

Ellen Geraldo Ganev



MONOGRAFIA

Ação antiúlcera do Citral em modelos experimentais *in vivo*: Análise do envolvimento do Óxido Nítrico, Muco aderido e Grupamentos Sulfidrílicos na proteção da mucosa

Orientadora: Prof. Dr. Clélia Akiko Hiruma-Lima
Co-orientadora: Prof. Dr. Lúcia Regina Machado da Rocha

Botucatu - São Paulo
2010

Ação antiúlcera do Citral em modelos experimentais in vivo: Análise do envolvimento do Óxido Nítrico, Muco aderido e Grupamentos Sulfidrílicos na proteção da mucosa

Ellen Geraldo Ganev

Orientadora: Prof. Dr. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Co-orientadora: Prof. Dr. Lúcia Regina Machado da Rocha



Monografia apresentada ao curso de graduação em Física Médica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Ganev, Ellen Geraldo.

Ação antiúlcera do citral em modelos experimentais *in vivo*: análise do envolvimento do óxido nítrico, muco aderido e grupamentos sulfidrílicos na proteção da mucosa / Ellen Geraldo Ganev. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Co-orientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

Capes: 20300000

1. Produtos Naturais - Efeito fisiológico. 2. Úlceras – Doenças - Tratamento.

Palavras-chave: Citral; Monoterpeno; Produtos Naturais; Úlcera gástrica.

*“Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E SER FELIZ!!!”
Almir Sater e Renato Teixeira*

Dedico essa monografia às pessoas mais importantes de minha vida...

*... ao homem que nunca pôde terminar os estudos,
que trabalha todos os dias sob o sol quente de
chinelo e bermudão para poder dar o melhor para os
filhos... ao meu PAI, que traz em seu rosto e mãos as
marcas de um trabalho pesado, e em seu coração, fé
e amor incondicional... Ao senhor Edmiro Ganev...*

*... à minha MÃE, que sacrificou muitas coisas de sua
vida para que eu pudesse ser uma pessoa melhor,
que sempre esteve ao meu lado me apoiando,
incentivando, ensinando e educando. À senhora
Roseli Tápias...*

*... e também, ao grande culpado do sorriso que
carrego nos lábios e imenso amor que trago no
peito. À você, meu amor, meu Guga...*

... o desfrute dessa recompensa!!!

Agradecimentos

Muitas pessoas contribuíram para que esse trabalho se realizasse, não fiz nada sozinha não! Por isso tenho o imenso prazer de agradecer:

Primeiramente, as duas pessoas de maior importância para a realização desse trabalho, a minha orientadora **Prof. Dr. Clélia Akiko Hiruma-Lima** e a minha co-orientadora **Prof. Dr. Lúcia Regina Machado da Rocha**, duas pessoas maravilhosas e totalmente diferentes, que tive o imenso prazer de conhecer e conviver.

Antes de qualquer coisa, gostaria de registrar o quão difícil é escrever sobre elas (Faz muito tempo que estou tentando!). As palavras parecem não conseguir descrever o que sinto, então vou tentar transmitir parte desse sentimento.

Gostaria de iniciar confessando o imenso orgulho que tive ao escrever os nomes da minha orientadora e co-orientadora na capa de minha monografia! É extremamente gratificante trabalhar com pessoas que além de serem competentes e amarem o que fazem nos dão sincera liberdade para chamá-las de AMIGAS. E é por causa desse somatório de competência, amor e amizade, que elas são os exemplos que procuro cada dia me espelhar.

Às senhoras o MEU MUITO OBRIGADO, por terem me recebido de braços abertos no laboratório, por durante todo esse tempo terem me dado condições para que eu pudesse realizar um bom trabalho, por terem me ensinado muito sobre a vida e a ciência, por terem me aconselhado sempre de forma preocupada com meu desenvolvimento profissional e pessoal, por nunca terem me recriminado, até mesmo quando falhei, por terem me ensinado o significado e o valor do trabalho em GRUPO, por sempre estarem ao meu lado quando precisei, abrindo mão dos feriados e finais de semana para corrigir meus trabalhos, por todo incentivo, em fim, por terem me dado além de sua orientação, sua amizade e respeito.

Não poderia deixar de agradecer também, as pessoas que representam a segunda maior importância desse trabalho, os INTEGRANTES DO LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS...

... aos meninos do Lab: Thiago (**Mingo**), Hélio (**Pon-pon**) e Célio...

... às meninas do Lab: Raquel (**Pocotó**), Catarine (**Cat**), Patrícia (**Paty**), **Laísa**, Katharine (**Cat 2**), Flávia (**Kalose**), Marília (**Caca**), Sílvia (**Lecefê**), **Vânia**, **Liolana** e **Estela**...

... e especialmente à **Raquel**, que me ensinou muitas coisas com esses “quase 50 anos de experiência”! E também ao **Hélio**, pela a paciência ao ensinar (exceto no cálculo de Muco gástrico aderido!) e por toda a experiência compartilhada.

A todos vocês o MEU MUITO OBRIGADO por toda ajuda prática, por todo o aprendizado, por todas as risadas e também por todas as nossas diferenças, as quais me ajudaram a amadurecer. **Meus amigos**, vocês são responsáveis por essa conquista!

Ao **Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi**, por ter aceitado avaliar meu trabalho. É muito gratificante e valioso, para mim, receber críticas de um profissional competente e respeitado nessa área.

À **FAPESP**, que apoiou e financiou esse trabalho, concedendo-me uma bolsa de estudos de Iniciação Científica.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia: Luciana (**Lú**), Seu **Juninho e Janete**, e aos docentes e chefes do departamento, que em conjunto trabalham em função da organização e manutenção do departamento que me proporcionou toda a estrutura básica para desenvolver meu trabalho.

Aos funcionários da seção de graduação, que sempre me ajudaram com toda a burocracia, especialmente a **Fátima**, uma amiga, que sempre me atendeu com muito carinho e satisfação.

Aos meus pais **Edmiro Eduardo Ap. Ganev e Roseli Tápias Geraldo** por sempre acreditarem e apostarem em meu sucesso, financiando, auxiliando, cuidando e aconselhando cada passo meu que fora dado até hoje. A vocês devo uma vida inteira de muita alegria, inclusive essa. Meus exemplos de vida, carinho e respeito, essa conquista é nossa.

Aos meus irmãos Eduardo Geraldo Ganev (**Tetê**) e Ellienay Geraldo Ganev (**Lili**) por simplesmente completarem minha felicidade com a presença, carinho, respeito e cumplicidade.

Aos meus sogros José Carlos Teixeira (**Seu Zé**) e Aparecida Garcia Monteiro Teixeira (**Dona Cida**) pela a incansável torcida pelo meu sucesso e por toda a ajuda que sempre prestaram a mim e ao Guga durante esses anos.

Aos meus cunhados Adriana (**Dri**), Rafael (**Rafa**) e Paula (**Paulinha**), aos meus sobrinhos Filipe (**Filipão**) e Rafaela (**Rafinha**), e a minha concunhada Tatiane (**Tati**), por toda felicidade que trouxeram para minha vida. Vocês só me acrescentaram!

Ao grande amor da minha vida, **Prof. Dr. Gustavo Monteiro Teixeira** (ele vai me matar por isso, mas é uma verdade, um sonho realizado!), por ter feito parte de minha vida dando-me o prazer de, a cada dia, desfrutar do mais puro e bonito sentimento que Deus criou... O AMOR! A você, devo o melhor da minha vida e de mim! Sempre carregarei seu sorriso em minha mente, pois por muitos anos ele foi e continuará sendo o motivo da minha felicidade. EU AMO VOCÊ!!!

Sumário

1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	2
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	6
4.1 DROGAS UTILIZADAS	6
4.2 ANIMAIS	6
4.3 QUANTIFICAÇÃO DAS LESÕES	6
4.4 DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	7
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	9
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
6. CONCLUSÃO	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ANEXO I	I

1. RESUMO

As úlceras gástricas, além de representarem eventos patológicos comuns na clínica médica, são atualmente consideradas importantes desafios para a terapêutica, à medida que o tratamento e/ou prevenção dessa doença ainda apresentam limitações, como os efeitos adversos e a baixa qualidade de cicatrização. Outro grande problema é a difícil acessibilidade às terapias disponíveis pela população de baixa renda, devido ao seu alto custo. Considerando a problemática abordada, e levando em consideração que estudos têm mostrado que terpenóides têm apresentado atividade antiúlcera bastante significativa, propusemos investigar o efeito gastroprotetor do monoterpene Citral em úlceras gástricas experimentais induzidas tanto por etanol quanto por antiinflamatórios não esteroidais (utilizando a Indometacina como agente indutor das ulcerações), bem como avaliar seu efeito cicatrizante. O Citral mostrou ser gastroprotetor frente ao agente lesivo etanol, a partir da dose de 25 mg/kg, em uma relação dose-dependente quando administrado oralmente, sendo mais potente do que a Carbenoxolona, utilizada como controle positivo, a partir de uma dose duas vezes menor [dose de 50 mg/kg, na qual o Citral apresentou 98 % de proteção em relação ao controle negativo (Tween 80 a 8%), contra 85 % de proteção proporcionada pela Carbenoxolona na dose de 100 mg/kg]. No entanto, no modelo de indução de úlceras gástricas por Indometacina o Citral mostrou um efeito dual, ao passo que em doses intermediárias (25 e 50 mg/kg) apresentou efeito gastroprotetor, e em doses extremas (100 e 200 mg/kg) apresentou uma significativa potencialização das lesões, permitindo assim a hipótese de um possível efeito antiinflamatório e/ou antinociceptivo nessas doses. Também foi verificado seu efeito cicatrizante na dose de 25 mg/kg, sendo tão eficaz quanto o Lansoprazol (controle positivo) na dose de 30 mg/kg. A influência do Citral na quantidade de muco gástrico aderido, e o envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos e do óxido nítrico em sua ação antiúlcera também foram analisados. A ação antiúlcera proporcionada pelo Citral, na dose de 25 mg/kg, parece estar relacionada com sua capacidade de aumentar a quantidade de muco aderido em 52 % em relação ao grupo controle negativo (animais tratados apenas com o solvente das drogas – Tween 80 a 8%). No entanto, também depende da manutenção dos níveis do óxido nítrico e dos grupamentos sulfidrílicos. Além disso, constatou-se ausência de toxicidade em parâmetros macroscópicos, sugerindo segurança e eficácia em sua aplicação na terapia. Estes resultados indicam que o Citral é um efetivo agente de origem natural que possui ação citoprotetora sobre a mucosa gástrica ao combater agentes químicos lesivos à mucosa gástrica como etanol e antiinflamatórios não esteroidais, e que ainda exerce efetiva ação cicatrizante sobre a mucosa gástrica lesionada.

2. INTRODUÇÃO

Úlceras gástricas são lesões profundas que levam à necrose acometendo a mucosa e muscular do estômago, podendo ocorrer tanto de forma aguda quanto crônica (Barreto, 2008). Histologicamente a úlcera gástrica apresenta duas regiões distintas: a margem da úlcera, formada pela borda adjacente não necrosada, a qual delimita a área da lesão, e a base da úlcera, que é o tecido necrosado propriamente dito (Moraes, 2008).

Segundo Bertges *et al.*, (2006), as úlceras gástricas se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%). Com relação à sua origem, admite-se uma doença heterogênea, e apesar dos grandes avanços ocorridos para desvendá-la, a sua etiologia ainda não é totalmente conhecida. As hipóteses mais prováveis da etiopatogênese da doença ulcerosa agrupam fatores genéticos, distúrbios fisiopatológicos e fatores ambientais (Carvalho, 2000).

Independentemente de sua etiologia, assume-se que as doenças ulcerosas se desenvolvem quando há perda do balanço entre os fatores protetores e agressivos da mucosa, sendo que tais fatores agressivos podem ter tanto origem endógena como exógena. Dentre os principais fatores agressivos endógenos tem-se: ácido clorídrico, pepsina, refluxo de bile, O_2 , H_2O_2 , OH^- , O_2^- ; enquanto que entre os fatores agressivos exógenos mais freqüentes estão, o estresse, consumo crônico de álcool, antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), cigarros e infecção por *Helicobacter pylori* (Maity *et al.*, 2003).

Atualmente as doenças ulcerosas apresentam-se como eventos patológicos freqüentes na clínica médica. Bertges *et al.*, (2006) corroboram com isso ao afirmar que cerca de 20% dos moradores das grandes cidades, na atualidade, convivem com algum problema no estômago e/ou duodeno, ou seja, duas em cada dez pessoas sofrem de problemas que vão desde a indisposição passageira até a gastrite, úlcera e tumores. Aliado a isso, pesquisas recentes demonstram que o tratamento e/ou prevenção dessa doença ainda constituem importantes desafios para a terapêutica atual, à medida que os medicamentos disponíveis atualmente aplicadas para ambos os casos ainda apresentam limitações.

A farmacoterapia empregada na tentativa de proteger a mucosa gástrica do ácido gástrico, aumentar a cicatrização e prevenir a recorrência da úlcera, segundo Aihara *et al.*, (2003), geralmente é direcionada à redução dos fatores de agressão, promovendo a diminuição da secreção ácida. Segundo o autor, vários fármacos, como os antagonistas dos receptores histaminérgicos e colinérgicos, inibidores da bomba protônica ($H^+/K^+ATPase$) têm sido desenvolvidos, e muito deles ativamente utilizados para o tratamento de doenças gástricas.

No entanto, de acordo com Higuchi *et al.*, (2006), embora a introdução de antagonistas de receptores H_2 e de inibidores de bomba protônica tenha sido associada a um aumento na taxa de cura das úlceras, o alto índice de recidivas após os tratamentos levou a uma investigação da qualidade da

cicatrização das úlceras tratadas com estas drogas, e hoje se sabe que a redução dos fatores protetores da mucosa é um dos motivos responsáveis pela baixa qualidade de cicatrização das úlceras promovidas por tais substâncias.

Fan *et al.* (2005) afirmam em seu trabalho que um dos maiores problemas relativo à úlcera gástrica é que, embora a taxa de cicatrização com antagonistas H_2 e inibidor da bomba de prótons seja de 95% depois de uma terapia, a recorrência da úlcera dentro de 1 ano depois do término do tratamento está entre 65-80% e cerca de 100% após dois anos. Em adição, Szabo & Vincze (2000) relatam que úlceras cicatrizadas espontaneamente ou depois do uso de cimetidina são precariamente vascularizadas e têm de 2-3 vezes menos densidade de vasos sanguíneos novos do que no tecido normal ao redor, acreditando-se ser uma das razões da recorrência.

Além disso, o uso disseminado e por tempo prolongado, como normalmente requer a terapêutica com estes fármacos, tem permitido um acúmulo de informações que revelam a presença de efeitos colaterais. Os inibidores da bomba de prótons podem participar de interações com outros fármacos interferindo negativamente na ação terapêutica dos mesmos. Estudos recentes indicam um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer gástrico após o uso prolongado dos inibidores da bomba de prótons (Sousa *et al.*, 2002; Marcolin *et al.*, 2004; Ue *et al.*, 2007). Somado a isso Zlabek & Anderson, (2002) acusam reações adversas graves, como trombocitopenia, Ra & Tobe, (2004) citam a nefrite intersticial aguda, Fisher & Le Couteur, (2001) a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, Gonzalez *et al.* (2002) reações anafiláticas e Sabesin, (1993) ginecomastia e impotência.

Outro fator relevante e atual é o fato do mercado farmacêutico brasileiro ser composto por empresas multinacionais (70%) que vendem predominantemente (cerca de 90%) produtos de marca, originados a partir de pesquisas desenvolvidas em seus países, encarecendo os medicamentos e dificultando o seu uso pela população com baixa renda.

O tratamento das úlceras pépticas, dessa forma, constitui ainda um grande desafio e torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes, menos tóxicos e de custo mais baixo.

Segundo Schmeda-Hirschmann & Yesilada, (2005) e Mota *et al.*, (2009) dentre as diversas fontes de novas moléculas farmacologicamente ativas, as originárias de produtos naturais são consideradas fontes importantes para o tratamento da úlcera gástrica. Aliado a isso, estudos têm mostrado que substâncias de origem vegetal, dentre elas os terpenóides, têm apresentado atividade antiúlcera bastante significativa (Borrelli & Izzo, 2000; Rodriguez *et al.*, 2004 e Marques *et al.*, 2006).

Os terpenóides, assim designados devido ao fato de sua origem biossintética ser derivada de unidades de isopreno, constituem uma grande variedade de substâncias vegetais. Os compostos terpênicos mais frequentes são os monoterpenos (90 % dos óleos) e os sesquiterpenos (Cardoso *et*

al., 2000). O Citral é um aldeído monoterpênico que ocorre naturalmente em folhas e frutos de várias espécies de plantas incluindo, limões, limas, manjerição africano, laranjas e tomates (Fúria & Bellanca, 1975; Opdyke, 1979). Ele é uma mistura de dois isômeros geométricos, geraniol e nerol, e por causa de seu forte sabor e odor de limão é utilizado como condimento e aromatizante em comidas e cosméticos. O Citral também é utilizado como um intermediário químico na síntese de vitamina A, ionona e metilionona (Budavari, 1989).

A média diária de ingestão de Citral pelos humanos foi estimada em 5 mg/Kg (Conselho da Europa, 1974), e ele está presente em gomas de mascar, adoçantes, sorvetes de creme, e em bebidas com concentrações variando de 9 a 170 ppm (Opdyke, 1979).

O Citral tem demonstrado algumas atividades terapêuticas, tais como: ação antimicrobiana (Onawunmi, 1989; Davidson & Naidu, 2000), atividade antifúngica (Caccioni & Guizzardi, 1994), relaxante (Sadraei *et al.*, 2003) e anti-parasitária (Leung & Foster, 1993; Dikshit & Husain, 1984) no entanto, nada se tem a respeito de seu potencial antiulcerogênico.

Estudos têm mostrado que resíduos de frutas com grande potencial para serem usados como matéria prima de excelente qualidade pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de rações estão sendo descartados. Um dos principais responsáveis pelo grande desperdício da matéria prima em questão são as indústrias de suco, que de acordo com Vilas Boas *et al.*, (2001), descartam um volume médio de 45% dos frutos durante a obtenção dos sucos.

O óleo essencial de frutas cítricas, constituído de uma mistura natural de diversos aldeídos, dentre eles o Citral (Klavons *et al.*, 1994), pode ser encontrado, de acordo com Mendonça *et al.* (2006), nesse volume que é descartado. No entanto, a falta de informação a respeito de suas características está contribuindo para o desperdício de matéria prima, assim como para a estagnação do conhecimento terapêutico de tais óleos e seus compostos.

Por tanto, o desenvolvimento de pesquisas que ofereçam uma alternativa para o tratamento de doenças fazendo uso de um material que por sua vez é descartado constitui uma importante alternativa para aumentar o acesso da população aos medicamentos, bem com oferecer novas opções terapêuticas, e também justificar e incentivar o aproveitamento dos resíduos industriais, aumentando deste modo o espectro do conhecimento das propriedades terapêuticas do Citral, e a qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o efeito cicatrizante e gastroprotetor do monoterpeneo Citral em modelos experimentais *in vivo*, bem como avaliar a participação dos Grupamentos Sulfidrílicos (SH), Óxido Nítrico (NO) e de muco aderido na gastroproteção deste composto.

Sendo assim, os objetivos específicos deste projeto foram:

- 1) Avaliação da atividade antiulcerogênica do Citral em modelos experimentais de úlcera induzida por dois diferentes agentes (AINEs e Etanol);
- 2) Estudo de alguns mecanismos de ação antiulcerogênicos, em modelos experimentais *in vivo*, os quais caracterizam o efeito gastroprotetor do Citral, e
- 3) Avaliação do efeito cicatrizante e da eficácia e qualidade da cicatrização do Citral em relação a algumas drogas utilizadas na terapêutica atual.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Drogas utilizadas

Cada prática experimental apresentou seus respectivos grupos controles negativo (Tween 80 a 8%) e positivo (Carbenoxolona, Cimetidina ou Lansoprazol), e o grupo teste (tratados com Citral em doses variadas), conforme o modelo. Todas as drogas foram solubilizadas em Tween 80 a 8% e administradas em dose/volume de 10 mL/kg. As drogas utilizadas, incluindo o Tween, foram adquiridas industrialmente pela empresa Sigma Aldrich.

4.2 Animais

Para os procedimentos experimentais foram utilizados ratos jovens (50 dias) Wistar machos provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu. Os animais foram divididos em grupos ($n = 7 - 9$) de acordo com o modelo experimental, mantidos em gaiolas metabólicas para evitar coprofagia, e em sala climatizada sob temperatura de 23 ± 2 °C e ciclo de claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi efetuado com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum* e, quando em jejum os animais foram privados apenas de ração por um período de no máximo 24 horas. Todas as práticas experimentais foram executadas de acordo com os protocolos experimentais aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu através dos protocolos n. 227 – CEEA, n. 231 – CEEA e n. 18/05 – CEEA.

4.3 Quantificações das lesões

As lesões foram analisadas através do programa AVSoft Bioview Spectra, exceto no modelo de indução de úlcera por ácido acético (modelo cicatricial). No programa foi medida a área ulcerativa e a área glandular total dos estômagos analisados. Com os valores de área obtidos, foram então calculadas as proporções de lesão (áreas ulcerativas / área glandular total dos estômagos), visto que os estômagos dos animais diferem em tamanho.

As áreas ulcerativas induzidas por ácido acético são provocadas de forma aproximadamente circular. Para determinar essas áreas, após os tratamentos, primeiramente são realizadas duas medições (perpendiculares entre si) de seu diâmetro, utilizando para isso um paquímetro digital. A média dessas medidas é então calculada, sendo que a metade desse valor médio representa o raio médio da úlcera. Por fim, a área ulcerativa é obtida multiplicando-se o quadrado do raio médio por π (aproximadamente 3,14).

4.4 Descrição dos procedimentos experimentais

4.4.1 Avaliação da atividade gastroprotetora do Citral

a) Úlceras gástricas induzidas por Etanol (Morimoto *et al.*, 1991)

Os ratos foram tratados oralmente, após 12 h de jejum, com o Citral em doses variáveis (12.5, 25, 50, 100 e 200 mg/kg), com 100 mg/kg de carbenoxolona, ou Tween 80 a 8%, uma hora antes da indução das lesões gástricas pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto. Após 1 h da indução, os animais foram mortos e os estômagos retirados e abertos ao longo da maior curvatura para contagem da área ulcerativa.

b) Úlceras gástricas induzidas pelo uso de AINEs (Guidobono *et al.*, (1997) com modificações)

Após 12 h de jejum, os ratos dos diferentes grupos experimentais, foram tratados com o Citral em doses variáveis (12.5, 25, 50, 100 e 200 mg/kg), com 100 mg/kg de cimetidina ou Tween 80 a 8%. Trinta minutos após o tratamento, as lesões foram induzidas por administração oral de 10 mL/kg da Indometacina (AINEs), solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5% na dose de 50 mg/kg. Os animais foram mortos 6 h após a administração da Indometacina e os estômagos retirados e abertos ao longo da maior curvatura e longitudinalmente para contagem das lesões.

4.4.2 Estudo de alguns mecanismos de ação antiulcerogênicos

a) Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção (Matsuda *et al.*, (1999) com modificações)

Ratos sob jejum de 12 h foram divididos em grupos de acordo com os pré-tratamentos + tratamentos recebidos (Salina + Tween, L-NAME + Tween, Salina + Lansoprazol, L-NAME + Lansoprazol, Salina + Citral e L-NAME + Citral). Os grupos controles abrangeram todos os animais pré-tratados com solução salina (injeção subcutânea de 10 mL/kg), e os grupos teste, todos os animais pré-tratados com N^o-nitro-L-arginina metil éster [(L-NAME), um inibidor da óxido nítrico sintase, análogo da L-arginina] na dose de 70 mg/kg. Após 30 minutos de realizado os pré-tratamentos os grupos receberam por via oral os tratamentos Tween 80 a 8%, Lansoprazol (30 mg/Kg) ou Citral (25 mg/Kg). Depois de uma hora, os animais receberam por via oral 1mL de etanol para indução da ulceração. Decorrida 1 hora da indução da úlcera, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos para contagem das lesões.

b) Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na citoproteção (Matsuda *et al.*, 1999 com modificações)

Ratos sob jejum de 12 h foram divididos em grupos de acordo com os pré-tratamentos + tratamentos recebidos (Salina + Tween, NEM + Tween, Salina + Lansoprazol, NEM + Lansoprazol, Salina + Citral e NEM + Citral). Os grupos controles abrangeram todos os animais pré-tratados com solução salina (injeção subcutânea de 10 mL/kg), e os grupos teste, todos os animais pré-tratados com *N-etilmaleimida* [(NEM), um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos] na dose de 10 mg/kg. Após 30 minutos de realizado os pré-tratamentos os grupos receberam por via oral os tratamentos Tween 80 a 8%, Lansoprazol (30 mg/Kg) ou Citral (25 mg/Kg). Depois de uma hora, os animais receberam por via oral 1mL de etanol para indução da ulceração. Decorrida 1 hora da indução da úlcera, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos para contagem das lesões.

c) Determinação de Muco aderido a parede gástrica (Rafatullah *et al.*, 1990)

Os animais, depois de submetidos a 24 horas de jejum, receberam por via oral Citral na dose de 25 mg/kg, Tween 80 a 8%, ou Carbenoxolona na dose de 200 mg/kg. Uma hora depois, sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura do piloro duodenal. Decorridas 4 horas da amarradura, os animais foram mortos e a porção glandular separada, pesada e imersa em solução de Alcian Blue para o procedimento de quantificação de muco. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 598 nm e os resultados expressos em mg de Alcian Blue/g de tecido.

4.4.3 Avaliação do efeito cicatrizante do Citral

a) Avaliação do efeito cicatrizante do Citral em úlceras gástricas induzidas por ácido acético (Okabe *et al.*, 1969 com modificações feitas por Konturek *et al.*, 1988)

Os ratos foram anestesiados para a realização de uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide. A parede anterior do estômago foi exposta e, 70 µl de ácido acético a 80% foram postos em contato com a camada submucosa da junção do fundo com o antro por aproximadamente 20 segundos, com auxílio de uma ponteira plástica. Um dia após a operação iniciou os tratamentos, por via oral, diários (1 x por dia durante 3, 7 e 14 dias) com 25 mg/kg do Citral, 30 mg/kg do Lanzoprazol ou Tween 80 a 8%, dependendo do grupo. Ao final do tratamento, os animais foram mortos e seus estômagos removidos e abertos no sentido da maior curvatura para determinação da área ulcerativa. No experimento que utilizou 14 dias de tratamento, foram realizadas medições

diárias do peso corporal dos animais para determinar possíveis efeitos tóxicos observáveis através da evolução do peso corporal. Os órgãos (coração, fígado, rins, pulmão e baço) também foram retirados e pesados para análise de normalidade.

b) Toxicidade sub-aguda

A análise toxicológica consistiu em avaliar estatisticamente a evolução do peso corporal dos animais dos diferentes grupos, analisar a morfometria dos órgãos, analisar alterações comportamentais e mortalidade, e comparar estatisticamente os valores de arco seno do peso do órgão / peso total do animal de todos os animais pertencentes aos diferentes grupos.

4.5 Análise estatística

Assumindo-se distribuições paramétricas, as comparações entre dois conjuntos de dados foram realizadas por meio de teste t , e as comparações entre três ou mais conjuntos de dados foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett ou Tukey. Diferenças significativas foram consideradas para valores de P menores que 0,05. Os símbolos * indicam $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial antiulcerogênico do Citral foi avaliado por dois indutores de úlcera, os quais representam as principais causas de úlcera gástrica na atualidade (etanol e AINEs). Para tanto, utilizou-se os modelos de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto e Indometacina. Tais modelos além de envolverem diferentes agentes indutores, apresentam mecanismos distintos, os quais nortearão o estudo dos possíveis mecanismos envolvidos na ação antiúlcera do monoterpene Citral.

O modelo de indução de úlceras gástricas por etanol absoluto em ratos constitui a primeira etapa da pesquisa de substâncias com propriedade antiúlcera, pois além de fornecer informações da efetividade da droga testada frente a esse modelo, também determina a menor dose-efetiva, a qual será utilizada nas investigações de seu possível efeito curativo (modelos cicatriciais), e dos mecanismos de ação envolvidos em sua ação antiulcerogênica.

Os resultados obtidos, nesse modelo, mostraram o efeito gastroprotetor do Citral frente ao agente lesivo etanol com uma relação de proporcionalidade dose-efeito, cuja menor dose-efetiva obtida foi a de 25 mg/kg, apresentando 57% de gastroproteção. As porcentagens de gastroproteção proporcionadas pelo Citral em relação ao controle negativo, em ordem decrescente de doses, foram: 100, 100, 98, 57 e 16%, sendo essa última, referente à dose de 12.5 mg/kg, estatisticamente não significativa (figura 1).

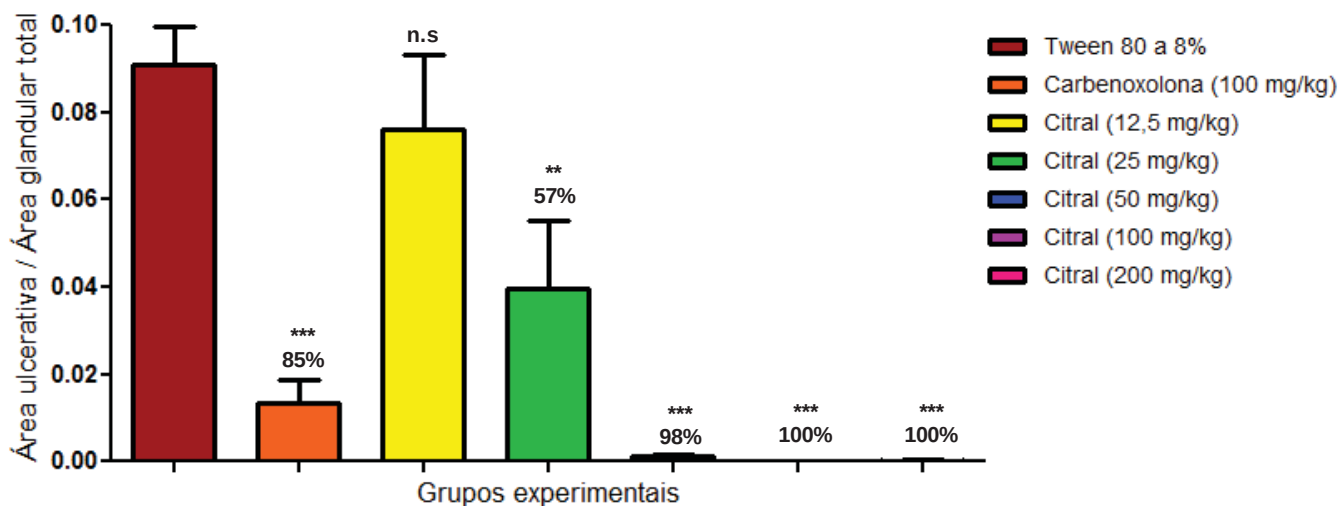


Figura 1: Resultados obtidos da área ulcerativa / área glandular total, no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). ANOVA seguida de Dunnett, comparado ao grupo controle negativo, n.s indica diferenças estatísticas não significativas, * indica $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$. Os resultados de gastroproteção estão indicados na forma de porcentagens.

Devido ao fato de nosso interesse encontrar-se alicerçado na busca de substâncias de origem natural que ofereçam, em doses iguais ou menores, equivalente ou superior efeito gastroprotetor do que o proporcionado pelas drogas sintéticas, a potência e eficácia do Citral em relação à Carbenoxolona, utilizada como controle positivo, também foram analisadas. O Citral se revelou mais

eficaz, à medida que foi capaz de proporcionar maior gastroproteção quando administrado na mesma dose utilizada nos tratamentos com a Carbenoxolona (dose de 100 mg/kg, na qual o Citral proporcionou 100% de proteção contra 85% proporcionado pela a Carbenoxolona), e mais potente no sentido de que, a partir de uma dose duas vezes menor foi capaz de oferecer maior efeito protetor (dose de 50 mg/kg, oferecendo 98% de proteção, contra 85 % proporcionado pela Carbenoxolona na dose de 100 mg/kg).

O efeito ulcerogênico do etanol na mucosa gástrica é reportado como sendo devido a sua ação necrotizante sobre a mucosa. Segundo Sikiric *et al* (1997), o etanol quando administrado em altas concentrações causa danos cáusticos, que possibilitam que as lesões penetrem profundamente no plexo vascular ocasionando estase, ruptura da parede dos vasos sanguíneos, favorecendo hemorragia e necrose da mucosa.

Com o intuito de investigar os mecanismos ulcerogênicos atribuídos ao etanol, pesquisadores têm se voltado ao estudo de sua influência sobre a barreira de muco-bicarbonato, bem como sobre as funções fisiológicas das células do epitélio gástrico. Szabo & Brown (1987) atribuíram ao etanol a capacidade de dissolução dos constituintes do muco gástrico, o que por sua vez, provoca a perda da função de barreira protetora, permitindo a origem de lesões e mudanças na diferença de potencial celular causada por uma retro-difusão de íons H^+ . Corroborando com esse estudo, Repetto & Llesuy (2002) observaram que o etanol diminui os grupamentos sulfidrílicos das células, que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica. Segundo Salim (1992) e Avilla *et al.* (1996), os grupamentos sulfidrílicos endógenos, presentes no muco gástrico, constituem agentes importantes na produção e manutenção do muco, uma vez que suas subunidades glicoprotéicas são unidas entre si por pontes dissulfeto que, uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel.

Visto que a atividade do etanol na origem de úlceras relaciona-se diretamente com a redução da barreira de muco podemos propor que a ação gastroprotetora promovida pelo Citral pode estar relacionada com uma possível capacidade de aumento da quantidade de muco aderido proporcionado por esse monoterpeno, o que por sua vez dificultaria o contato do etanol com o epitélio gástrico protegendo-o. É sabido que a camada de muco aderente contínua funciona como uma barreira contra a pepsina do lúmen, protegendo a mucosa adjacente da digestão proteolítica (Allen & Flemstrom, 2005).

A fim de confirmar essa hipótese, foi realizada a quantificação do muco gástrico aderido com a menor dose efetiva do Citral. A figura 2 traz os resultados obtidos da taxa de aumento da quantidade de muco aderido em relação ao grupo controle negativo. Podemos notar que o Citral aumenta de maneira significativa (52%) a quantidade de muco gástrico aderido, o que por sua vez valida a hipótese anteriormente levantada.

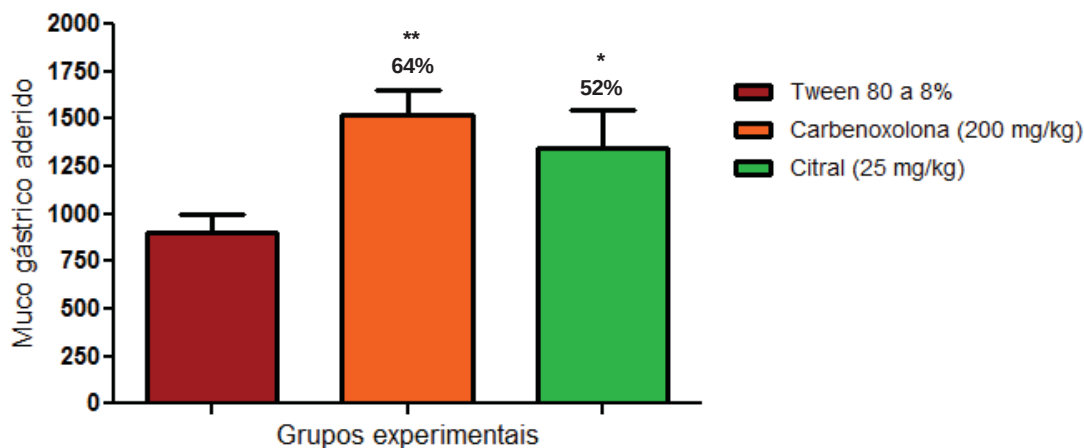


Figura 2: Resultado obtidos da quantidade de muco gástrico aderido, expresso em mg de Alcian Blue / g de Tecido (média $\pm$ e.p.m). ANOVA seguida de Dunnett, comparado ao grupo Controle negativo, * indica $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$. Resultados percentuais de aumento da quantidade de muco gástrico aderido em relação ao grupo controle negativo.

Em análise seguinte, por meio de Tukey, comparamos a taxa de aumento da quantidade de muco proporcionada pelo o Citral com a proporcionada pela Carbenoxolona, não sendo constatadas quaisquer diferenças estatísticas significativas. Tal fato mostra que o Citral em uma dose 4 vezes menor proporciona um aumento da quantidade de muco aderido equivalente ao da droga padrão utilizada.

Embora a análise do aumento da quantidade de muco aderido tenha sido feita apenas para a menor dose efetiva do Citral (25 mg/kg), não se descarta a hipótese desse aumento se dar de forma dose-dependente, visto que sua gastroproteção é obtida de maneira proporcional a dose administrada.

É sabido que o etanol não proporciona seu efeito lesivo apenas por diminuição da função da barreira de muco. Outros fatores importantes, como o estresse oxidativo, também participam desse processo. Recentemente Gazzieri *et al.* (2007), demonstraram que o etanol ativa receptores TRPV1 em neurônios sensoriais da mucosa gástrica, estimulando a liberação de substância P no estômago. A substância P ativa receptores NK1 das células epiteliais gástricas promovendo o aumento de espécies radicalares (estresse oxidativo), que por sua vez provocam lesões hemorrágicas na parede do estômago decorrentes da peroxidação lipídica, e segundo Bayir *et al.* (2006), podem levar a formação de câncer como consequência de mutação gênica. Somado a isso, segundo Hernandez-Munoz *et al.* (2000) o consumo de etanol diminui significativamente a disponibilidade de fatores antioxidantes como a Glutathione (GSH), induzindo desse modo ao estresse oxidativo e consequentemente provocando lesões.

Alguns estudos indicam que os grupamentos sulfidrílicos endógenos, além de estarem presentes no muco gástrico, fazem parte da defesa antioxidante do organismo, à medida que são constituintes básicos de alguns fatores antioxidantes não-enzimáticos como a Glutathione (GSH), e várias enzimas do sistema xantina-oxidase. Com base no exposto, uma hipótese levantada foi de que

se uma determinada substância exerce gastroproteção de forma dependente desses compostos, ela pode caracterizar-se como sendo uma substância antioxidante, visto que pode estar ligada com a produção desses fatores antioxidantes, seja estimulando sua síntese, seja favorecendo as condições para tal.

A fim de verificar a possibilidade de um efeito antioxidante bem como o envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção do Citral, avaliamos seu efeito gastroprotetor em úlceras gástricas induzidas por etanol em animais pré-tratados com NEM, um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos, bem como em animais pré-tratados com salina, utilizando-se para isso ANOVA seguida de Dunnett.

Pudemos observar gastroproteção significativa (58%) do Citral em animais pré-tratados com salina, no entanto, nos animais pré-tratados com NEM constatamos a não efetividade do Citral na proteção da mucosa. Tais resultados demonstram que a depleção dos grupamentos sulfidrílicos pelo NEM resultou na perda da gastroproteção anteriormente promovida pelo Citral nessa dose (figura 3).

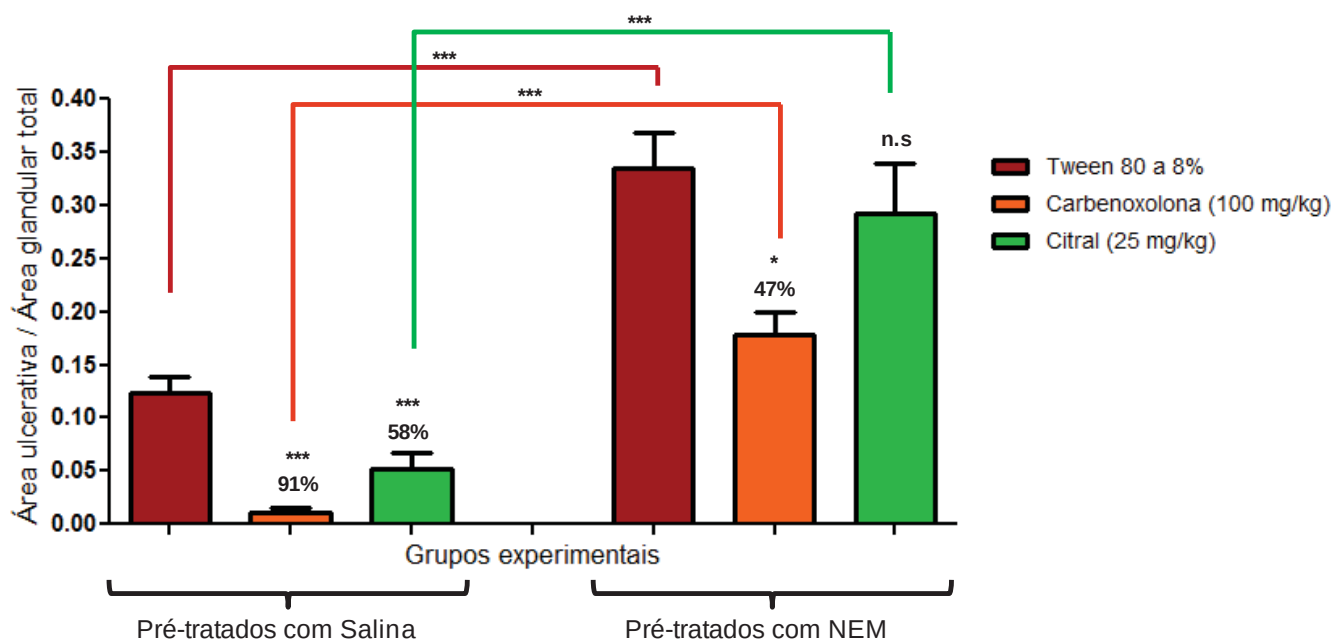


Figura 3: Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção do Citral na dose de 25 mg/kg. Valores de média $\pm$ e.p.m da área ulcerativa / área glandular total. Realizada ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett e Tukey, onde os grupos experimentais foram comparados ao grupo controle negativo. n.s indica diferenças estatísticas não significativas, * indica $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$. Os valores percentuais indicam a gastroproteção proporcionada em relação ao controle negativo.

Deste modo, podemos afirmar que os efeitos do Citral sobre a mucosa gástrica não somente estão ligados à manutenção dos níveis como também são dependentes dos grupamentos sulfidrílicos. Este dado também reforça a idéia de um possível mecanismo antioxidante envolvido na gastroproteção promovida pelo Citral. Porém, somente estudos que caracterizem as quantificações de enzimas antioxidantes poderiam comprovar essa propriedade do Citral.

A gastroproteção do monoterpene Citral, como dito anteriormente, também foi investigada frente às úlceras gástricas induzidas por AINEs através do modelo de indução de úlceras gástricas por Indometacina. Por meio de ANOVA seguida de Dunnett, onde todos os grupos foram comparados ao grupo controle negativo, o Citral não apresentou efeito gastroprotetor em nenhuma das doses testadas, embora tenhamos obtido altos valores de proteção para as doses de 25 e 50 mg/kg (64 e 57 % de gastroproteção, respectivamente). Por outro lado, nas doses extremas de 100 e 200 mg/kg ele demonstrou um significativo agravamento das lesões (232 e 312 %, respectivamente), conforme demonstrado através da figura 4.

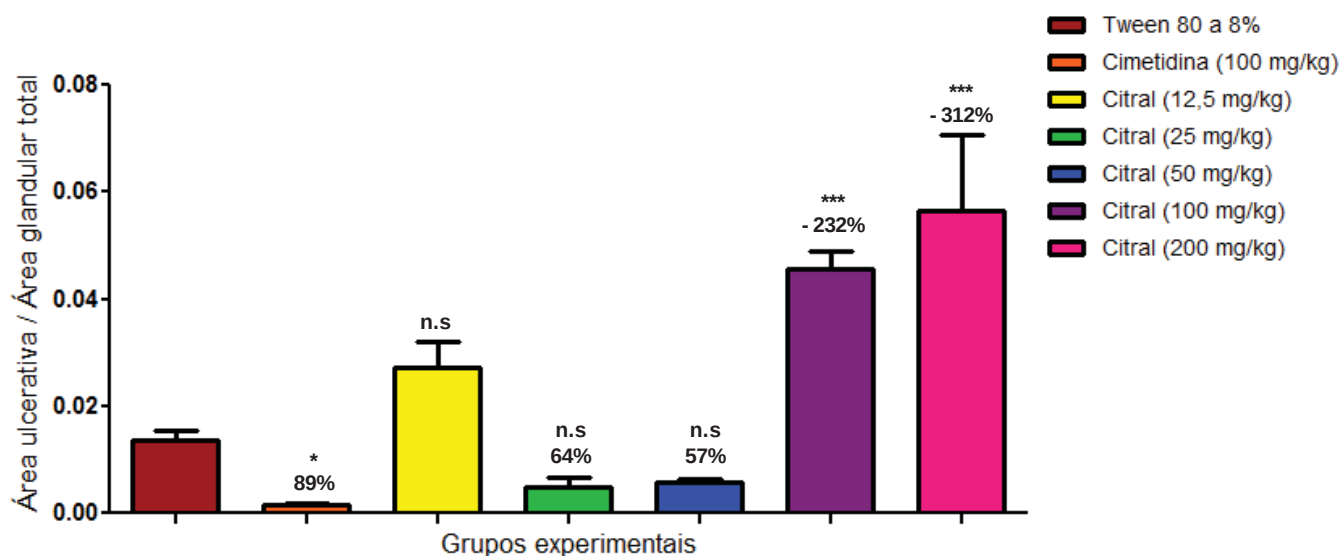


Figura 4: Resultados obtidos da área ulcerativa / área glandular total, no modelo de indução de úlcera gástrica por Indometacina, expressos na forma de média ± e.p.m. ANOVA seguida de Dunnett, comparado ao grupo controle negativo, n.s indica diferenças estatísticas não significativas, * indica $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$. Os resultados de gastroproteção, indicados na forma de porcentagens, foram obtidos comparando as médias obtidas com a do grupo controle negativo.

Os dados de gastroproteção obtidos nas doses de 25 e 50 mg/kg do Citral também foram comparados, por meio do teste t , com o grupo controle negativo. Essa análise foi realizada embasada na possibilidade da existência de um possível “efeito mascarador” da significância da gastroproteção proporcionada pelo o Citral nessas doses, devido ao fato de termos um grande número de animais e valores muito discrepantes de área ulcerativa/área glandular total entre os grupos. Pudemos constatar, através dessa análise, uma diferença significativa entre tais grupos ($P < 0,05$), e com isso pudemos revelar além de um efeito agravante, como já demonstrado por Dunnett, um efeito gastroprotetor do Citral em úlceras gástricas experimentais induzidas por Indometacina.

Frente aos resultados obtidos, discute-se o comportamento dual apresentado pelo Citral, no sentido de que, em doses intermediárias (25 e 50 mg/kg) ele apresentou efeito gastroprotetor, e em doses elevadas (100 e 200 mg/kg) um significativo agravamento das lesões.

Sabendo que as úlceras gástricas provocadas pelo o consumo de AINEs ocorrem devido a sua capacidade de inibição das ciclooxigenases, promovendo a diminuição da produção de prostaglandinas responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica através da inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco e bicarbonato, inibição da ativação de mastócitos, diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular, inibição apoptótica, aumento e manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa (Atay *et al.*, 2000), e que as prostaglandinas estão relacionadas com a indução e manutenção do processo inflamatório e nocicepção. Podemos sugerir um possível efeito anti-inflamatório e/ou antinociceptivo do Citral nessas doses, embasados na hipótese do Citral ser capaz de reduzir os níveis desses prostanóides, quando administrados de forma concomitante aos AINEs, ao ponto de superar qualquer mecanismo gastroprotetor, até mesmo os que por ele são aumentados e/ou mantidos, contribuindo dessa forma para o agravamento das lesões ulcerosas.

Tal hipótese vem sendo estudada e confirmada, em trabalhos realizados em nosso laboratório, através de testes pré-clínicos como o de indução de dor através da administração intraplantar de Formalina. Este teste avalia a atividade antinociceptiva de uma droga em duas diferentes fases: neurogênica, relacionada com receptores periféricos de dor; e a inflamatória, relacionada com a dor da resposta inflamatória. Nesse experimento o Citral inibiu a dor, em relação ao grupo controle negativo, nas doses de 100 e 200 mg/kg (na dose de 100 mg/kg observou-se atividade apenas na fase inflamatória com 40,6% de inibição, e na dose de 200 mg/kg observou-se efeito tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória, com 44.20% e 46.04% da inibição da dor, respectivamente). Na dose de 50 mg/kg do Citral diferenças estatísticas significativas não foram obtidas (comunicação pessoal Nishijima, 2010). Embora tais resultados corroborem com os obtidos nesse trabalho reforçando desta maneira a hipótese levantada, não podemos descartar a possibilidade de o Citral ser capaz de potencializar as lesões por intermédio de outro mecanismo que não seja a depleção desses prostanóides. Portanto, para que possamos elucidar essas questões necessitamos estudar o envolvimento do Citral com os níveis desses prostanóides, quantificando-os.

Com relação à diminuição das ulcerações ocorrida nas doses de 25 e 50 mg/kg, podemos sugerir que embora o Citral de alguma forma seja capaz de potencializar as lesões, nessas doses há uma compensação proporcionada pelo aumento de outros fatores protetores, como por exemplo o muco gástrico aderido e ativação de fatores antioxidantes.

Além de um efeito gastroprotetor, investigou-se também um possível efeito cicatrizante do Citral, na dose de 25 mg/kg, através do modelo crônico de indução de úlceras gástricas por ácido acético, sendo realizados para isso, tratamentos durante 3, 7 e 14 dias. Pudemos constatar seu efeito cicatrizante a partir de 7 dias de tratamento, onde o Citral propiciou 35 % de diminuição da área ulcerosa (figura 5).

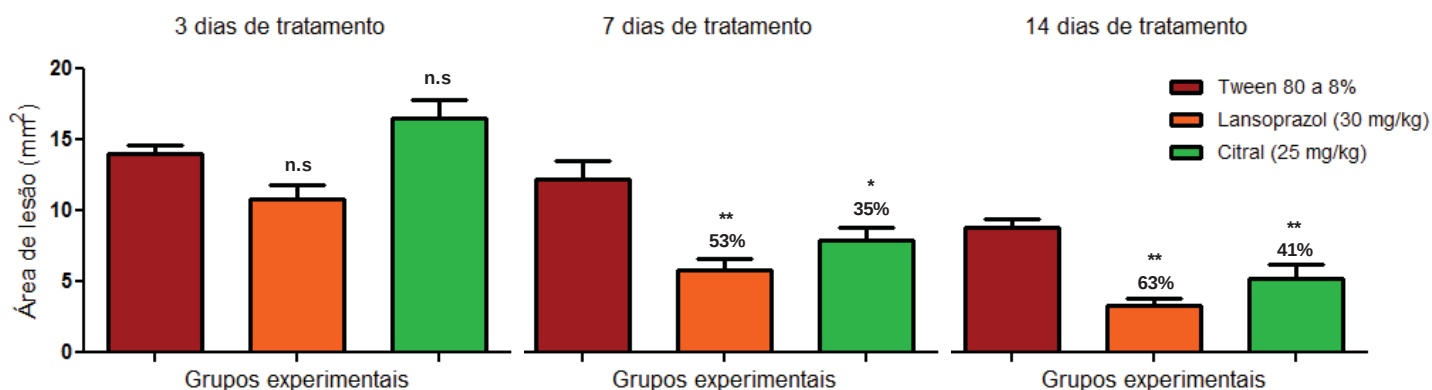


Figura 5: Efeito cicatrizante do Citral na dose de 25 mg/kg, realizados os tratamento com 3, 7 e 14 dias. Valores expressos na forma de média $\pm$ e.p.m da área de lesão. Análise realizada por ANOVA seguida de Dunnett, onde os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle negativo. n.s indica diferenças estatísticas não significativas, * indica $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$. Os percentuais indicam a redução da área lesionada em relação ao grupo controle negativo.

Com 3 dias de tratamento, após a formação da lesão, o Citral e o Lansoprazol não demonstraram qualquer cicatrização. Isso se deve ao fato de que no período de 0 – 3 dias, de acordo com (Schmassmann, 1998), ainda está ocorrendo à instalação da úlcera e do processo inflamatório, que por sua vez é essencial no processo cicatricial. Após os 7 e 14 dias de tratamento, período de rápida cicatrização segundo o mesmo autor, tanto o Citral quanto o Lansoprazol exerceram efetiva cicatrização sobre a mucosa gástrica lesada.

Em adição, a cicatrização constatada nos animais tratados com Citral foi comparada à dos animais do Controle positivo (Lansoprazol na dose de 30 mg/kg), por meio de Tukey, não mostrando-se diferente estatisticamente, embora tenham demonstrando uma menor porcentagem tanto com 7 quanto 14 dias de tratamento (Com 7 dias o Citral proporcionou 35% de efeito cicatrizante enquanto que o Lanzoprazol proporcionou 53%, e com 14 dias o Citral proporcionou 41% de gastroproteção e o Lansoprazol 63%). Esse resultado nos permite dizer que o Citral é tão eficaz quanto o Lansoprazol no processo cicatricial.

Como já discutido, o Citral aumenta a quantidade de muco gástrico aderido, na dose de 25 mg/kg, de maneira estatisticamente significativa, e segundo Daí *et al.* (1986), o muco também exerce um papel importante na cicatrização das úlceras, visto que o aumento na taxa de secreção torna o processo de recuperação da ulceração mais rápido. Logo, podemos propor que ele exerça papel fundamental tanto na ação gastroprotetora quanto cicatrizante via aumento da quantidade de muco aderido.

O modelo crônico de indução de úlceras por ácido acético, além de propiciar uma simulação da ulceração nos humanos, e ação cicatrizante de um novo medicamento antiúlcera, é capaz de avaliar os possíveis efeitos tóxicos cumulativos do novo medicamento devido a utilização sub-aguda, por 14 dias. Portanto, a realização desse modelo experimental também avaliou parâmetros

macroscópicos de toxicidade, como evolução do peso corporal, mortalidade, e normalidade dos órgãos (coração, pulmões, fígado, rins e fígado). Em todos os parâmetros toxicológicos analisados, o Citral não demonstrou alterações quando comparado ao grupo controle negativo (resultados demonstrados no Anexo I).

Por fim, também foi verificado um possível envolvimento do óxido nítrico (NO) na gastroproteção do Citral, utilizando para isso o L-NAME. Segundo Pfeiffer *et al.*, (1996), o L-NAME é hidrolizado em L-nitroarginina, que inativa a óxido nítrico sintase, fazendo com que as úlceras induzidas pelo etanol sejam agravadas (Kawano & Tsuji, 2000). Assim como no modelo utilizando o NEM, também foi observado inibição do efeito protetor do Citral sobre a mucosa gástrica.

A figura 6 mostra os resultados obtidos por meio ANOVA seguida de Dunnett. Nota-se que o efeito gastroprotetor do Citral, na dose de 25 mg/kg, frente as úlceras gástricas induzidas por etanol, foi abolido quando administrado o L-NAME. Isso nos mostra que a ação do Citral está ligada não só a manutenção dos níveis como também depende do NO.

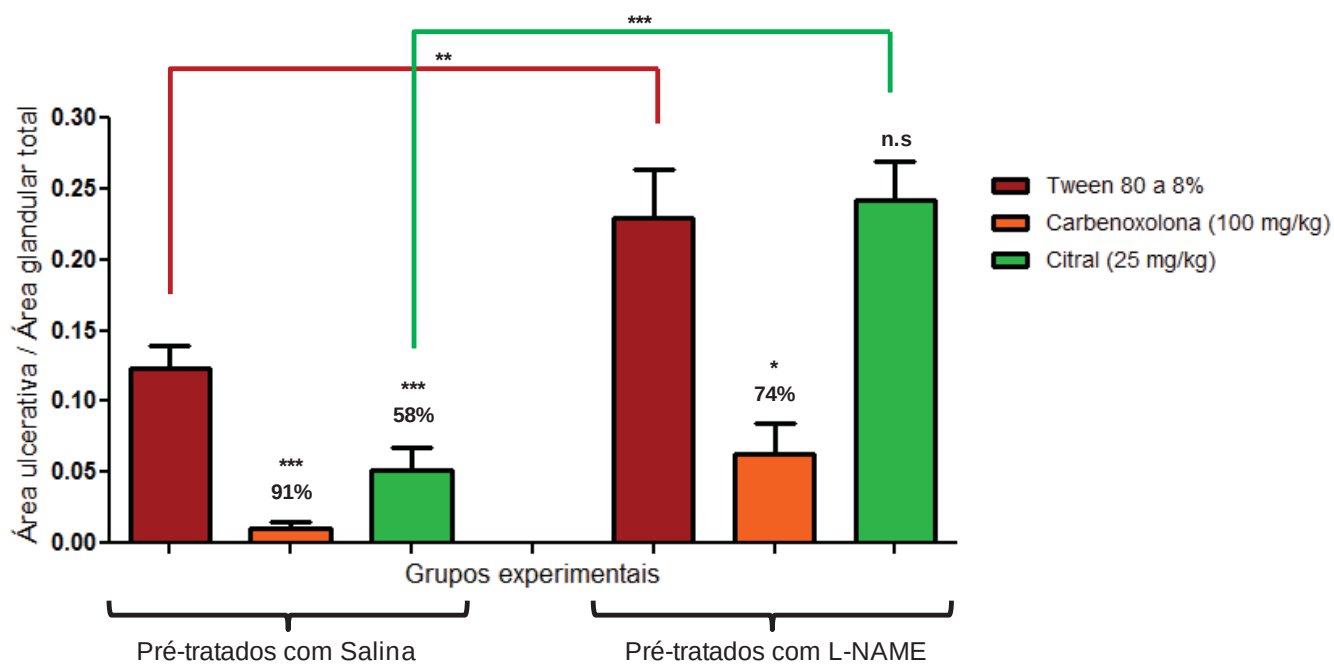


Figura 6: Envolvimento do Óxido Nítrico na gastroproteção do Citral na dose de 25 mg/kg. Valores de média $\pm$ e.p.m da área ulcerativa / área glandular total. Realizada ANOVA seguida de teste a *posteriori* de Dunnett e Tukey, onde os grupos experimentais foram comparados ao grupo controle negativo. n.s indica diferenças estatísticas não significativas, * indica $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$. Os valores percentuais indicam a gastroproteção proporcionada em relação ao controle negativo.

Frente aos dados obtidos, podemos concluir a possibilidade de que um dos efeitos gastroprotetores do Citral esteja ligado ao aumento da liberação de NO. Neste contexto, o aumento de muco poderia ser explicado, visto que o NO ativando a guanilato ciclase, aumenta o GMPc (Kim e Hwan Kim, 2001), que está envolvido na síntese e secreção de muco (Flemström & Turnberg, 1984; Jansson *et al.*, 2007).

Outra hipótese seria que o envolvimento do NO na gastroproteção do Citral poderia estar ligado a mecanismos antioxidantes, visto que alguns autores demonstraram que a redução de ânions superóxido favorece a estabilização do NO (Pechanova & Simko, 2007).

Independente do mecanismo de ação sabe-se que a liberação local de NO contribui para a manutenção da integridade do trato gastrintestinal, através da regulação de várias funções (Sugamoto *et al.*, 2001). O NO atua no controle da secreção ácida e alcalina, no fluxo sangüíneo da mucosa gástrica, na secreção de muco gástrico (Bayir *et al.*, 2006), e também no processo cicatricial (Jadeski & Lala, 1999).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o Citral é bastante promissor para a utilização em terapias preventivas ou tratamentos cicatriciais de úlceras gástricas, ao passo que é um efetivo agente de origem natural que possui ação citoprotetora sobre a mucosa gástrica ao combater agentes químicos lesivos como etanol e AINES, e que ainda exerce efetiva ação cicatrizante sobre a mucosa lesionada. Tais resultados também comprovam que a ação antiúlcera do Citral se dá através do aumento da quantidade de muco, fortalecimento da barreira mucosa gástrica pelos grupamentos sulfidrílicos endógenos, que reestruturam a barreira de muco, e também a presença do Óxido Nítrico que pode atuar como barreira antioxidante. Além disso, constatou-se ausência de toxicidade em parâmetros macroscópicos, sugerindo segurança e eficácia em sua aplicação na terapia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aihara, T., Nakamura, E., Amagase, K., Tomita, K., Fujishita, T., Furutani, K., & Okabe, S., 2003. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 98, p. 109-127.

Allen, A., Flemström, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American journal of physiology. Cell Physiology*. 288(1), 1-19.

Atay, S., Tarnawski, A.S., & Dubois, A., 2000. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins & other Lipids Mediators*, v. 61, p. 105-124.

Avilla, J.R., De La Lastra, C.A., Martin, M.J., Motilva, V., Luque, I., Delgado, D., Esteban, J., Herrerias, J., 1996. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.*, 45(2): 83-88.

Barreto, A.L.S., 2008. Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, UNIT, Aracaju, SE, Brasil.

Bayir, Y., Odabasoglu, F., Cakir, A., Aslan, A., Suleyman, H., Halici, M., Kazaz, C., 2006. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 13(8): 584-590.

Bertges, L.C., Barreto, B.B., Resende, J.A. Magalhães, J. C., Almeida, T.V., 2006. Efeito do suco de limão na prevenção das lesões gástricas induzidas pelo Diclofenaco Sódico In: Resumos - XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica – UFJF. Diretório Acadêmico de Ciências Biológicas - Walter Machado Couto.

Borrelli, F & Izzo, A.A., 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother, Res* 14: 581 – 591.

Budavari, S., 1989. The Merck Index. Merck and Company, Rahway, NJ, 11th ed., p. 362. Caccioni, D.R.L., Guizzardi, M., 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetables post-harvest pathogenic fungi by essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 6, 173-179.

Caccioni, D & Guizzardi, M., 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable posharvest pathogenic fungi by essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 6, 173 – 179.

Cardoso, M.G., Silva, M.A., Shan, A.Y.K.V., Marques, M.C.S., Santos, B.R., Bertolucci, S.K.V., Oliveira, A.C.B., Pinto, A.P.S., 2000. Extração de óleos essenciais. *Boletim Técnico. Lavras - MG:PROEX – UFPA*.

Carvalho, A.S.T., 2000. Úlcera péptica. *Jornal da Pediatria*, Vol. 76, Supl.2.

Council of Europe., 1974. Natural Flavouring Substances, Their Sources, and Added Artificial Flavouring Substances. Partial Agreement in the Social and Public Health Field, List 1, no. 109, p. 147. Strasbourg, France.

Dai, S., Ogle, CW., Cho, CH., 1986. Effects of carbenoxolone sodium on gastric and duodenal mucus synthesis in mice. *Pharmacology*, 33, 58–60.

Davidson, P.M., Naidu, A.S., 2000. Phytophenols. In: Naidu AS (Ed) *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 265-294.

Dikshit, A., Husain, A., 1984. Antifungal action of some essential oils against animal pathogens. *Fitoterapia*, 55. 171 – 176.

- Fan, T.Y., Feng, Q.Q., Jia, C.R., Fan, Q., Li, C.A., Bai, X.L., 2005. Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. *World Journal Gastroenterology*, 11(8), 1204-1209.
- Fisher, A.A & Le Couteur, D.G., 2001. Nephrotoxicity and hepatotoxicity of histamine H2 receptor antagonists. *Drug Safety*, 24: 39 – 57.
- Flemström, G., Turnberg, L.A., 1984. Gastroduodenal defence mechanisms. *Clinical Gastroenterology*, 13, 327–354.
- Furia, T. E., Bellanca, N., 1975. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. Chemical Rubber Company Press, Cleveland, OH, 2nd ed.
- Gonzalez, P., Soriano, V., Lopez, P., Niveiro, E., 2002. Anaphylaxis to proton pump inhibitors. *Allergol Immunopathol*, 30: 342 – 343.
- Guidobono, F., Pagani, F., Ticozzi, C., Sibilia, V., Pecile, A., Netti, C., 1997. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br J Pharmacol.*, v. 120, p. 581 – 586.
- 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.*, 80(8): 1161-1169.
- Jadeski, L.C., Lala, P.K., 1999. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am. J. Pathol.*, 155(4): 1381-1390.
- Jansson, E.A., Petersson, J., Reinders, C., Sobko, T., Bjorne, H., Phillipson, M., Weitzberg, E., Holm, L., Lundberg, J.O., 2007. Protection from nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers by dietary nitrate. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 510–518.
- Kawano, S., Tsuji, S., 2000. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15: D1-D6.
- Kim, H., Hwan Kim, K., 2001. Role of nitric oxide and mucus in ischemia/reperfusion induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacology* 62, 200–207.
- Klavons, J. A., Bennett, R. D. & Vannier, S.D., 1994. Physical and chemical nature of pectin associated with commercial orange juice cloud. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 59, n. 2, p. 399-401.
- Leung, A.Y & Foster, S., 1996. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*. Wiley, New York, pp. 339 – 342.
- Maity, P., Biswas, K., Roy, S., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U., 2003. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer: recent mechanistic update. *Molecular Cell Biochemistry*. 253 (1-2), 329-338.
- Marcolin, M.A., Cantarelli, M.G., Garcia Junior, M., 2004. Interações farmacológicas entre medicações clínicas e psiquiátricas *Rev. Psiq. Clín.*, 31(2), p.70-81.
- Marques, D.A., Foglio, M.A., Morgante, P.G., Sluys, M.A.V., Shepherd, S.L.K., 2006. Biotechnology approaches for production of antiulcerogenic dihydro-epideoxyarteannuin B isolated from *Artemisia annua* L. *Rev Bras Farmacogn*, 16: 291 – 299.
- Matsuda, H., Li, Y., Yoshikawa, M., 1999. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci.*, 65(2): L27-L3.

Mendonça, L.M.V.L., Conceição, A., Piedade, J., Carvalho, V.D., Theodoro, V.C.A., 2006. Caracterização da Composição Química e do Rendimento dos Resíduos Industriais do Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(4): 870-874.

Moraes, T.M., 2008. Determinação do mecanismo antiulcerogênico do óleo essencial e dos compostos majoritários de *Citrus aurantium* (Rutaceae). Dissertação de mestrado defendido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Farmacologia, UNESP, Botucatu, S.P.

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. *Jpn. J. Pharmacol.*, 57(4): 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.

Nishijima, C.M., 2010. Avaliação do efeito do Citral na dor neuropática e inflamação. Projeto de doutorado FAPESP – protocolo n. 2010/01141-9. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Farmacologia, UNESP, Botucatu, S.P.

Onawunmi, G.O., 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett. Appl. Microbial.* 9, 105-108.

Opdyke, D. L. J., 1979. Monographs on fragrance raw materials. citral. *Food Cosmet. Toxicol.* 17, 259–266.

Pechanova, O., & Simko, F., 2007. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiological Research*, 56: S7-S16.

Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F., Mayer, B., 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (LNAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, 118(6): 1433-1440.

Ra, A. & Tobe, S.W., 2004. Acute interstitial nephritis due to pantoprazole. *Ann Pharmacother*, 38: 41 – 45.

Rafatullah, S., Tariq, M., Al-Yahya, M.A., Mossa, J.S., Ageel, A.M., 1990. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 29(1), 25-34.

Repetto, M.G., & Llesuy, S.F., 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 523-534.

Rodriguez, J.A., Hiruma-Lima, C.A., Souza Brito, A.R., 2004. Antiulcer activity and subacute toxicity of transdehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Hum Exp Toxicol*, 23: 455 – 461.

Sabesin, S.M., 1993. Safety issues relating to long-term treatment with histamine H2-receptor antagonists. *Aliment Pharmacol, Ther.* 7: 35 – 40.

Sadrei, H., Ghannadi, A., Malekshahi, K., 2003. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and Citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia*, n.74, p.445 – 452.

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

Schmeda-Hirschmann, G., Yesilada, E., 2005. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 61-66.

Sikiric, P., Seiwerth, S., Grabarevic, Z., Rucman, R., Petek, M., Jagic, V., Turkovic, B., Rotvic, I., Mise, S., Zoricic, I., Konjevoda, P., Perovic, D., Jurina, L., Separovic, J., Hanzevacki, M.,

Artukovic, B., Bratulic, M., Tisljar, M., Gjurasin, M., Miklic, P., Stancic-Rokotov, D., Slobodnjak, Z., Jelovac, N., Marovic, A., 1997. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on NG-nitro-arginine methylester and Larginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *E. J. of Pharmacology*, 332: 23-33.

Souza, I.K.F., Silva, A.L., Misumi, A., Custódio, D.S., Maia, F.F.R., Canela, G.G.C., Oliveira, C.H.C., 2002. Estudo histológico e computadorizado das áreas com células parietais e principais no estômago de ratos Wistar tratados com pantoprazol e “n-nitroso-nmethyllurea” (NMU), *Acta Cirúrgica Brasileira*, 17 (4), p. 248-251.

Szabo, S., Brown, A., 1987. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulfhydryls. *Soc. Exp. Biol. Med.*, v.185, p.493-497.

Szabo, S., Vincze, A., 2000. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *Journal Physiology*, 94(2), 77-81.

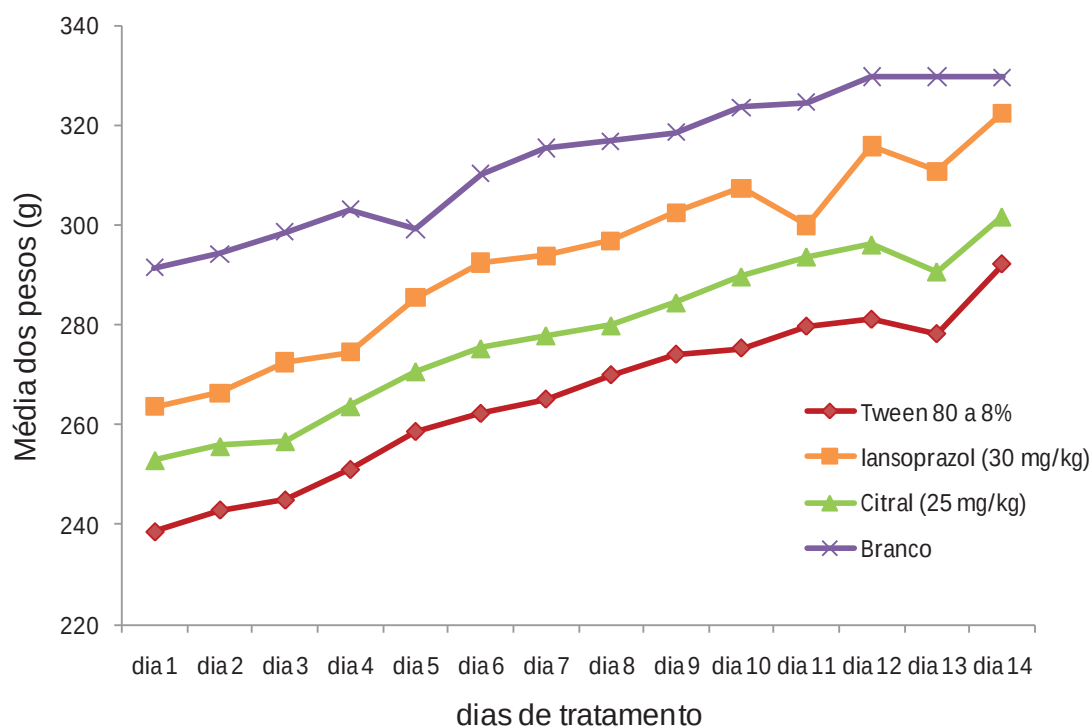
Ue, A.P.F., Ikino, J.K., Furlani, W.J., Souza, P.K., Rotta, O., 2007. Ginecomastia induzida por anti-histamínicos no tratamento da urticária crônica. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 82 (3): 253 – 6.

Vilas Boas, E.V.B., Lima, L.C.O., Bressan, M.C., Barcelos, M.F.P., Pereira, R.G., 2001. Manejo de resíduos da agroindústria. Lavras: Gráfica Universitária, UFLA/FAEPE, 110p.

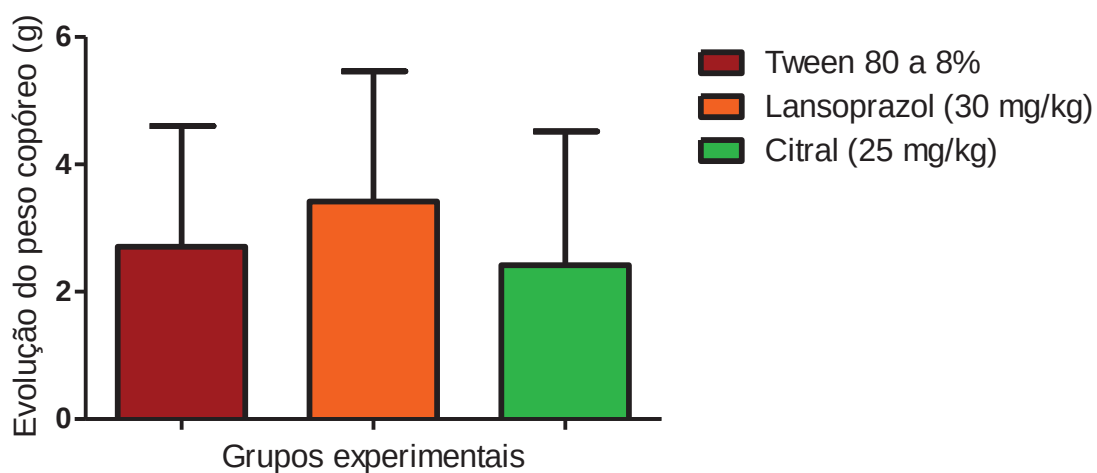
Wallace, J.L., Cirino, G., De Nucci, G., McKnight, W., MacNaughton, W.K., 1989. Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 256, G661–G666.

Zlabek, J.A & Anderson, C.G., 2002. Lansoprazole induced thrombocytopenia. *Ann Pharmacother*, 36: 809 – 811.

ANEXO I



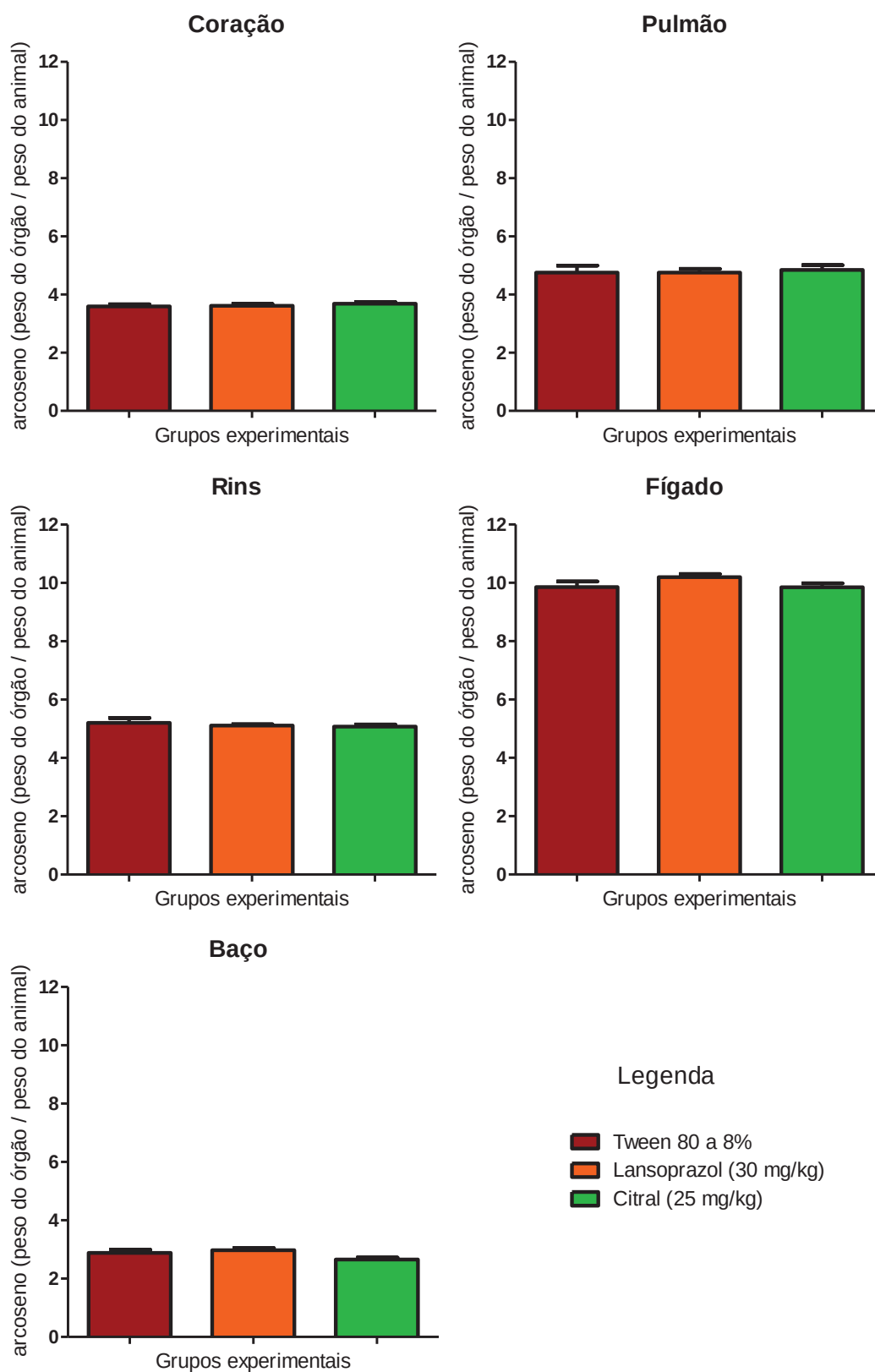
Valores médios dos pesos dos animais de cada grupo em função dos dias de tratamento.



Resultados obtidos da evolução do peso dos animais em função dos dias de tratamento. Valores expressos na forma de média da variação do peso (média do peso – média do peso do dia anterior) $\pm$ e.p.m. Diferenças estatísticas significativas não foram encontradas, realizada ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, onde os grupos experimentais foram comparados ao grupo controle negativo.

	Número de animais em cada grupo		
	Tween 80 a 8%	Lansoprazol (30 mg/kg)	Citral (25 mg/kg)
Dia 1	8	8	8
Dia 2	8	8	8
Dia 3	8	8	8
Dia 4	8	8	8
Dia 5	8	8	8
Dia 6	8	8	8
Dia 7	8	8	8
Dia 8	8	8	8
Dia 9	8	8	8
Dia 10	8	8	8
Dia 11	8	8	8
Dia 12	8	8	8
Dia 13	8	8	8
Dia 14	8	8	8

Tabela da quantidade de animais por grupo em função dos dias de tratamento. Nenhum evento de morte foi constatado em nenhum dos grupos observados durante os 14 dias de tratamento.



Resultados obtidos da normalidade dos órgãos. Valores expressos na forma de média do arcoseno (peso órgão / peso do animal) $\pm$ e.p.m. Diferenças estatísticas significativas não foram encontradas, realizada ANOVA seguida de teste a *posteriori* de Dunnett, onde os grupos experimentais foram comparados ao grupo controle negativo.