento intraduodenal (**figura 2**). Foi possível observar que os animais tratados com o β -mirceno (7,5 mg/kg), administrados local ou sistemicamente, diminuem a secreção H⁺ na mucosa gástrica sem alterar o volume do suco gástrico. Portanto, a administração desse monoterpene promove relevante ação antissecretória e com uma dose 13 vezes menor que a cimetidina.

O muco contribui para a defesa da mucosa por promover uma barreira física contra bactérias; age como lubrificante reduzindo os efeitos abrasivos na mucosa, além de participar na proteção contra danos causados por ácidos e toxinas no lúmen (WALLACE *et al.*, 2000; NAM *et al.*, 2005; WALLACE, 2007). Sua forma viscosa, elástica, aderente, como um gel transparente, que contém 95% de água e 5% de glicoproteína, recobre toda a superfície da mucosa gastrointestinal sendo capaz de agir como antioxidante

e reduz danos da mucosa promovidos por radicais livres (REPETTO *et al.*, 2002).

Por meio da quantificação de muco aderido à mucosa gástrica de animais submetidos aos diferentes tratamentos (**Figura 3**) foi possível observar que os animais tratados com β -mirceno foram capazes de aumentar significativamente a quantidade de muco gástrico secretado no estômago quando comparado ao veículo e com o controle positivo, a carbenoxolona, a qual estimula a produção de muco no estômago, confirmando assim a surpreendente atividade gastroprotetora desse monoterpene com uma dose tão baixa em relação ao controle positivo (27 vezes menor que a carbenoxolona).

Figura 3) Determinação de muco aderido à mucosa gástrica



ANOVA: Muco aderido expresso em mg de Alcian Blue/ g de tecido. Teste de Dunnet

**p<0,05.

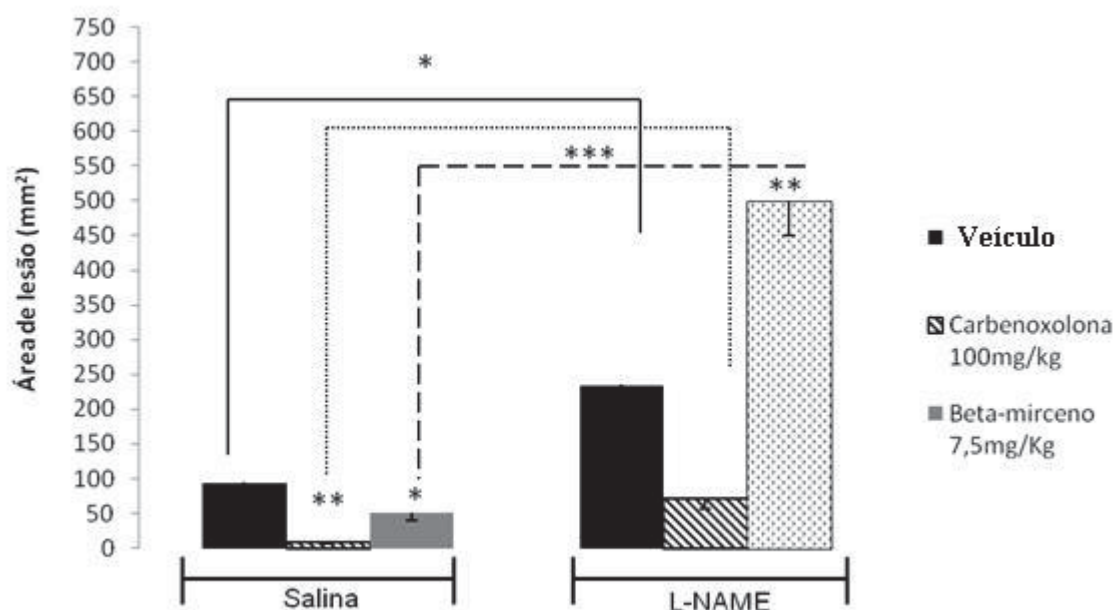
O próximo passo foi investigar a participação do óxido nítrico (NO) e dos grupamentos sulfidrílicos (SHs) da gastroproteção do β -mirceno. Estes dois compostos são outros importantes mecanismos de defesa da mucosa gástrica.

Estudos realizados por CHO (2001) e ANCHA *et al.*, (2003) indicam o envolvimento de NO na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera pois o NO promove vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também existem relatos de seu envolvimento como agente antiinflamatório nos tecidos. De acordo com WALLACE & MILLER (2000), o NO é também um importante regulador da secreção de muco no estômago e seus efeitos são produzidos pela estimulação da guanilato ciclase nas células epiteliais. Assim, NO parece ser produzido na célula epitelial em resposta à ativação de receptores colinérgicos e provoca a liberação de muco para essas células, garantindo assim, a integridade da mucosa.

O NO é responsável tanto pela mediação das funções teciduais normais, quanto pelas lesões na mucosa gástrica. O NO, portanto, é um mediador das defesas e do reparo na mucosa gastrointestinal, porém NO também pode contribuir com as injúrias teciduais em algumas doenças do trato digestório e alterar a motilidade gástrica (WALLACE, 1999; CHO, 2001), além de promover ou iniciar respostas inflamatórias quando combinado com outras espécies reativas de oxigênio (CHO, 2001).

No modelo experimental em que foi avaliado o papel de NO como fator protetor ativado pelo β -mirceno, foi utilizado o inibidor de NO (L-NAME). O pré-tratamento com o inibidor L-NAME reverteu significativamente a gastroproteção exercida pelo β -mirceno, demonstrando dessa forma, que existe um grande envolvimento desta via no mecanismo de ação gastroprotetora desse monoterpene como demonstrado na **figura 4**.

Figura 4) Efeito do β -mirceno frente ao inibidor de NO (L-NAME) em modelo de úlcera induzida por Etanol em ratos.



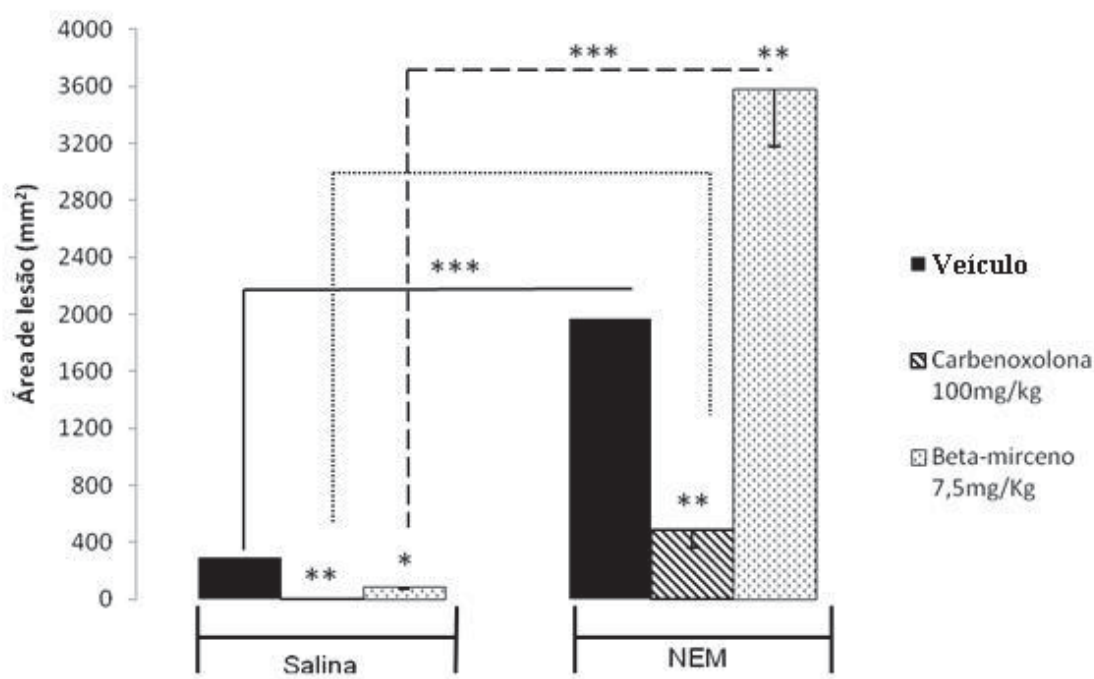
Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e as diferenças significativas (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina + tratamento e L-NAME + tratamento).

Outro fator que contribui para a integridade da mucosa gástrica é a formação de compostos SH que tem como finalidade básica o fortalecimento das pontes de dissulfeto e redução da formação de radicais livres derivados de oxigênio, relacionando-se com a proteção celular (KONTUREK *et al.*, 1990; MATSUDA, 1999).

Os efeitos gastroprotetores dos compostos SH incluem também processos redutores e de proteção celular frente ao estresse oxidativo induzidos por diversos agentes e circunstâncias, como aqueles que ocorrem com as exposições tóxicas como o próprio etanol na mucosa gástrica (TAKEUCHI *et al.*, 1988, KONTUREK *et al.*, 1990). Em contrapartida, a redução dos níveis normais de SH tem impacto significativo na mucosa, tornando-a susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa e dessa forma, facilitando a formação de lesões gástricas (GLAVIN & SZABO, 1992; KO & CHO, 1995).

A administração do inibidor de formação dos compostos sulfidrílicos endógenas (NEM - N-etilmaleimida) para os grupos tratados, provocou um aumento expressivo das lesões gástricas induzidas pelo etanol (**figura 5**). Porém, o aumento significativo das lesões dos animais pré-tratados com o bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos e tratados com o β -mirceno, evidenciou a importância deste fator na gastroproteção deste monoterpene indicando, portanto, a forte participação deste componente no seu mecanismo de ação antiulcerogênico.

Figura 5) Efeito do β -mirceno frente depletor de sulfidril endógena (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol em ratos.



Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e as diferenças significantes (***) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina + tratamento e NEM + tratamento).

A glutathione total é um componente antioxidante endógeno e sua propriedade antioxidante está relacionada com a presença do grupo tiol em sua estrutura. A glutathione reage com peróxidos e radicais de oxigênio tóxicos para proteger células contra danos e também mantém grupamentos

SH de proteína em sua forma reduzida, protegendo da oxidação (WALKER *et al.*, 1995). O tratamento agudo com etanol induz ao estresse oxidativo, dano no DNA, queda da atividade da xantina oxidase e dos níveis de malondialdeído e diminuição do conteúdo de glutathione total em células da mucosa gástrica (MAROTTA *et al.*, 1999). Quando a defesa do sistema antioxidante é insuficiente, radicais livres são acumulados causando injúrias na membrana celular, danos oxidativos e morte celular se o dano for contínuo (REPPETO & LLESUY, 2002).

Ao quantificar a glutathione total (GSH) no tecido dos animais submetidos ao modelo de indução de úlceras por NEM, um inibidor da síntese de SHs, os resultados foram surpreendentes levando em consideração a baixa dose do β -mirceno (**figura 6**). A prévia administração do bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos, além de reverter o efeito gastroprotetor conferido ao monoterpeno, diminuiu os níveis de glutathione total dos tecidos quando comparado aos animais previamente tratados com o β -mirceno. Os níveis de glutathione total se mostraram visivelmente aumentados para o monoterpeno em relação ao veículo e também mais altos em relação ao encontrado com o lansoprazol (controle positivo), com níveis de glutathione total semelhantes ao Sham (animais que não receberam qualquer agente lesivo). Este resultado é um indicativo de uma possível atividade antioxidante deste monoterpeno, sendo que sua atividade gastroprotetora possa ser proporcionada pelo aumento dos níveis de glutathione total no tecido.

Figura 6) Quantificação de Glutathiona total na mucosa gástrica de animais submetidos a etanol

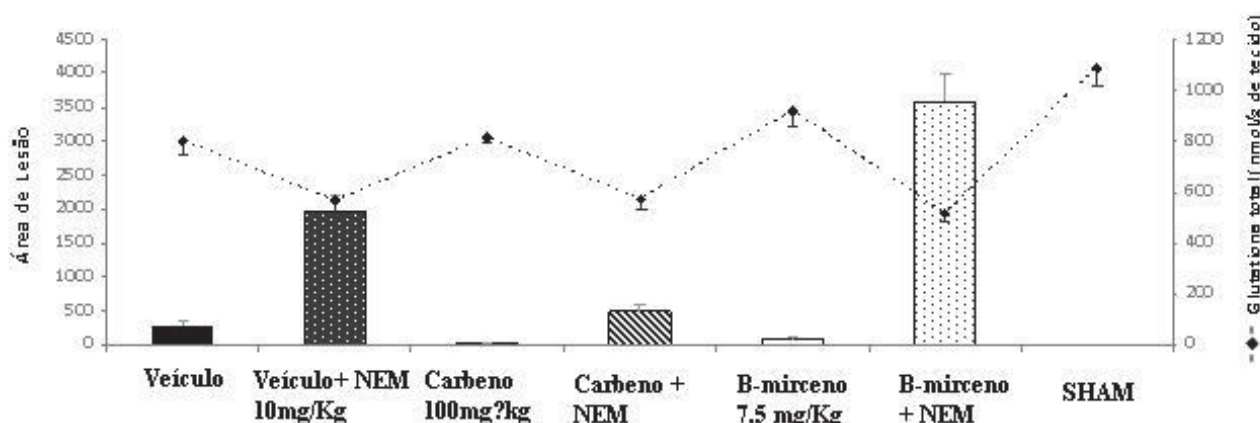


Figura 7) As diferenças observadas foram em relação ao grupo controle (veículo); +p<0.05; ++p,0.01. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e NEM+tratamento); *p<0.05, ***p<0.001. Teste de Dunnett.

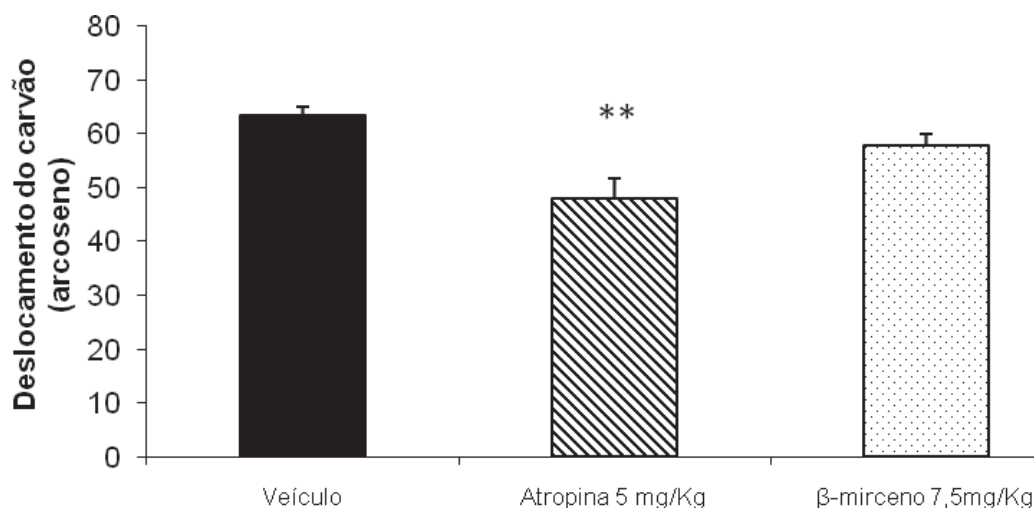
Outro resultado importante conseguido com o β -mirceno, foi com análises sobre a motilidade intestinal.

A motilidade intestinal está relacionada com a velocidade de esvaziamento gástrico em contínuo estado de contração, relaxamento e secreção. Essas funções são controladas pelo sistema neuromotor, que é regulado por vários sistemas de receptor, entre eles o opioidérgico, bem como o colinérgico, adrenérgico e serotoninérgico (KANUM, 2000). Várias drogas afetam o trânsito gastrointestinal pela ação de agonistas ou antagonistas no receptor celular específico (GHOSH, 2005). A atropina, antagonista de receptor muscarínico, tem ação sobre a região antral do estômago, podendo assim reduzir a contratilidade e o esvaziamento gástrico (PARKMAN *et al.*, 1999), além de ser usada freqüentemente como uma ferramenta para identificação de mecanismos envolvendo a via colinérgica (GHOSH, 2005). No experimento de determinação da ação do monoterpeno β -mirceno sobre a motilidade, não foi observada alteração dos padrões normais de motilidade.

Na **Figura 7** foram apresentados os dados de trânsito intestinal dos animais previamente tratados com β -mirceno. Os resultados indicam que não houve interferência do monoterpeno na motilidade intestinal ($p>0.05$) quando comparado com o grupo controle negativo tratado com o veículo.

Somente os animais tratados com atropina reduziram de modo significativo o trânsito intestinal.

Figura 7) Avaliação da motilidade gástrica do β -mirceno no modelo de carvão ativado



Teste de Dunnett. ** $p<0.01$. As barras transversais representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média.

À partir de todos estes dados levantados, podemos concluir que o β -mirceno é um interessante adjuvante gastroprotetor, pois ele é capaz de exercer ação gastroprotetora frente ao etanol absoluto, um poderoso agente indutor de úlceras gástricas. Aliado à isso, a atividade gastroprotetora deste monoterpene é totalmente dependente de NO e dos compostos sulfidrílicos, mantendo alto os níveis de glutathione total na mucosa, sendo um indicativo de uma possível atividade antioxidante deste monoterpene. Além disso, o β -mirceno é capaz de diminuir a secreção de H^+ na mucosa gástrica, conferindo-lhe a importantíssima atividade antissecreatória.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M. (1985). Determination of glutathione disulfide in biological samples, *Methods Enzymmol.*, v. 113, p.548-555.
- ANCHÁ, H.; OJEAS, H.; TEDESCO, D.; *et al.* (2003). Somatostatin-induced gastric against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. *Regulatory Peptides*, v. 110, p.107-113.
- BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L.; *et al.* (2003). Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. *Pharmacological Research*, v 47, p 93-8.
- CHO, C. H. (2001). Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *J. Physiology*, p. 253-256.
- CURTIS, G.H.; MACNAUGHTON, W.K.; GALL, D.G.; WALLACE, J.L. (1995). Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73: 130-134.
- DAVENPORT, H. (1972). The gastric mucosal barrier. *Digestion*. 5: 162-165.
- EVANS, F. (1996). The gastro-intestinal Tract. Selection, *Preparation and Pharmacological Evaluation of plant Material*. 25-45.
- GLAVIN G.; SZABO S. (1992). Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. *Faseb J.* v. 6, p. 825-831.
- GOA, K.L.; MONK, J.P. (1987). Emprostil: a preliminary review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. *Drugs*; 3: 539-559.
- GOSH, M.N. *Quantitative study of anyagnoists on isolated preparations*. Ed. *Fundamentals of experimental pharmacology*, 3^a Ed., p. 121-133, 2005.
- HAWKEY C.J.; KARRASCH, J.A.; SZCZEPAŃSKI, L.; WALKER, D.G.; BARKUN, A.; SWANNELL, A.J.; YEOMANS, N.D. (1998). Omeprazole compared with misoprostol for ulcers associated with nosteroidal antiinflammatory drugs. Omeprazole versus misoprostol for NSAID-induced ulcer management (OMNIUM) study group. *N Engl J Med* 338: 727-734.
- HAWKEY, C. J. (2000) Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 119: 521-535.
- HAWKEY, C.J., RAMPTON, D.S. (1985). Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology* 89: 1162-1188.

- HIRAISHI, H.; SHIMADA, T.; IVEY, K.J; *ET AL.* (1999). Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. *J Pharmacology Exp Ther.*, v. 289, p. 103-109.
- JACOBSON, E. (1992). Circulatory mechanism of gastric mucosal damage and protection. *Gastroenterol.* 102: 1778-1800.
- KANUM, M.A. Why the enteric nervous system is important to clinicians. *Gut*, v. 47, Suppl4: iv8-iv10, 2000.
- KIVILAAKSO, E., FROM, D., SILEN, W. (1978). Relationship between ulceration and intramural pH on gastric mucosa during haemorrhagic shock. *Surgery.* 84: 70-78.
- KNAPP, H.R.; OELZ, O.; SWEETMAN, B.J.; OATES, J.A. (1978). Synthesis and metabolism of prostaglandins E₂, F₂α and D₂ by the rat gastrointestinal tract. Stimulation by a hypertonic environment in vitro. *Prostaglandins* 15:751-757.
- KONTUREK, P. K ; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; DEMBINSKI, A. (1990). Role of epidermal growth factor, prostaglandin and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. *Gastroenterology.* v. 99, p. 1607-1615.
- KO, J. K. S.; CHO, C. H. (1995). The role of non-protein sulfhydryl compound in gastric adaptive cytoprotections against ethanol-induced mucosal damage in rats. *Inflamm. Res.* v. 44, p242-244.
- KOUNTOURAS, J., CHATZOPOULOS, D., ZAVOS, C. (2001). Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. *Hepatogastroenterology.* 48: 743-751.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWASKI, A. (2008). Reviews in basic and clinical gastroenterology. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, 135: 135-141.
- LEWIS, D.A., HANSON, P.J. (1991). Anti-ulcer drugs of plant origin In: G. P. Ellis; G. B. West. *Progress Medicinal Chemistry.* Amsterdam: *Elsevier Science Publishers*, 28: 201-231.
- MAROTTA, F.; TAJIRI, H.; SAFRAN, P.; *et al.* (1999). Ethanol related gastric mucosal damage: evidence of a free radical-mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. *Digestion*, v. 60, p. 538-543.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. (1999). Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. *Life Sciences*, 65, 27-32.
- MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F.C.; SANTOS, R.C.; ROCHA, L.R.M.; MARQUES, M.O.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. (2009). Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric

mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion *Chemico-Biological Interactions* 180 499–505.

- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. (1991). Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. *Jap. J. Pharmacol.* 57: 495-505.
- NAM, S.Y.; KIM, N.; LEE, C.S.; CHOI, K.D.; LEE, H.S.; JUNG, H.C.; SONG, I.S. (2005). Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(11), 2110-2120.
- PARKMAN, H. P.; TRATE, D. M.; KNIGHT L. C.; *et al.* (1999). Cholinergic effects on human gastric motility. *Gut.* v. 45, p. 346-354.
- PESKAR, B.M., GUNTER B.; PESKAR B.A. (1980). Prostaglandins and prostaglandin metabolites in human gastric juice. *Prostaglandins* 20:419-427.
- RAFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M.A.; MOSSA, J.S. AGEEL, A.M. (1990). *Evaluation of tumeric (Curcuma longa) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats.* *J. Ethnopharmacology*, 29: 25-34.
- RASTOGI, L., PATNAIK, G. K., DIKSHIT, M. (1998). Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacological Research.* 38 (2), 125-132.
- REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 35, n. 5, p. 523-534.
- SAIRAM, K., PRIYAMBDA, S., ARYYA, N.C., GOEL, R.K. (2003). Gastroduodenal ulcer protective activity of *Asparagus racemosus*: na experimental, biochemical and histological study. *Journal of Ethnopharmacology* 86, 1-10.
- SCHUBERT, M. L. (2004). Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology.* v.20, p.519-525.
- SHAY, H. (1945). A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. *Gastroenterol.* 5: 43-61.
- SONTAG, S.J.; SCHNELL, T.G.; BUDIMAN-MAK, E.; ADELMAN, K.; FLEISCHMANN, R.; COHEN, S.; ROTH, S.H.; IPE D, SCHWARTZ K.E. (1994). Healing of NSAID-induced gastric ulcers with a synthetic prostaglandin analog (enprostil). *Am J Gastroenterol* 89: 1014-1020.
- STOCKS, P., AND DAVIES, R. 1. Investigation of a localised high incidence of gastric cancer. *Publ. Hlth. (Lond.)*, 74, 404-412, (1960).

- TAKEUCHI, K.; MEGUMU, O.; HIROMICHI, M.; OKABE, S. (1988). Role of suphydryls in mucosa injury caused by ethanol. Relation to microvascular permeability, gastric motility a cytoprotection. *J Pharmacology. Exp. Ther.* v. 48 p. 836-839.
- TARIQ, M.; KHAN, H.A.; ELFAKI, I.; ARSHADUDDIN, M.; MOUTAERY, M.; RAYES, H.; SWAILAM, R. (2007). Gastric antisecretory and antiulcer effects of simvastatin in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 22:2316-2323.
- VON EULER, U.S. (1936). On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J. Physiol.* 88:213-234.
- WALKER, M.W.; KINTER, M.T.; ROBERTS, R.J.; *et al.* (1995). Nitric oxide-induced cytotoxicity: involvement of cellular resistance to oxidative stress and the role of glutathione in protection. *Pediatr Res.*, v.37, p. 41-49.
- WALLACE, J. L. (1999). Mechanisms of protection a heaking: current knowledge and future research *Amer. J. Med.* v. 110, p. 19S-23S.
- WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. (2000). Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*, v. 119, n. 2, p. 512-520.
- WALLACE, J.L. (2007). Building a better aspirin: gaseous solutions to a century-old problem. *British Journal of Pharmacology*, 152(4), 421-428.
- WHITTLE, B.J. (2003). Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fudam. Clin. Pharmacol.* 17: 301-313.



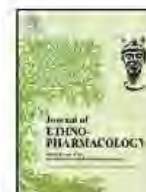
Anexo 2



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



Ethnopharmacological communication

Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection

Renata de Camargo Gomes^a, Flávia Bonamin^a, Denise Delabio Darin^b, Leonardo Noboru Seito^c, Luiz Claudio Di Stasi^c, Anne Ligia Dokkedal^b, Wagner Vilegas^d, Alba Regina Monteiro Souza Brito^e, Clélia Akiko Hiruma-Lima^{a,*}

^a Physiology Department, São Paulo State University-UNESP, c.p. 510, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

^b Biology Department, São Paulo State University-UNESP, c.p. 473, 17033-360 Bauru, SP, Brazil

^c Laboratory of Phytomedicine, Pharmacology Department, São Paulo State University-UNESP, c.p. 510, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

^d Organic Chemistry Department, São Paulo State University-UNESP, c.p. 355, 14800-900 UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^e Physiology and Biophysics Department, Campinas State University-UNICAMP, c.p. 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2008

Received in revised form

12 November 2008

Accepted 16 November 2008

Available online 24 November 2008

Keywords:

Vochysia tucanorum

Vochysiaceae

Gastric ulcer

Triterpenoids

ABSTRACT

Aim of the study: *Vochysia tucanorum* is an important medicinal plant used in the Cerrado of Brazil against gastric disorders and this study reveals the pharmacological action of this traditional medicine use.

Materials and methods: The methanolic extract (E-MeOH) and buthanolic fraction (Fr-Bu) obtained from *V. tucanorum* were challenged by different necrotizing agents in rodents. NO-synthase inhibitor (L-NAME) and SH blocker (NEM) were used to evaluate the participation of cytoprotective factors in E-MeOH and Fr-Bu gastroprotection. Antilulcerogenic action of *V. tucanorum* was evaluated in rats and mice at doses 250, 500 or 1000 mg/kg (E-MeOH) and 37.5, 75 or 150 mg/kg (Fr-Bu).

Results: Both E-MeOH and Fr-Bu present elevated gastroprotective action in all *in vivo* experimental models, without signs of acute toxicity. The mechanisms involved in the gastroprotective action of E-MeOH and Fr-Bu are related to the antioxidant activity and protection to gastric mucosa NO levels. Phytochemical investigations of Fr-Bu identified different pentacyclic triterpenoids such as betulinic acid, erythrodiol, epi-betulinic acid and mixtures of ursolic acid and oleanolic acid derivatives as the major constituents. The presence of such triterpenoids in Fr-Bu is probably related to the potent gastroprotective action of this medicinal plant species.

Conclusion: Effectiveness in gastroprotection and the absence of acute toxicity indicate this species as a promising herbal drug that is in accordance with ethnopharmacological use against gastric disorders.

Published by Elsevier Ireland Ltd

1. Use in traditional medicine

Vochysia tucanorum (Vochysiaceae) is called "pau-tucano" or "pau-doce" and several species of the genus are used by traditional communities in South America to relieve ailments linked to inflammation such as skin sores, asthma or pulmonary congestion (Schultes and Raffauf, 1990). *V. tucanorum* is a Cerrado medicinal species commonly used as tea from leaves and barks to gastric pain and to clarify wounds (Guarim Neto and Moraes, 2003). The genus *Vochysia* seems to be an abundant source of polyphenols and triterpenes (Zucaro et al., 2000), but the absence of phytochemical and pharmacological/toxicological studies with *V. tucanorum* led us to investigate its safety, effectiveness in gastroprotection and the

possible mechanisms and compounds related to gastroprotective activity.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All experiments were performed on male Swiss mice (25–40 g) or male Wistar rats (150–250 g) obtained from the UNESP Animal House, Botucatu, SP, Brazil. Experimental protocols meet the "Guidelines of Animal Experimentation" approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the Institute of Biosciences, UNESP.

2.2. Plant material, extracts and fractionation

V. tucanorum Mart. was collected in March/2004, in the Campus of the São Paulo State University (UNESP), Bauru-SP, Brazil, and

* Corresponding author. Tel.: +55 1438116077; fax: +55 1438153744.
E-mail address: hiruma@ibb.unesp.br (C.A. Hiruma-Lima).

was identified by Dr. A.L. Dokkedal. Voucher specimens have been deposited at the Herbarium of the UNBA/UNESP, Bauru-SP, under the number ALD 146. Air-dried and pulverized leaves (1.0 kg) were exhaustively extracted at room temperature with chloroform and the same plant material was further subjected to methanol extraction. The solvent was evaporated under vacuum and the yields (w/w) of the chloroform (E-CHCl₃) and the methanol (E-MeOH) extracts were respectively 2.78% and 3.67%. Further phytochemical and pharmacological steps were only developed with the E-MeOH, which presented a higher yielding compared to the E-CHCl₃. A sample of 21 g of dried E-MeOH was re-suspended in water and partitioned with equal volume of butanol, resulting in 6 g of butanol fraction (Fr-Bu) after solvent elimination. Thereafter the Fr-Bu was fractionated by droplet counter-current chromatography for compounds determination. The fractions were analyzed by TLC on silica gel 60 (Merck) using CHCl₃:MeOH (9:1 and 8:2) as mobile phase, sprayed with anisaldehyde reagent and visualized under UV light (254–363 nm). They were screened and grouped and the presence of terpenoids was detected. Repeated chromatography of fraction mixtures yielded betulinic acid, epi-betulinic acid, mixture of oleanolic and ursolic acid derivatives and erythrodil, which were characterized by 1D and 2D NMR experiments at 500 MHz and compared to those in literature (Mahato and Kundu, 1994).

2.3. Acute toxicity studies

Acute toxicity studies were performed on male Swiss mice as described by Souza Brito (1994). The control and treated groups consisted of 10 animals each. The treated group received E-MeOH at a single oral dose of 5000 mg/kg and the control group received saline (10 mL/kg). The animals were observed carefully at 30, 60, 120, 240 and 360 min after the treatment based on Hippocratic screening (Souza Brito, 1994). The mortality, body weight, and behavioral observations were recorded daily for 14 days after the treatment. Possible macroscopic alterations and the weight of vital organs (liver, kidney, heart, spleen and lung) of the treated group were compared with those of control group.

2.4. Gastroprotective effect against different ulcerogenic agents

HCl/EtOH (Mizui and Douteuchi, 1983)—Mice were divided into five groups ($n = 5$ – 6), which were fasted for 24 h prior to oral administration of saline (10 mL/kg), lansoprazole (30 mg/kg) or E-MeOH (250, 500 and 1000 mg/kg). Fifty minutes after the treatments, all animals orally received 0.2 mL of a 0.3 M HCl/60% EtOH solution. Animals were killed by CO₂ gas 1 h after the administration of HCl/EtOH solution. The stomachs were removed, opened along the greater curvature and fixed between 2 glass plates. The ulcerative lesion index (U.L.I.) was calculated according to the methodology described by Szelenyi and Thieme (1978). **Non-steroidal anti-inflammatory drug (Puscas et al., 1997)**—Mice ($n = 5$) were orally treated with E-MeOH from *V. tucanorum* (250, 500 and 1000 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg) or saline 30 min before the administration of the ulcerogenic agent piroxicam (30 mg/kg s.c.). The animals were killed by CO₂ gas 4 h after treatment with piroxicam. The stomachs were removed and ulcerative index was calculated as previously described. **Absolute Ethanol (Morimoto et al., 1991)**—After 24 h of fasting, eight groups of rats ($n = 6$) received oral administration of E-MeOH (250, 500 and 1000 mg/kg), Fr-Bu (37.5, 75 and 150 mg/kg), carbenoxolone (100 mg/kg) or saline (10 mL/kg). One hour after treatment, all rats received 1 mL of 99.5% ethanol to induce gastric damage. The animals were killed 1 h after treatment with the ulcerogenic agent and the stomachs were removed and opened along the greater curvature to determine the lesion index. **Intestinal Motility (Stickney and Northup, 1959)**—Mice were fasted for 12 h with free access to water. They were randomly divided

and placed in five cages with five animals per cage. Groups were orally treated with E-MeOH (250, 500 or 1000 mg/kg), atropine (5 mg/kg) or saline (10 mL/kg). After 30 min, each mouse received activated charcoal 10% (10 mL/kg, p.o.). All animals were killed 30 min thereafter by CO₂ gas and the small intestine rapidly dissected out; the distance traversed by the charcoal meal from the pylorus to the ileocaecal junction was measured and expressed as a percentage of the total distance between the two organs and the values were transformed to arcsine for statistical analyses. **Shay ulcer**—Male Swiss mice ($n = 8$) were randomly divided into three groups which were fasted for 24 h with free access to water prior to the experiment. Thirty min after oral administration of E-MeOH (250 mg/kg—the lowest anti-ulcer effective dose), cimetidine (100 mg/kg) or saline (10 mL/kg), pylorus ligation was performed as described by Shay (1945). Four hours later the animals were killed, the abdomen was opened and another ligature was placed around the esophagus close to the diaphragm. The stomachs were removed and the gastric juice volume and pH were recorded before the U.L.I. determination. The gastric contents were collected in graduated tubes and then centrifuged at 3000 $\times$ g for 10 min. The total acid content of gastric secretion was determined by titration to pH 7.0 with 0.01 N NaOH using a digital burette (E.M., Hirschmann Technicolor, Germany). Gastric lesions were evaluated by examining the inner gastric surface whereas the mucosal lesions were counted and scored as described above.

2.5. Gastroprotective mechanism of action

Determination of gastric secretion—All groups of mice ($n = 8$) were fasted for 24 h with free access to water. Immediately after pylorus ligation, E-MeOH (250 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg) or saline (10 mL/kg) was administered intraduodenally (Shay, 1945). The animals were killed 4 h later, the stomachs were removed and the gastric contents were collected to total amount of gastric secretion and pH values determination. Distilled water was added and the resultant solution was centrifuged at 3000 $\times$ g for 10 min. Total acid in the gastric secretion was determined in the supernatant volume by titration to pH 7.0 with 0.01 N NaOH. **Evaluation of NO and SH groups involvement in gastroprotection**. Rats were divided into groups of 5–6 animals and were fasted for 24 h. Prior to treatment with E-MeOH, Fr-Bu or reference drugs, animals were treated with 10 mg/kg (i.p.) of NEM (N-ethylmaleimide, Sigma, USA, an SH blocker), 70 mg/kg (i.p.) of L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester, Sigma, USA, an inhibitor of NO synthase) or saline. Thirty minutes thereafter the different groups received an oral dose of saline, carbenoxolone (100 mg/kg), E-MeOH (250 mg/kg) or Fr-Bu (37.5 mg/kg—the lowest effective dose in ethanol-induced gastric damage model). Sixty minutes after treatment, all animals received 1 mL of absolute ethanol (p.o.) for gastric-ulcer induction (Arrieta et al., 2003). Animals were killed 1 h thereafter and the stomachs were excised for gastric damage determination. **Antioxidant activity**—An *in vitro* antioxidant assay was performed with the Fr-Bu isolated from the *V. tucanorum* E-MeOH. Butanolic fraction was evaluated at the concentrations of 31.25, 62.50, 125, 250, 500 and 1000 μ g/mL for inhibition of lipid peroxidation in rat liver membrane enriched fraction F-2 as previously described by Gálvez et al. (1995). The flavonoid quercetin was used as the antioxidant reference compound in the same assay conditions.

2.6. Statistical analysis

The statistical analysis was aided by the program Instat®. The results are presented as mean $\pm$ S.E.M; Student's *t* test was employed to compare the 2 groups, whereas one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test or Tukey's test was

used for comparing 3 or more groups. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

3. Results and discussion

A single oral administration of 5000 mg/kg of *V. tucanorum* methanolic leaf extract (E-MeOH) did not produce any sign of acute toxicity in the animals. Along the following 14 days after the administration of E-MeOH, none animal died or significant changes in daily body weight and organs weight were observed until the end of this period (data not shown). Loomis and Hayes (1996) described the classification of some chemical agents in categories of toxicity. Accordingly, they stated as practically nontoxic-substances those tested until dose of 5000 mg/kg without significant signs of toxicity. These data allowed the continuation of further pharmacological studies with this medicinal plant.

Considering the interference of the intestinal traffic in studies with the gastrointestinal tract, we evaluated the effect of the E-MeOH in the intestinal motility. The velocity of intestinal traffic is one of the factors that affects the luminal absorption, induces peptic ulcer and probably regulates the bioavailability of the orally administered drugs (Lee et al., 2000). We found that all tested doses of the E-MeOH were not able to change the intestinal transport (data not shown).

Taking into account the dosage employed in anti-ulcer therapeutics, Souza Brito (1996) considered that a dose of 1000 mg/kg of crude extract presupposes the presence of the active principle at concentrations of 10% for substances like cimetidine (100 mg/kg) or 2% for those similar to omeprazole (20 mg/kg). Thus, we defined the doses of 250, 500 and 1000 mg/kg in the E-MeOH preliminary anti-ulcer experiments, which allowed us to determine the lowest effective and safe dose of 250 mg/kg to evaluate the *V. tucanorum*'s gastroprotective action using different standard experimental models of induced gastric ulcer.

The mucosal barrier's ability to resist gastric injury requires the integrity of cytoprotective factors such as the pre-epithelial mucus bicarbonate layer, the intercellular tight junctions connecting the epithelial cells, the submucosal acid sensors, the presence of prostaglandins, cytokines, enteric nerves and blood flow (Ham and Kaunitz, 2007). The formation of gastric mucosal lesions by necrotizing agents such as HCl and EtOH has been reported to involve the depletion of gastric defensive mechanisms (Kinoshita et al., 1995). The combination of HCl/EtOH induces gastric lesions by promoting stasis in gastric blood flow that contributes to the development of the hemorrhagic and necrotic aspects of tissue injury (Konturek et al., 1998). The treatment with E-MeOH significantly inhibited ulcerative lesions at all tested doses (Table 1), suggesting that E-MeOH's gastroprotective effect is probably related to cytoprotection.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as aspirin® and piroxicam remain among the most commonly used pharmacological agents (Garner, 1992). However, topical effects of NSAIDs can cause submucosal erosions by inhibiting the cyclooxygenase (COX)-mediated effects in gastric cytoprotection. COX is constitutively expressed in the gastrointestinal tract in large amounts and has been reported to maintain mucosal integrity through continuous generation of prostaglandins (Halter et al., 2001). The COX-produced prostaglandins promote enhancement of gastric mucosal protection by stimulating mucus and bicarbonate secretion, epithelial cell proliferation and increasing mucosal blood flow. The presented results (Table 1) show that all the doses of *V. tucanorum* E-MeOH had a pronounced anti-ulcerogenic effect against piroxicam-induced gastric lesions. According to literature reports (Bortalanza et al., 2002; Weniger et al., 2005), phytochemical constituents from *V. tucanorum*, mainly betulinic acid and tormentic acid, presents anti-inflammatory effects. Our results

indicate that the presence of those compounds did not interfere with the gastroprotective action of *V. tucanorum*.

Ethanol is a closely related factor to gastric mucosal damage. Intragastric absolute ethanol administration to 24 h-fasted rats produced linear hemorrhagic lesions, extensive submucosal edema, mucosal friability, inflammatory cells infiltration, and epithelial cell loss in the stomach, which are typical characteristics of alcohol injury (Park et al., 2004). The pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal damage is still unknown, but the damage occurs both directly and indirectly through various mechanisms involving COX, lipoxygenase (LOX), cytokines, and oxygen-derived free radicals (Tarnawski et al., 1988). The treatment with E-MeOH significantly prevented the ethanol-induced gastric lesions (45–68%) in all tested doses (Table 1).

The E-MeOH (20 g) was partitioned between water and butanol. The butanolic fraction (Fr-Bu) weighted 6 g and was determined to be essentially composed by triterpenoids such as betulinic acid (0.52%), erythrodilol (2.0%), epi-betulinic acid (0.52%) and mixtures of ursolic and oleanolic acid derivatives (2.2%). This fraction was also evaluated in the model of ethanol-induced gastric ulcers and we observed that the doses of 37.5–150 mg/kg were as effective as the doses of the E-MeOH (250–1000 mg/kg) in the gastroprotection (Table 1), indicating that Fr-Bu was enriched with the active compounds present in the E-MeOH.

With the purpose of investigating possible antiulcerogenic mechanisms of *V. tucanorum*, we chose the E-MeOH lowest effective dose (250 mg/kg) in further tests. Gastric secretion obtained from pylorus-ligated mice was used to analyze the gastric pH, gastric juice volume, and total gastric acid, additionally to the ulcerative index. It is well known that pylorus ligation causes gastric hypersecretion, but the reasons are not yet completely explained. Brodie (1966) described that due to the surgery the stomach gets larger, the pressure on sensitive receptors in the antral gastric mucosa increases and activates the vagus-vagal reflex, causing increased gastric secretion. Furthermore, neutrophil migration in the mucosa following pylorus ligation suggests that these cells might be involved in gastric mucosal injury, possibly by releasing free radicals that cause lipid peroxidation and damage to the cell membrane (Rastogi et al., 1998). Animals pretreated by intraduodenal route with E-MeOH presented significant decrease in ulcerative index (49%), increase of pH (2.87 ± 0.12 from control vs. 4.62 ± 0.95 from E-MeOH) and decrease in the total gastric acid value (9.49 ± 0.60 from control vs. 6.44 ± 1.07 from E-MeOH) without altering the gastric volume ($p > 0.05$). Oral administration of the E-MeOH did not change any biochemical parameter of the gastric juice but was able to significantly decrease the ulcerative index (45%). Therefore, the extract did not simply act as an antacid or buffer solution in contact with gastric mucosa since there is no antisecretory property when this extract was orally administered.

Non-protein sulphhydryl (NP-SH) compounds are important components of the gastric mucus. The NP-SH exert functions in gastroprotection by maintaining the integrity of the mucosal barrier and binding free radicals formed due to the action of noxious agents like the ethanol (Szabo and Vattay, 1990). The raise in mucosal damage by noxious agents is usually accompanied by a decrease in NP-SH compounds amount. In this way, we investigated the possible involvement of endogenous NP-SHs in the gastroprotective effect of the E-MeOH and the Fr-Bu by pretreating animals with NEM in ethanol-induced gastric lesions. Pretreatment with NEM did not alter the protection induced by either E-MeOH or Fr-Bu (Table 2). Thus, the absence of NP-SH involvement and the unaltered gastric secretion parameters (as seen in pylorus-ligated mice) indicate the absence of mucus involvement in the gastroprotection of *V. tucanorum*.

Considering the role of free radicals in gastric damage, we evaluated the *in vitro* effect of *V. tucanorum* in lipid peroxidation assay.

Table 1

Effects of methanolic extract (E-MeOH) and butanolic fraction (Fr-Bu) from *V. tucanorum* leaves on different models of acute gastric lesion induced in rodents. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M.

Gastric lesion models	Treatment (p.o.)	Dose (mg/kg)	U.L.I. (mm)	Inhibition (%)
HCl/ethanol (mice)	Saline	–	95.50 $\pm$ 10.86	–
	Lansoprazole	30	33.17 $\pm$ 4.76**	65
	E-MeOH	250	45.33 $\pm$ 4.94**	53
	E-MeOH	500	49.00 $\pm$ 5.48**	49
	E-MeOH	1000	50.33 $\pm$ 7.59**	47
Piroxicam (mice)	Saline	–	71.60 $\pm$ 3.83	–
	Lansoprazole	30	32.40 $\pm$ 2.32*	55
	E-MeOH	250	37.40 $\pm$ 4.26*	48
	E-MeOH	500	31.40 $\pm$ 4.07*	56
	E-MeOH	1000	18.00 $\pm$ 1.70**	75
Ethanol (rats)	Saline	–	119.33 $\pm$ 6.06	–
	Carbenoxolone	100	74.00 $\pm$ 6.72**	38
	E-MeOH	250	65.50 $\pm$ 7.83**	45
	E-MeOH	500	41.33 $\pm$ 7.23**	65
	E-MeOH	1000	38.24 $\pm$ 6.46**	68
	Saline	–	251.11 $\pm$ 3.23	–
	Carbenoxolone	100	10.60 $\pm$ 2.09**	96
	Fr-Bu	37.5	88.80 $\pm$ 3.67**	65
	Fr-Bu	75	78.22 $\pm$ 3.29**	69
	Fr-Bu	150	98.81 $\pm$ 2.31**	61

ANOVA followed by Dunnett's test.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

The Fr-Bu presented an IC_{50} value of $92.08 \pm 2.92 \mu\text{g/ml}$ whereas quercetin was $6.75 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$. The result indicates a significant antioxidant property of Fr-Bu, which suggests an involvement of protective mechanisms against oxidative stress induced by dam-

age agents in the gastric mucosa. Indeed, triterpenes such as betulinic acid (identified in *V. tucanorum*) present antioxidative activity and are related to inhibition of ethanol-induced production of superoxide anions and hydrogen peroxide (Szuster-Ciesielska

Table 2

Effects of methanolic extract (E-MeOH) and butanolic fraction (Fr-Bu) from *V. tucanorum* on gastric lesions induced by ethanol in rats pretreated with NEM (an SH blocker) or L-NAME (an inhibitor of NO synthase).

Pretreatment (i.p.)	Treatment (p.o.)	Dose (mg/kg)	U.L.I. (mm)	Inhibition ^a (%)	Statistical analyses (Fisher's test)
Saline +	Saline	–	195.0 $\pm$ 22.0	–	Saline + E-MeOH vs. NEM + E-MeOH no significant difference ($p > 0.05$)
Saline +	Carbenoxolone	100	51.11 $\pm$ 4.93**	73	
Saline +	E-MeOH	250	75.50 $\pm$ 15.64**	61	
NEM +	Saline	–	186.0 $\pm$ 18.18	–	Saline + Fr-Bu vs. NEM + Fr-Bu no significant difference ($p > 0.05$)
NEM +	Carbenoxolone	100	126.40 $\pm$ 14.69	32	
NEM +	E-MeOH	250	109.33 $\pm$ 26.06*	41	
Saline +	Saline	–	266.61 $\pm$ 16.62	–	Saline + E-MeOH vs. L-NAME + E-MeOH significant difference ($p < 0.05$)
Saline +	Carbenoxolone	100	26.10 $\pm$ 5.87**	90	
Saline +	Fr-Bu	37.5	101.80 $\pm$ 12.36**	62	
NEM +	Saline	–	288.24 $\pm$ 48.39	–	Saline + Fr-Bu vs. L-NAME + Fr-Bu significant difference ($p < 0.05$)
NEM +	Carbenoxolone	100	90.20 $\pm$ 57.39**	69	
NEM +	Fr-Bu	37.5	93.12 $\pm$ 33.39**	68	
Saline +	Saline	–	170.28 $\pm$ 22.32	–	Saline + E-MeOH vs. L-NAME + E-MeOH significant difference ($p < 0.05$)
Saline +	Carbenoxolone	100	32.86 $\pm$ 9.24**	81	
Saline +	E-MeOH	250	69.43 $\pm$ 7.49*	59	
L-NAME +	Saline	–	216.86 $\pm$ 26.83	–	Saline + Fr-Bu vs. L-NAME + Fr-Bu significant difference ($p < 0.05$)
L-NAME +	Carbenoxolone	100	111.71 $\pm$ 18.92*	49	
L-NAME +	E-MeOH	250	138.86 $\pm$ 10.87*	36	
Saline +	Saline	–	174.71 $\pm$ 24.08	–	Saline + Fr-Bu vs. L-NAME + Fr-Bu significant difference ($p < 0.05$)
Saline +	Carbenoxolone	100	19.57 $\pm$ 12.36**	89	
Saline +	Fr-Bu	37.5	81.14 $\pm$ 9.71*	54	
L-NAME +	Saline	–	199.86 $\pm$ 22.60	–	Saline + Fr-Bu vs. L-NAME + Fr-Bu significant difference ($p < 0.05$)
L-NAME +	Carbenoxolone	100	93.15 $\pm$ 12.75*	54	
L-NAME +	Fr-Bu	37.5	179.86 $\pm$ 24.74	–	

Data are presented as mean $\pm$ S.E.M.

^a Percentage of inhibition in relation to respective control group treated with saline (ANOVA followed by Dunnett's test).

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

and Kandefer-Szerszen, 2005). In gastric mucosa the free radical-induced lipid peroxidation also result from the stasis on blood flow and the local neutrophil infiltration. Therefore, the antioxidative action of E-MeOH might be accounted to the observed gastroprotective effect.

It is well known that NO is involved in the modulation of gastric mucosal integrity and is important in the regulation of acid and alkaline secretion, mucus secretion and gastric mucosal blood flow (Chandranath et al., 2002). We observed that pretreatment with L-NAME (NO-synthase inhibitor) significantly reverted the E-MeOH gastroprotection when compared to the respective saline-pretreated E-MeOH group (Table 2). The E-MeOH of *V. tucanorum* reduced gastric lesion by protecting endogenous NO, which probably accounted to cytoprotective actions in the gastric mucosa. Considering the previous results with Fr-Bu we evaluated the role of endogenous NO in the cytoprotection promoted by this triterpene enriched-fraction. We found that the cytoprotection was more evident with Fr-Bu, which presented effective dose almost 5-fold lower than E-MeOH, and 2.5-fold lower than carbenoxolone (Table 2). This gastroprotective action of Fr-Bu was completely abolished by the pretreatment with NO-synthase inhibitor ($p < 0.05$), evidencing the important role of NO in the gastroprotective effects of *V. tucanorum*.

The therapeutic potential of the triterpene erythrodiol was reported by Rodríguez-Rodríguez et al. (2004). They described the NO-dependent vasodilation promoted by erythrodiol. Thus, the erythrodiol present in the Fr-Bu could be related to the gastroprotective action of *V. tucanorum*. Another pentacyclic triterpene present in the Fr-Bu is the betulinic acid, which presents free radical scavenging, anti-inflammatory and immunomodulatory activities (Liby et al., 2007). The Fr-Bu also presents a mixture of ursolic and oleanolic derivatives in its composition, and such triterpenes could also have a role in the fraction's effect. Sánchez et al. (2006) reported the gastroprotective effect of oleanolic acid and its derivatives in the HCl/EtOH-induced ulcer model and *in vitro* superoxide anions scavenging activity. Additionally, Farina et al. (1998) reported the ursolic acid derivatives as anti-ulcer compounds providing better effect than other gastroprotective drugs.

4. Conclusion

The obtained data demonstrated the gastric anti-ulcer activity of *V. tucanorum* methanolic leaf extract. This effect seems to involve an increase in gastrointestinal mucosa defensive mechanisms against aggressive factors, since we observed participation of NO in preventing or attenuating the ulcer process. Phytochemical evaluation demonstrated the presence of pentacyclic triterpenes like betulinic acid, epi-betulinic acid, erythrodiol and mixtures of ursolic and oleanolic derivatives in the buthanolic fraction obtained from the methanolic extract. All these secondary metabolites play their own substantial role supporting the pharmacological activity and effectiveness of *V. tucanorum*. The data set allied with the absence of acute toxicity indicates a promising herbal drug that is in accordance with the ethnopharmacological use of this medicinal plant against gastric disorders.

Acknowledgements

We are grateful to FAPESP (Biota-Fapesp Program, Proc. 02/05503-6) for the financial support and to CNPq for grants to ARMSB, WV LCDS and CAHL.

References

- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castilho, C., Navarrete, A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringens*; roles of prostaglandins, sulphidryls, nitric oxide and capsaicin neurons. *Planta Medica* 69, 905–909.

- Bortalanza, L.B., Ferreira, J., Hess, S.C., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2002. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *European Journal of Pharmacology* 453, 203–208.
- Brodie, D.A., 1966. The mechanism of gastric hyperacidity produced by pylorus ligation in the rat. *American Journal of Digestion Disease* 11, 231–241.
- Chandranath, S.I., Bastaki, S.M., Singh, J.A., 2002. Comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29, 173–180.
- Farina, C., Pinza, M., Pifferi, G., 1998. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Il Farmaco* 53, 22–32.
- Gálvez, J.P., De La Cruz, A., Zarzuelo, F., De La Cuesta, S., 1995. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology* 51, 127–133.
- Garner, A., 1992. Adaptation in the pharmaceutical industry, with particular reference to gastrointestinal drugs and diseases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology (Supplement)* 193, 83–89.
- Guarim Neto, G., Moraes, R.G., 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasílica* 17, 561–584.
- Halter, F., Tarnawski, A.S., Schmassmann, A., Peskar, B.M., 2001. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut* 49, 443–453.
- Ham, M., Kaunitz, J.D., 2007. Gastrointestinal defense. *Current Opinion in Gastroenterology* 23, 607–616.
- Kinoshita, M., Kume, E., Tamaki, H., 1995. Roles of prostaglandins, nitric oxide and the capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection produced by ecbet sodium. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275, 494–501.
- Konturek, J.W., Hengst, K., Konturek, S.J., Sito, E., Stachura, J., Domschke, W., 1998. Physiological role of cholecystokinin in gastroprotection in humans. *American Journal of Gastroenterology* 93, 2385–2390.
- Lee, H.T., Lee, Y.J., Chung, S.J., Shim, C.K., 2000. Effect of prokinetic agents, cisapride and metoclopramide, on the bioavailability in humans and intestinal permeability in rats of ranitidine, and intestinal charcoal transit in rats. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 108, 311–323.
- Liby, K., Honda, T., Williams, C.R., Risingsong, R., Royce, D.B., Suh, N., Dinkova-Kostova, A.T., Stephenson, K.K., Talalay, P., Sundararajan, C., Gribble, G.W., Sporn, M.B., 2007. Novel semisynthetic analogues of betulinic acid with diverse cytoprotective, antiproliferative, and proapoptotic activities. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 2113–2119.
- Loomis, T.A., Hayes, A.W., 1996. *Essentials of Toxicology*, 4 ed. Academic Press Limited, London, pp. 33–46.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P., 1994. ¹³C-NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517–1575.
- Mizui, T., Doueuchi, M., 1983. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Japanese Journal of Pharmacology* 33, 934–945.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., Sukamoto, T., 1991. Effects of the new anti-ulcer agent kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Japanese Journal of Pharmacology* 57, 495–505.
- Park, S., Hahm, K., Oh, T., Jin, J., Choue, R., 2004. Preventive effect of the flavonoids, Wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 49, 384–394.
- Puscas, I., Puscas, C., Pasca, R., 1997. A comparative study os safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung* 47, 568–572.
- Rastogi, L., Patnaik, G.K., Dikshit, M., 1998. Free radical and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacological Research* 38, 125–132.
- Rodríguez-Rodríguez, R., Herrera, M.D., Perona, J.S., Ruiz-Gutiérrez, V., 2004. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in 'orujo' olive oil, on rat aorta. *The British Journal of Nutrition* 92, 635–642.
- Sánchez, M., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G., Razmilic, I., Yáñez, T., Rodríguez, J.A., 2006. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: in vitro–in vivo relationships. *Life Sciences* 79, 1349–1356.
- Schultes, R.E., Raffauf, R.F., 1990. *The Healing Forest, Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, p. 484.
- Shay, H., 1945. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. *Gastroenterology* 5, 43–61.
- Souza Brito, A.R.M., 1996. How do study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. *Journal of Ethnopharmacology* 54, 131–138.
- Souza Brito, A.R.M., 1994. *Manual De Ensaios Toxicológicos In Vivo*. Ed. Unicamp, Campinas, pp. 11–15.
- Stickney, J.C., Northup, D.W., 1959. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 101, p. 582.
- Szabo, S., Vattay, P., 1990. Experimental gastric and duodenal ulcers. *Advances in pathogenesis. Gastroenterology Clinical North America* 19, 67–85.
- Szelenyi, I., Thieme, K., 1978. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Archives of Toxicology* 41, 99.
- Szuster-Ciesielska, A., Kandefer-Szerszen, M., 2005. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Pharmacological Reports* 57, 588–595.

- Tarnawski, A., Stachura, J., Hollander, D., Sarfeh, I.J., Bogdal, J., 1988. Cellular aspects of alcohol-induced injury and prostaglandin protection of the human gastric mucosa. Focus on the mucosal microvessels. *Journal of Clinical Gastroenterology* 1, S35–S45.
- Weniger, B., Lobstein, A., Um, B.H., Vonthron-Sénéchau, C., Anton, R., Usuga, N.J., Basaran, H., Lugnier, C., 2005. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. *Phytotherapy Research* 19, 75–77.
- Zucaro, Y.L., Compagnone, R.S., Hess, S.C., 2000. β -hydroxymaslinic acid, a triterpene from *Vochysia ferruginea*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11, 241–244.



Anexo 3

Journal of Natural Medicines

J. Nat. Med. [09187]

From Editorial Board to Author

Dr. C.A. Hiruma-Lima
Depto. Fisiologia, Instituto de
Biotecnologia
UNESP cp. 510, DEP 18618-000
Bairro Rubiao Junior s/n Botucatu,
SP

December 3, 2009

Ms. No. 09187

Author/s: C.A. Hiruma-Lima, et al. (shortly)

Ms. Title: Gastric Ulcer Healing Action from Alkaloid Fraction of *Strychnos pseudoquina* St. Hil.

Dear Dr. C.A. Hiruma-Lima:

Based on the reviewers' comments and together with our evaluation, your manuscript can be acceptable in *Journal of Natural Medicines* after revisions. Your manuscript should be revised, in accordance with enclosed comments and suggestions noted in separate sheets, before publication. We hope you will give appropriate consideration to these suggestions and to prepare suitable revisions of the paper. Please send two revised manuscripts, the original manuscripts (if referee's comments are marked on the manuscripts, please do not erase them from the original manuscripts) and your answers to the referees' comments with copies of reviewers' comments within four months after you receive this correspondence.

Please explicitly address the comments raised by the reviewers in your cover letter and also point out the changes and revisions made in the manuscript.

Please return the revised manuscript to the editorial office addressed below:

Editorial Office of *Journal of Natural Medicines*
c/o Center for Academic Publications Japan
4-16, Yayoi 2-chome, Bunkyo-ku,
Tokyo, 113-0032 Japan
E-mail: j-natmed@capj.or.jp

Yours Sincerely,

Editorial Board
Journal of Natural Medicines

ORIGINAL ARTICLE

Gastric Ulcer Healing Action from Alkaloid Fraction of *Strychnos pseudoquina* St. Hil.

Flávia Bonamin • Thiago Mello Moraes • Marcelo Aparecido Silva • Ariane Rozza • Cláudia Helena Pellizzon • Tais Maria Bauab • Lucia Regina Machado Rocha • Wagner Vilegas • Clélia Akiko Hiruma-Lima

F. Bonamin . T.M.Moraes. L.R.M.Rocha, C.A.Hiruma (corresponding author)

São Paulo State University - Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, cp 610, CEP 18618-000, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; Tel.: 00+5501438116077; fax - 00+551438153744;

e-mail: hiruma@ibb.unesp.br

M.A.Silva. W. Vilegas

Department of Organic Chemistry, Chemistry Institute-UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

A.Rozza. C.H.Pellizzon

Department of Morphology Bioscience Institute-UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

T.M.Bauab

Department of Biological Science-UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

Abstract The aim of the present study is to elucidate the mechanism of the healing process mediated by the methanolic extract (ME) and enriched alkaloid fraction (EAF) from *S. pseudoquina* in chronic gastric ulceration induced by 5% acetic acid in rats. The ME and EAF was administered orally in a single dose for 14 days after chronic ulceration was induced in rats. The healing effect of ME and EAF was evaluated by macroscopic and morphometric analyses, immunohistochemical assay (PCNA and SOD) and antibacterial effect was also evaluated against a standard strain of *Helicobacter pylori*. Our results demonstrated that EAF significantly reduced border internal (42%) and external (38%) lesion area (mm²) by macroscopic analyses ($P < 0.05$). Animals treated with EAF stimulated some proliferative factors by increasing the height of epithelial regenerative area and the expression of PCNA-positive nuclei. The number of vessels in gastric mucosa of rats treated with EAF reveals an expressive increase (4 times more than vehicle treatment) of vessels that stimulate cells proliferation in the healing region. EAF also was quite effective in the process of SOD release that is an important protective factor against bacterial agents. The MIC of 75 µg/ml from EAF showed an effective *in vitro* anti-*H. pylori* action of this fraction. EAF efficacy was accomplished safely without presenting any alteration of toxicological parameters. These results suggest that the recovery of vascularization of the ulcerated area is involved in the healing action of alkaloid fraction of *S. pseudoquina*. The expressive gastric healing effect by increasing cellular proliferation together with antioxidant action through expression of SOD activity and antibacterial action against *H. pylori* suggest the efficacy of this species in heal gastric mucosa.

Keywords *Strychnos pseudoquina* St. Hil. Loganiaceae . healing ulcer . PCNA . SOD . angiogenesis

Introduction

The genus *Strychnos* includes more than 200 species distributed among tropical areas of the globe [1]. Many of these species are known by their medicinal properties and for the powerful toxicity character among their phytochemicals, such as strychnine, one of the poisonous alkaloids produced by the

species from this genus [2]. Among the medicinal species, a folk medicine from Cerrado region of Brazil, there is the species named *Strychnos pseudoquina* St. Hil. Known popularly as "quina-quina", "quina-branca" or "casca aromatica", this plant was very commonly used in folk medicine in tea form obtained from the bark and/or leaves as tonic, antipyretic, antimalarial and mainly against diseases of the liver, spleen and stomach [3-6]. This medicinal plant was one of the Brazilian native species described in the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia in 1929 as intermittent fevers, liver and spleen disorders and as digestive [7] but even eighty years afterwards few pharmacological studies have been developed with this species. Andrade-Neto et al [6] showed that crude ethanol extract from the bark of this species presents weak antiplasmodial activity. Honorio-França et al [8] demonstrated that aqueous extract from *S. pseudoquina* bark provides hypoglycemic action but did not heal wounds in diabetic rats. Silva et al [9] showed the protective action of methanolic extract (ME) and enriched alkaloid fraction (EAF) from leaves of *S. pseudoquina* to the gastric mucosa against injurious agents such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and an ethanol acidified solution in mice. The same authors also observed that an *in vivo* assay of ME and EAF presented no toxic effects and no mortality for 14 days. However, studies from Santos et al (10) showed that ME from *S. pseudoquina* was mutagenic against strains of *Salmonella*, but the EAF presented absence of mutagenicity in this same assay. The confirmation of gastroprotective action of ME and EAF from *S. pseudoquina* is indicative of antiulcer action of this species, corroborating its reputed utility in folk medicine; however, these actions do not imply that these same preparations also present healing effect on injured gastric mucosa. So the aim of this study was to evaluate the healing action of ME or EAF of *Strychnos pseudoquina* throughout 14 consecutive days in the chronic ulcer model induced by acetic acid in rats. We also evaluated some toxicological parameters by subacute treatments with *S. pseudoquina* and the potential antibacterial action of this species.

Materials and methods

Plant material and extraction of ME and EAF

Leaves of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. were collected in May 2001 from Porto Nacional city, Tocantins State, Brazil and identified by Prof. E.R. Santos, from the Institute of Biology at Tocantins University. A herbarium specimen voucher (Nr. 3291) was deposited at the Herbarium of Tocantins University (HTINS). The leaves were air-dried and powdered in a mill. Leaves of *S. pseudoquina* (300 g) were extracted in powder form with MeOH (seven days). Solvents were evaporated in a vacuum to yield 17.7 g of extract (ME). A portion (5.0 g) of the methanolic extract (MeOH) of *S. pseudoquina* was submitted to column chromatography on Sephadex LH-20 (100 x 5 cm) with MeOH as the eluent. One hundred fractions (5 ml) were collected, checked by TLC on silica gel plates CHCl_3 -MeOH-n-PrOH-H₂O (5:6:1:4, v/v/v/v lower phase) and revealed with Draggendorff, iodoplatinate or NP/PEG (Natural Products/Polyethyleneglycol) reagents. Alkaloids were detected in Fr. 3-29 (denominated "enriched alkaloid fraction - EAF 3 g) and flavonoids were detected in Fr. 35-90 (250 mg). These exactly the same batches from MeOH and the EAF have been used in this study were extensively study and phytochemical profiles of both were described by Silva et al [9].

Animals

Male Wistar albino rats (150-250 g) from the Central Animal House of the UNESP were used. The animals were fed a certified Nuvilab[®] (Nuvital) diet with free access to tap water under standard conditions of 12 h dark-12 h light, humidity ($60 \pm 1.0\%$) and temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). Fasting (24h) was used prior to assays because standard drugs, ME or EAF were always administered by orally using a saline solution (10 ml/kg) as vehicle. Animals were kept in cages with raised floors of wide mesh to prevent coprophagy. All experiments were performed in the morning, and followed the

recommendations of the Canadian Council on Animal Care [11]. The UNESP Institution for Animal Care approved the employed protocols.

Healing in acetic acid-induced gastric lesion

The experiment was performed according to the method described by Takagi et al [12], with some modifications. Three groups of rats that had fasted for 24 h were used in this experiment ($n=7-8$). Under anesthesia, a laparotomy was performed on all animals through a midline epigastric incision. After exposing the stomach, 0.05 mL (v/v) of a 30% acetic acid solution was injected into the subserosal layer in the glandular part of the anterior wall. The stomach was bathed with saline (20°C) to avoid adherence to the external surface of the ulcerated region. The abdomen was then closed and all the animals were fed normally. We selected the lowest effective dose of ME or EAF (250 mg/kg body wt.) to evaluate the healing effect of *S. pseudoquina* based on data from Silva et al [9] that evaluated the gastroprotective action of ME or EAF on acute gastric lesion model. The other group was treated with 100 mg/kg of pure cimetidine (Sigma Co., U.S.A.) or vehicle (10 ml/kg) to determine healing effects by subacute treatment. All treatments were administered orally once a day for 14 consecutive days beginning one day after surgery. Body weight was recorded daily throughout the experiments and the macroscopic analyses and weights of vital organs (liver, kidney, heart, spleen and lung) were compared among the different treatments and the group treated with vehicle to evaluate the possible subacute toxicity induced by ME or EAF. On the day after the last drug administration, the rats were killed and their stomachs were gently removed. The gastric lesions were evaluated by examining the inner gastric surface with a dissecting magnifying glass. The macroscopic ulcer area of the internal border and external border (mm^2) were determined as described by Takagi et al [12]. *Histological methods:* The stomach lesions induced by acetic acid in rats submitted to the different treatments were located, sectioned, and fixed in ALFAC solution (alcohol, chloroform and acetic acid) for 24 h at 4° C. Then the samples were routinely processed for embedding in paraplast, and cut into 7 μm -thick sections that were stained with periodic acid –Schiff (PAS) [13] and hematoxylin-eosin (HE) [14]. Paraffin slides were processed for HE staining

and immunohistochemical reaction in blood vessels. For both analyses, we used at least 6 fields for each group and the results were submitted to statistical analyses. *Morphometric analyses:* For the morphometric analyses a slice of stomach was examined in a Leica microscope coupled with Leica Qwin Software (Leica-England), where the height of regenerated mucosa was measured by employing a variation of the method used by Ishihara and Ito [15]. *Immunohistochemical analyses:* The antibodies utilized (Novo Castra NCL-PCNA) included anti-PCNA (cell division marker, to evaluate regeneration potential) and anti-SOD (superoxide dismutase, to evaluate antioxidant activity on the superoxide radicals). Slices were deparaffinized, dehydrated and immunostained with peroxidase by the avidin-biotin method. High temperature antigen unmasking technique in 0.01M citrate buffer, pH 6, in a microwave oven was performed two times for 5 min total. Blocking of nonspecific reaction was completed with 1% normal goat serum and 3% not-fat milk. After rinsing in phosphate buffered saline (0.01 mol/l PBS pH 7.4), the sections were incubated in secondary antiserum. They were then washed in PBS and incubated in ABC (avidine and biotine complex) reagents (ABC kit – Vector) and incubated in peroxidase reaction (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in PBS buffer. After being immunostained, the sections were lightly counterstained with Mayer's hematoxylin. The slides were observed under a Leica light microscope. For positive control we used the stem cell region in stomach mucosa and for negative control the primary and secondary antibodies were omitted.

Anti-Helicobacter pylori activity

The ME and EAF were tested to detect anti-*Helicobacter pylori* activity [16]. The strain of *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) was isolated from patients with duodenal ulcer disease. Frozen *H. pylori* isolate was thawed and grown on 5% sheep blood agar plates for 3 to 4 days at 37°C in 10% CO₂ and 98% humidity. Each plate was swabbed with a sterile cotton-tipped applicator and the cells were suspended in sterile saline to obtain turbidity equivalent to a 2.0 McFarland standard. Muller-Hinton broth containing 10% horse serum was added to all wells of a 96-well microtiter plate (Corning-USA). Each well was incubated with *H. pylori* at a final concentration of ~1x10⁵ CFU/ml. The plates were incubated for 5 days in a microaerobic atmosphere at 37°C. Following incubation, the plates were examined visually and

spectrophotometrically and the lowest concentration showing complete inhibition of growth was recorded as the MIC (Minimum Inhibitory Concentration). The results were considered valid only when the MIC values for the control organisms were within the ranges established by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by Dunnett's or Tukey's test, with the significance level at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Since the gastric ulcer model induced by acetic acid was established more than 40 years ago [12] this assay has been used for the study of underlying mechanisms of ulcer cicatrisation by subacute and chronic treatment of anti-ulcer drugs that accelerated the lesion-healing effect [17]. Based on data from Okabe and Agamase [18], this model was the one that most closely approximates human peptic ulcer disease, because the damage caused by the acetic acid penetrates in gastric mucosa not only in the mucous membrane and submucous layer but also the muscular layer.

Figure 1 shows the result of the macroscopic analysis of the gastric lesions induced by acetic acid in rats treated with vehicle, cimetidine, ME or EAF from *S. pseudoquina*. Our results shown that although ME from *S. pseudoquina* induced significant gastroprotective effect against injuries caused by NSAID and ethanol/HCl in mice [9]. The treatment of rats for 14 consecutive days with this extract did not reveal significant healing action by reducing internal or external border area, when compared macroscopically with vehicle-treated animals ($P > 0.05$). However, the gastric lesions of the animals treated with EAF, at the same dose, induced significant reduction ($P < 0.05$) in internal (42%) and external (38%) border. This macroscopic result was also proven by histological analyses (Table 1) in which the height of the regeneration area (μm) was measured. The animals treat with EAF from *S. pseudoquina* significantly increased epithelial height in regenerative area of gastric mucosa when compared with vehicle-treated

ones. These results indicate EAF stimulated some proliferative factors in gastric mucosa that were important factors to regeneration of injured gastric mucosa.

Wallace and Devchand [19] reported that reconstructing the entire structural architecture of gastric mucosa damage can require several weeks and involves the formation of granulation tissue at the base of the ulcers, formation of new vessels (angiogenesis), and re-establishment of the whole glandular architecture. The quality of mucosal structural restoration may be the most important factor in determining future ulcer recurrence [20]. H&E staining of histological cuts (Figure 2) from EAF-treated animals reveals well structured mucous glands in the highly regenerated area that probably provoked their elongation and alignment. The architectural reorganization of regenerated area in EAF-treated animals (Figure 2) facilitates the passage of the mucus and of other substances towards the surface of the gastric mucous membrane. Tarnawski et al [21] indicated that some gastric mucosa showed re-epithelialization of the mucosal surface but that subepithelial mucosa displayed prominent abnormalities. These abnormalities could interfere with oxygenation, nutrient supply, and mucosal resistance and defense; therefore, they could be a basis for ulcer recurrence.

Cellular proliferation plays an important role in maintaining the integrity of the gastrointestinal system. Cell division in gastrointestinal treatment is limited to a discreet anatomical area, the proliferative compartment [22]. To investigate the effect of EAF on cell proliferation in the gastric ulcer area, this parameter was determined by immunohistochemical assay (Figure 3). In the vehicle group, the immunoreactions for PCNA (expressed throughout the cell cycle whereas its concentration increased further in the S-phase) were observed as dark accumulations of DAB (diaminobenzidine) reaction products in the nuclei of the gastric mucosa layer. We observed that the EAF-ulcerated group stimulated the cell proliferation in the regeneration area, mainly at the base of the mucous glands (Figure 3). So PCNA-positive nuclei from EAF-group was incontestably more intense than in the vehicle-treated or the cimetidine positive control group.

Previous studies also suggested that the quality of epithelial surface reconstitution was guaranteed by angiogenesis (formation of a new vascular network) that ensures an adequate supply of oxygen and

nutrients to the healing mucosa [20, 23]. We quantified vessels in gastric mucosa submitted to different treatments (Table 1). The number of vessels in rats treated with cimetidine was double that in those treated only with vehicle. But the number of vessels in gastric mucosa of rats treated with EAF from *S. pseudoquina* reveals an expressive increase (4 times more than vehicle treatment) of vessels. This result indicates that EAF treatment induced healing action in gastric mucosa by proliferating vessels in gastric mucosa that stimulated cell proliferation in the healing region.

Leite et al [24] observed that replenishment of SOD (superoxide dismutase) led to decrease in constrictive remodeling and enhanced angiogenesis. SOD is the most important enzymes responsible for eliminating free radicals from the cell, given that it transforms O_2^- radicals into H_2O_2 and protects the cells from damage through the removal of those radicals. The SOD activity level represents the intracellular antioxidant ability of the cell. The free radicals affect the structure of the cell membrane as well as the membranes of various organelles including the mitochondria, lysosomes and the endoplasmic reticulum [25].

The participation of SOD (superoxide dismutase) in the EAF action mechanism was also evaluated, due to its importance as an antioxidant and eliminator of free radicals from the cells [25, 26]. The result of this study evidenced a greater number of stained cells (in brown) from the EAF-treated group than in groups treated with vehicle (Figure 4). We also observed that SOD stained cells were not present in cimetidine-treated group. Konturek et al [27] observed that SOD accelerates the healing of ischemia and reperfusion lesions due to suppression of oxygen free radicals and improvement of gastric microcirculation. Based on our result we can conclude that the EAF is quite effective in the process of releasing SOD, eliminating free radicals and, thus, healing gastric lesions.

Some new antiulcer drugs, such as rebamipide, were effective in inducing ulcer healing but failed in *H. pylori* eradication therapy [28]. As it is highly desirable to identify one drug that produces gastroprotective action, heals injured gastric mucosa and also acts against *Helicobacter pylori*, we evaluated the anti-*Helicobacter pylori* effect of EAF from *S. pseudoquina* against a strain of *Helicobacter pylori* isolated from patients with duodenal ulcer disease. Recently, Castillo-Juarez et al [29] evaluated plants used in

traditional medicine against *Helicobacter pylori* while considering an MIC value lower than 125 µg/ml to constitute strong antibacterial action. We obtained a very interesting MIC from EAF of 75 µg/ml, a finding that indicates a highly satisfactory anti-*Helicobacter pylori* action from this fraction.

Over twenty years ago Garner [30] predicted that the future of antiulcer drug research must address the multifactorial etiologies of gastric ulcer as well as attempt to cure the disease rather than simply induce antisecretory action. But the efficacy of the new drug must also be accompanied by a clear indication for safe human use. Silva et al [9] observed that EAF and ME from *S. pseudoquina* did not present acute toxicity given that no mortality was observed up to 5 g/kg (p.o.). Animals submitted to different treatments (EAF, ME, cimetidine and vehicle) in gastric ulcer model induced by acetic acid supply some important toxicity parameters such as evolution of body weight during 14 days, mortality, and weight of the vital organs (Figure 5 and Table 2). The 14-day evolution in body weight alteration under EAF did not differ significantly from the vehicle group while the average weights of vital organs and visceral conditions were normal and comparable to those of the control group ($P > 0.05$). The finding of one death registered in each of the saline, cimetidine and EAF groups, does not necessarily represent a toxicity sign but rather a consequence of the surgical procedure of this model. Table 2 also presents results obtained by biochemical analyses of serum, organized by treatments, among which we observed no alteration of these parameters.

Santos et al [10] described that mutagenic effect of methanolic extract from *S. pseudoquina* present in Ames and micronucleus tests. But they also recommend that EAF from *S. pseudoquina* should be explored as a possible source of new antiulcerogenic phytotherapeutic preparation because the absences of mutagenicity but new toxicological studies are necessary to ensure its safety use in human. Phytochemical studies of EAF, in agreement with Silva et al [9], yielded nordiidrofluorcurarine, an alkaloid indole, in addition to rutin and kaempferol 3-O- β -rutenoside. The structure of indolic alkaloid 3-hydroxy-enolate resembles that of omeprazole, a well known antiulcer agent. But based on Silva et al [9] this compound from *S. pseudoquina* may possess a reversible bond between sulfhydryl groups and does not present adverse side effects from omeprazole related to carcinoma.

Based on the results of the present work we concluded that the EAF from *Strychnos pseudoquina* presents expressive healing effect on gastric mucosa through the increase of angiogenesis, cell proliferation, antioxidant activity through expression of SOD activity and antibacterial action against *H. pylori*. The absence of toxicity throughout the 14 consecutive days of treatment ensures its safety for use by the population.

Acknowledgements We are grateful to James Welsh for revising English language version. This work was supported by the Biota-FAPESP project (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior).

Conflicts of interest

There is no conflict of interest.

References

1. Philippe G, Angenot L, Titis M, Frederich M (2004) About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. *Toxicon* 44: 405-416
2. Thongphasuk P, Suttisri R, Bavovada R, Verpoorte R (2003) Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*. *Phytochemistry* 64: 897-901
3. Pott A, Pott VJ (1994) Plantas do Pantanal. Embrapa, Planaltina, D.F., Brazil
4. Almeida SP, Proença CE, Sano MS, Ribeiro JF (1998) Cerrado - Espécies Vegetais Úteis; Embrapa, D.F., Brazil
5. Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa
6. Andrade-Neto VF, Brandão MGL, Stehman JR, Oliveira, LA, Krettl, AU (2003) Antimalarial activity of cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J Ethnopharmacol* 87: 253-256

7. Brandão, MG, Zanetti NN, Oliveira P, Graef CF, Santos AC, Monte-Mór RL (2008) Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. J Ethnopharmacol 120: 141-148
8. Honório-França AC, Marins CM, Boldrini F, França EL (2008) Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of "Quina do Cerrado" (*Strychnos pseudoquina* St. Hil). Acta Cir Bras 23: 504-510
9. Silva MA, Rafacho BP, Hiruma-Lima CA, Rocha LRM, Brito ARMS, Vilegas W (2005) Evaluation for *Strychnos pseudoquina* St. Hil. Leaves extract on gastrointestinal activity in mice. Chem Pharm Bul 53: 881- 885
10. Santos FV, Colus IMS, Silva MA, Vilegas W, Varanda EA (2006) Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. Food Chem Toxicol 44: 1585-1589
11. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA (1993) Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Ottawa, Ontario. Canadian Council on Animal Care
12. Takagi K, Okabe S, Saziki R. (1969) A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. Jp J Pharmacol 19: 418-426
13. Vacca LL (1985) Laboratory Manual of Histochemistry Raven Press-New York
14. Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas Neto AG (1976) Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART – Editora da Universidade de São Paulo
15. Ishihara M, Ito M. (2002) Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole. Eur J Pharmacol 444: 209-215
16. Hachem CY, Clarridge JE, Reddy R, Flamm R, Evans DG, Tanaka SK, Graham DY (1996) Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin, and metronidazole. Dig Microbiol Infect Dis 24: 37-41

17. Pawlik T, Konturek PC, Konturek JW, Konturek SJ, Brzozowski T, Cześnikiewicz M, Plonka M, Bielanski W, Areny H (2002) Impact of *Helicobacter pylori* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on gastric ulcerogenesis in experimental animals and in humans. *Eur J Pharmacol* 449: 1-15
18. Okabe S, Agamase K (2005) An overview of acetic acid ulcer models - the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biol Pharm Bull* 28; 1321-1341
19. Wallace JL, Devchand PR (2005) Emerging roles for COX-2 in gastrointestinal mucosal defense – Review *Br J Pharmacol* 145: 275-282
20. Tarnawski, A (2005) Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 50: S24-S33
21. Tarnawski A, Douglass TG, Stachura J, Krause WJ (1991) Quality of gastric ulcer healing: histological and ultrastructural assessment. *Al Pharmacol Ther* 5: 79-90
22. Okamoto R, Watanabe M. (2004) Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 39: 1–6
23. Tarnawski A, Szabo IL, Husain SS, Soreghan B (2001) Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *J Physiol Paris* 95: 337-344
24. Leite PF, Liberman M, Sandoli de Brito F, Laurindo FR (2004) Redox processes underlying the vascular repair reaction. *World J Surg* 28: 331-336
25. Wang S, Wang L, Zhang K, Shen J, Zhou H, Qiu X (2005) Effect of superoxide dismutase and malondialdehyde metabolic changes on carcinogenesis of gastric carcinoma. *W J Gastroenterol* 11: 4305-4310
26. Fan Y, Hua J, Li J, Yang Z, Xina X, Wang J, Ding J, Geng M (2005) Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms. *Neuro Lett* 374: 222-226
27. Konturek PC, Duda A, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Drozdowicz D, Pajdo R, Meixner H, Hahn EG (2000) Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1beta, tumor necrosis

-
- factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. *Scand J Gastroenterol* 35: 452-463
28. Terano A, Arakawa T, Sugiyama T, Suzuki H, Joh T, Yoshikawa T, Higuchi K, Haruma K, Murakami K, Kobayashi K (2007) Rebamipide, a gastro-protective and anti-inflammatory drug, promotes gastric ulcer healing following eradication therapy for *Helicobacter pylori* in a Japanese population: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Gastroenterol* 42: 690-693
29. Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I (2009) Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol* 122: 402-405
30. Garner A (1986) Future opportunities for drug therapy in peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* 125: 203-210

Table 1 – Regeneration measures of the gastric lesion borders (epithelial height) and the new blood vessels in the regeneration areas under the mucous membrane in histological analysis of the stomach treated with EAF of *Strychnos pseudoquina* under the model of ulcer induction by acetic acid.

Treatments (p.o.)	Doses (mg kg ⁻¹)	Epithelial height (μ m)	Number of new blood vessels μ m ⁻¹
Saline	-	1462.00 $\pm$ 25.27	178.01 $\pm$ 20.64
Cimetidine	100	1489.50 $\pm$ 17.56	309.17 $\pm$ 30.33*
EAF	250	1611.70 $\pm$ 28.14**	633.95 $\pm$ 33.97**

Results are mean $\pm$ S.E.M. Statistical analysis among the groups: ANOVA following by Dunnett's test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table 2 – Effects on body and organ weights and serum biochemical parameters of a single dose (250 mg kg⁻¹, p.o.)/day of methanolic extract (ME) or alkaloid fraction (EAF) from *Strychnos pseudoquina* administered for 14 consecutive days after ulcer formation (n= 7-8).

Treatment (p.o.)	Organ weight					Serum biochemical parameters				
	Kidney	Lungs	Heart	Liver	Spleen	Glucose (UI l ⁻¹)	ALT (UI l ⁻¹)	AST (UI l ⁻¹)	Urea (mg dl ⁻¹)	Creatinine (mg dl ⁻¹)
Control	4.93 ± 0.26	4.41 ± 0.23	3.85 ± 0.10	10.75 ± 0.13	3.39 ± 0.12	25.57 ± 3.12	62.57 ± 1.96	408.0 ± 35.38	64.61 ± 3.98	0.63 ± 0.06
Cimetidine	5.03 ± 0.07	4.55 ± 0.18	3.76 ± 0.07	10.30 ± 0.14	3.34 ± 0.12	29.11 ± 2.56	48.55 ± 2.52	346.67 ± 18.67	58.00 ± 1.61	0.49 ± 0.02
ME	5.39 ± 0.11	4.46 ± 0.13	3.80 ± 0.06	10.30 ± 0.10	3.21 ± 0.12	26.33 ± 3.88	69.11 ± 6.58	433.22 ± 26.12	57.11 ± 3.40	0.55 ± 0.03
EAF	5.10 ± 0.08	4.62 ± 0.27	3.85 ± 0.19	10.47 ± 0.14	3.44 ± 0.12	34.00 ± 3.57	64.78 ± 9.16	415.56 ± 39.49	57.22 ± 3.71	0.51 ± 0.01

Results are mean ± S.E.M.; ANOVA followed by Dunnett's test. No significant differences $P > 0.05$.