



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**  
**MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**

**CINARA SOARES VIDAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E  
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE  
*Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffman (QUEBRA FACA).**

CRATO-CE

2014

CINARA SOARES VIDAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E  
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE  
*Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffman (QUEBRA FACA).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioprospecção Molecular, do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial, para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Bioprospecção de produtos naturais

Orientador (a): Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Co-Orientador (a): Prof. Dra. Marta Regina Kenrtopf

CRATO- CE

2014

CINARA SOARES VIDAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E  
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Croton*  
*rhhamnifolioides* Pax e Hoffman (QUEBRA FACA).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, de acordo com as normas da ética científica, e encontra-se à disposição na biblioteca setorial do referido programa.

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA EM** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes** (Orientador)

Departamento de Química Biológica

---

**Prof. Dra. Marta Regina Kenrtopf** (Co-Orientadora)

Departamento de Química Biológica

---

**Prof. Heberty Di Tarso Fernandes Facundo** (Membro Externo)

Universidade Federal do Cariri-UFCA

---

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho** (Membro Interno)

Departamento de Química Biológica

CRATO-CE

2014

Dedico a quem há anos, diariamente e incansavelmente, dedica-se a mim por amor: minha mãe **Doralice Soares.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o meu maior Mestre, pelo dom da vida. Agradeço também por ser SEMPRE meu auxílio e esperança nos momentos difíceis e por me proporcionar perfeita saúde, disposição, coragem e sabedoria para chegar até aqui. Obrigada Senhor.

Agradeço aos Meus pais Doralice Soares e João Gonçalves, meu maior tesouro, por me educarem sempre no caminho do bem. Obrigada pelo amor incondicional, por confiarem em mim e por compreenderem minha ausência ao longo desses dois anos.

À minha avó Anália Soares (*in memoriam*) por se preocupar com o meu futuro, quando eu nem mesmo ainda sabia o que isto significava. Serei eternamente grata por tudo. Sei que onde estiveres estás feliz com mais esta conquista.

Agradeço aos meus irmãos, “um monte de irmãos,” pelo apoio incondicional, por serem suportes nos momentos difíceis e principalmente por estarem presentes durante as dúvidas e incertezas, ajudando-me a encontrar novos caminhos e soluções.

Ao meu Namorado Fábio Vanderlan, pela amizade, companheirismo, amor, apoio, incentivo, palavras de conforto, por me proporcionar tantos momentos felizes e por me tranquilizar e me dá forças nos momentos de fraqueza. Obrigada por estar me fazendo, a cada dia, uma pessoa melhor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes pela acolhida no seu laboratório, pela oportunidade e ensinamentos. Obrigada por me aceitar como orientanda mesmo sem ter conhecimento sobre mim.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Regina Kerntopf pela amizade, apoio e ensinamentos.

A Banca Examinadora pelas valiosas contribuições e sugestões acrescentadas para o melhoramento deste trabalho.

Aos Coordenadores do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA) pelos auxílios prestados no decorrer do curso.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos companheiros da turma do Mestrado por todos os momentos vividos.

Aos “pés” mais do que especiais: Andreza Guedes Barbosa, Sharlene Brito e Larissa Rolim, por todos os risos, por todos os conselhos, por todos os quilos que engordamos juntas (rsrs) e por todos os ensinamentos ao longo do curso. O curso não seria o mesmo sem vocês. Obrigada por tudo.

Ao amigo Luiz Jardelino por toda ajuda ao longo dos experimentos. Obrigada também por você, junto com Andreza, Sharlene e Larissa, tornarem esta tarefa menos árdua.

A amiga Anita Oliveira Brito Pereira, companheira fiel, anjo que caiu do céu na hora que mais precisei. Serei eternamente grata por estar sempre pronta para me ajudar no que preciso fosse.

A Ana Luiza de Albuquerque Siebra pelas palavras nos momentos de dúvida e pelos materiais cedidos.

A amiga Poliana Moreira pelo harmonioso convívio, pelas horas de estudo, pelas alegrias e pelo apoio nos momentos difíceis.

As companheiras: Érika Nascimento, Luzia Paulo e Rayane Correia por toda ajuda durante os experimentos.

Aos Meus amigos do Hospital Regional do Cariri: Sylvana Macêdo, Anne Karolyne Martins, Daniel Delmondes, Yasmine Soares, Rafaela Moura, Pedro Alex Cruz e Ygor Lacerda por tantos momentos de descontração, pelo apoio e incentivo.

Ao amigo Fernando Figueredo por toda ajuda, por toda paciência ao longo dos testes microbiológicos, sempre estando disponível para me ajudar no que preciso fosse. Sem sua ajuda seria impossível.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) pela acolhida.

Às Secretarias Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira por toda ajuda ao longo do curso.

A URCA por ter me acolhido durante esses dois anos.

À FUNCAP, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

“As plantas medicinais brasileiras não curam apenas, fazem milagres”.

**Karl Friedrich Philipp Von Martiu.**

## RESUMO

*Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffman é uma planta da família Euphorbiaceae conhecida popularmente como “quebra-faca”, sendo utilizada na medicina popular para inflamações, hipertensão e úlceras. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade gastroprotetora e antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* (OEC). Úlceras gástricas atingem milhões de pessoas em todo mundo e o tratamento não tem apresentado resposta clinicamente satisfatória. Um dos fatores comuns neste processo patológico e que aumentam os danos à mucosa gástrica é a presença da *Helicobacter pylori*. Na infecção gástrica causada por *Helicobacter pylori* os casos de reinfecção e a resistência aos antibióticos comumente utilizados são comuns. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e os constituintes foram identificados através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM). Destacaram-se como compostos majoritários o espatulenol (22,46%) e o 1,8-cineol (18,32%). A atividade antimicrobiana do OEC foi investigada pelo teste de microdiluição. Os resultados mostraram MIC de 128 µg/mL para bactérias e MIC de 64 µg/mL para os fungos testados. O OEC demonstrou efeito modulador significativo em associação com a gentamicina e oxacilina frente à *Escherichia coli* e em associação com oxacilina e gentamicina frente à *Staphylococcus aureus*. O OEC também potencializou o efeito do antifúngico nistatina frente à linhagem de *Candida tropicalis*. A Dose Letal Média (DL<sub>50</sub>) do OEC administrado por via oral, que revelou ser maior que 2000mg/Kg, pode ser considerada de baixa toxicidade. O OEC inibiu significativamente as lesões nos três modelos clássicos de indução de lesão gástrica (etanol <sub>abs</sub>, etanol acidificado e indometacina. O teste de barreira demonstrou que a atividade gastroprotetora do OEC acontece por via sistêmica. O estudo para elucidar o mecanismo envolvido na gastroproteção demonstrou o envolvimento dos receptores opioides, dos canais de potássio ATP-dependentes e do óxido nítrico. Os resultados obtidos neste estudo são relevantes e fornecem evidências para uma futura utilização de *Croton rhamnifolioides* como recurso terapêutico.

**Palavras-chave:** *Croton rhamnifolioides*. Atividade Gastroprotetora. Mecanismo de ação. Atividade Antimicrobiana.



## ABSTRACT

*Croton rhamnifolioides* Pax and Hoffm is a plant from the Euphorbiaceae family popularly known as "Quebra faca" (free translation) being employed in folk medicine for inflammation, hypertension and ulcers. The present study aimed to investigate the gastroprotective and antimicrobial activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* (OEC) leaves. Stomach ulcers affect millions of people worldwide and the clinical treatment has not shown a satisfactory response. One of the common factors in this pathological process that increases the damage to the gastric mucosa is the presence of *Helicobacter pylori*. In gastric infection caused by *Helicobacter pylori*, reinfection cases and cases of resistance to commonly used antibiotics are very common. The essential oil was obtained by hydrodistillation and the constituents were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). Major compounds that stood out were spathulenol (22.46%) and 1,8-cineole (18.32%). The antimicrobial activity of the OEC was investigated by microdilution test. The results showed MIC of 128 mg / ml for bacteria and the MIC of 64 mg / mL for the fungi tested. The OEC demonstrated significant modulatory effect in combination with gentamicin and oxacillin against *Escherichia coli* and in combination with gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus*. The OEC has also potentiated the antifungal effect of nystatin against the strain of *Candida tropicalis*. The median lethal dose (LD50) of OEC orally administered was found to be larger than 2000mg/kg and it may be considered of low toxicity. The CSG significantly inhibited the injuries from classical models of induced gastric lesion (abs ethanol, acidified ethanol and indomethacin). Barrier test showed that the gastroprotective activity of OEC occurs systemically. The study to clarify the mechanism involved in gastroprotection demonstrated the involvement of opioid receptors, the ATP-dependent potassium and nitric oxide channels. The results obtained in this study are relevant and provide evidence for future use of *Croton rhamnifolioides* as a therapeutic resource.

**Keywords:** *Croton rhamnifolioides*. Gastroprotective activity. Mechanism of action. Antimicrobial Activity.

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Uso de Plantas Medicinais .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2 Família Euphorbiaceae .....</b>	<b>23</b>
<i>1.2.1 Gênero Croton e Croton rahmnifolioides.....</i>	<i>24</i>
<i>1.2.1.1 Óleo volátil .....</i>	<i>24</i>
<b>1.3 Anatomia e Fisiologia do Trato Gastrointestinal.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Secreção Gástrica .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Fatores de proteção da mucosa gástrica.....</b>	<b>30</b>
<b>1.6 Úlcera péptica .....</b>	<b>31</b>
<b>1.7 Produtos Naturais e Atividade Antiulcerogênica .....</b>	<b>33</b>
<b>1.8 Atividade Antimicrobiana e Resistência aos Antibióticos .....</b>	<b>34</b>
<b>1.9 Justificativa .....</b>	<b>36</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Breve caracterização da área de estudo .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Material botânico.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Preparação da Exsicata.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4 Ensaios <i>in vitro</i> .....</b>	<b>43</b>
<i>3.4.1 Obtenção do óleo essencial .....</i>	<i>43</i>
<i>3.4.2 Análise da composição química do óleo essencial.....</i>	<i>43</i>
<i>3.4.3 Atividade Antimicrobiana.....</i>	<i>43</i>
<i>3.4.3.1 Microorganismos.....</i>	<i>43</i>
<i>3.4.3.2 Antibióticos.....</i>	<i>44</i>
<i>3.4.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Modulação.....</i>	<i>45</i>
<b>3.5 Ensaios <i>in vivo</i> .....</b>	<b>46</b>
<i>3.5.1 Animais e Aspectos Éticos da pesquisa .....</i>	<i>46</i>

3.5.2	<i>Determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>)</i> .....	46
3.5.3	<i>Atividade Antiulcerogênica</i> .....	46
3.5.3.1	<i>Lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i> (ROBERT. et al., 1979 apud LAPA, 2008)	46
3.5.3.2	<i>Lesão gástrica induzida por etanol acidificado</i> (MIZUI et al., 1987 apud LAPA, 2008).	47
3.5.3.3	<i>Lesão gástrica induzida por indometacina</i> (DJAHANGUIRI, 1969 apud LAPA, 2008).	47
3.5.3.4	<i>Teste de Barreira Física</i> .....	48
<b>3.6</b>	<b>Estudo dos possíveis mecanismos envolvido na atividade gastroprotetora do OEC.</b>	<b>48</b>
3.6.1	<i>Envolvimento do Óxido Nítrico</i> (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999).....	48
3.6.2	<i>Envolvimento dos canais de K<sup>+</sup>-ATP-dependentes (K<sup>+</sup> ATP)</i> (RAHGOZAR et al., 2001)..	49
3.6.3	<i>Envolvimento dos receptores <math>\alpha_2</math>- noradrenérgicos</i> (LAPA et al., 2008) .....	49
3.6.4	<i>Envolvimento dos receptores histamínicos (H<sub>2</sub>)</i> .....	50
3.6.5	<i>Envolvimento dos receptores opioides</i> .....	50
3.6.6	<i>Envolvimento da participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina</i> (MATSUDA, LI e YOSHIKAWA, 1999) .....	50
<b>3.7</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta do material botânico e obtenção do óleo</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Análise da Composição química do óleo das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i></b> .....	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da Toxicidade aguda e Dose Letal Média (DL<sub>50</sub>)</b> .....	<b>57</b>
<b>4.4</b>	<b>Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>57</b>
4.4.1	<i>Concentração Inibitória Mínima e Modulação</i> .....	57
<b>4.5</b>	<b>Atividade Antiulcerogênica</b> .....	<b>64</b>
4.5.1	<i>Lesão gástrica induzida por etanol</i> .....	64
4.5.2	<i>Lesão gástrica induzida por etanol acidificado</i> .....	66
4.5.3	<i>Lesão gástrica induzida por indometacina</i> .....	68
<b>4.6</b>	<b>Teste de Barreira Física</b> .....	<b>70</b>
<b>4.7</b>	<b>Elucidação do Mecanismo de Ação Envolvido na Gastroproteção</b> .....	<b>72</b>
4.7.1	<i>Envolvimento do Óxido Nítrico</i> .....	72
4.7.2	<i>Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes</i> .....	73
4.7.3	<i>Envolvimento dos receptores <math>\alpha_2</math> noradrenérgicos</i> .....	75
4.7.4	<i>Envolvimento dos receptores H<sub>2</sub></i> .....	77
4.7.5	<i>Envolvimento da participação dos neurônios aferentes sensíveis a capsaicina</i> .....	78
4.7.6	<i>Envolvimento dos receptores opióides</i> .....	80

<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>106</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do Estômago Humano .....	27
Figura 2: Controle da secreção do ácido pelas células parietais.....	29
Figura 3: Localização Geográfica da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Brasil .....	42
Figura 4: Compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i> .....	55
Figura 5A: Atividade moduladora de antibióticos do Óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i> (OEC) em associação com aminoglicosídeos e penicilinas frente a <i>Escherichia coli</i> .....	59
Figura 5B Atividade moduladora de antibióticos do Óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i> (OEC) em associação com aminoglicosídeos e penicilinas frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	59
Figura 5C: Atividade moduladora de antibióticos do Óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i> (OEC) em associação com aminoglicosídeos e penicilinas frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
Figura 6A: Atividade moduladora de antifúngicos do Óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i> (OEC) em associação com nistatina, anfotericina e benzoilmetronidazol frente à <i>Candida tropicalis</i> .....	63
Figura 6B: Atividade moduladora de antifúngicos do Óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i> (OEC) em associação com nistatina, anfotericina e benzoilmetronidazol frente à <i>Candida albicans</i> .....	63
Figura 7: Efeito da administração oral do OEC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos com cada grupo contendo a média de seis animais .....	65
Figura 8: Efeito da administração oral do OEC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos com cada grupo contendo a média de seis animais .....	67
Figura 9: Efeito da administração oral do OEC sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos com cada grupo contendo a média de seis animais.....	69
Figura 10: Efeito do teste de barreira física.....	71
Figura 11: Efeito do pré-tratamento com L-NAME na gastroproteção promovida pelo OEC ...	72
Figura 12: Efeito do pré-tratamento da glibenclamida na gastroproteção promovida pelo OEC ..	74
Figura 13: Efeito do pré-tratamento da iombina na gastroproteção promovida pelo OEC.....	76
Figura 14: Efeito do pré-tratamento com histamina na gastroproteção do OEC.....	78

Figura 15: Efeito do pré-tratamento com capsazepina na gastroproteção promovida pelo OEC .. 79

Figura 16: Efeito do pré-tratamento com naloxona na gastroproteção do OEC ..... 81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem bacteriana e perfil da resistência a antibióticos .....	44
Tabela 2: Sistema de determinação de pontuação de lesão gástrica.....	48
Tabela 3: Composição química (%) do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA- Ácido Araquidônico  
abs-Absoluto  
*Ad libidum*- `a vontade  
AINES- Anti-inflamatórios não esteroidais  
AMPc- Monofosfato de adenosina cíclico  
ANOVA- *Analysis of Variance* ( Análise de Variância)  
ATP- Trifosfato de adenosina  
ATCC- *American Type Culture Collection*  
BHI- *Brain Heart Infusion*  
CCK<sub>2</sub>- Receptor de colecistoquinin  
CEUA-Comissão de Experimentação e Uso de Animais  
CIM- Concentração Inibitória Mínima  
COX- Cicloxigenase  
CO<sub>2</sub>. Dióxido de carbono  
δ- Receptor opioide Delta  
DMSO- Dimetilsulfóxido  
DZO- Diazóxido  
EC06- *Escherichia coli* 06  
EGF- Receptor do fator de crescimento epidermal  
ELC- Células semelhantes à enterocromafins  
eNOS- óxido nítrico sintetase endotelial  
EROs- Espécies reativas de oxigênio  
GMPc-Monofosfato cíclico de guanosina  
GCS- Guanilil ciclase solúvel  
GTP- Guanosina trifosfato  
GSH-Glutationa reduzida  
H K ATPase- Bomba de prótons  
H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase- Bomba de prótons  
H<sub>2</sub>- Receptor para histamina tipo 2  
HIA- *Agar Heart Infusion*  
i.p.- Intraperitoneal  
iNOS- Óxido nítrico sintetase induzida



$\kappa$ - Receptor opioide Kappa

LTC<sub>4</sub>-Leucotrienos C<sub>4</sub>

L-NAME- N(G)-nitro-L-arginine methyl Ester

M<sub>3</sub>- Receptor muscarínico tipo 3

nNOS- Óxido nítrico sintetase neural

NOS- Óxido nítrico sintetase

NCCLS- *National Comitee for Clinical Laboratory Standards 13*

OMS- Organização Mundial da Saúde

PNPMF- Programa Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos

PKC- Proteína quinase C

PGE<sub>2</sub>- Prostaglandina E<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub>- Prostaglandina I<sub>2</sub>

PA 15- *Pseudomonas aeruginosa 15*

s.c- Subcutâneo

SA10 - *Staphylococcus aureus*

SST- Somatostatina

TNF $\alpha$ - Fator de necrose tumoral

TGI- Trato Gastrintestinal

TRPV-1- Receptor de capsaicina tipo 1

UFC- Unidade formadora de colônia

Receptor  $\mu$ - Receptor opioide mu

v.o.- Via oral

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos principais determinar perfil químico, avaliar atividade gastroprotetora e vias envolvidas e, estimar a atividade antimicrobiana e modulatória da resistência microbiana do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* utilizando ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Diante dos objetivos propostos, esta dissertação foi organizada em cinco tópicos: introdução, objetivos, materiais e métodos, resultados, discussão e conclusão.

O tópico Introdução descreve a importância das plantas medicinais na recuperação da saúde, bem como a importância da Família Euphorbiaceae e um dos seus maiores gêneros, o gênero *Croton*. São descritos a anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal, a fisiologia da secreção gástrica, os fatores através dos quais a mucosa gástrica se protege e as lesões provocadas na mucosa quando esses fatores protetores são insuficientes para conter as injúrias provocadas por diversos agentes agressores. Também está descrita neste tópico a necessidade de se encontrar produtos naturais com atividades antiulcerogênica e antimicrobiana que possam servir de alternativas para o tratamento das úlceras gástricas.

O segundo tópico descreve os objetivos geral e específicos. Este trabalho avalia o perfil da composição química, sua toxicidade através da determinação da dose letal média e o potencial terapêutico do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* (OEC) para as propriedades antiulcerogênica e qual o mecanismo envolvido nesta atividade, avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora de antimicrobianos.

O terceiro tópico trata-se dos Materiais e Métodos utilizados para que os objetivos do trabalho fossem alcançados, começando com uma breve explicação da área escolhida para estudo. Foram descritos o local da coleta do material e a obtenção do óleo essencial utilizando o sistema de hidrodestilação tipo *Clevenger*. Em relação a composição química, a mesma foi realizada através da Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e os ensaios microbiológicos foram realizados através dos testes de microdiluição. São descritos também a realização dos testes *in vivo*, bem como a utilização dos animais nos experimentos e os aspectos éticos que envolvem esta pesquisa.

O quarto tópico descreve os resultados da pesquisa: composição química do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* (OEC), DL<sub>50</sub> (Dose letal Média), os resultados da atividade antimicrobiana, da atividade antiulcerogênica frente aos modelos clássicos de indução de lesão gástrica, teste de barreira e mecanismos responsáveis pelo efeito do OEC.

Este tópico também discute os possíveis compostos envolvidos na atividade gastroprotetora e antimicrobiana do óleo.

O quinto tópico descreve sucintamente a conclusão deste trabalho, respondem os objetivos propostos no segundo tópico desta pesquisa e justificam a busca de tentar encontrar nesta espécie vegetal substâncias que possam ser utilizadas como ferramentas terapêuticas. São necessários mais estudos para esclarecer os princípios ativos responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas por esta espécie.

# INTRODUÇÃO

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Uso de Plantas Medicinais

Segundo a Organização mundial da Saúde (OMS), entende-se por planta medicinal qualquer planta que apresente em um ou mais de seus órgãos substâncias utilizadas com finalidade terapêutica ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. Estas substâncias são os princípios ativos e eles são responsáveis pelos efeitos terapêuticos que as plantas medicinais possuem (MONTANARI et al., 2002). Os vegetais, além de se apresentarem como fontes de princípios ativos, ainda apresentam papel importante na nutrição humana e na saúde pública, uma vez que são fornecedores naturais de vitaminas e sais minerais (WAGNER, 2003).

O conhecimento e uso de plantas medicinais acompanham a humanidade desde o início da civilização. Com o passar dos séculos, foi sendo acumulada uma gama de informações sobre as ações e os princípios ativos de várias espécies vegetais. Atualmente são utilizadas pela medicina popular mais de 20.000 espécies distintas de plantas medicinais (DEEPIKA-GUPTA et al., 2008), simbolizando muitas vezes o único recurso terapêutico utilizado por várias comunidades e populações.

O uso das plantas na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizada pelo homem moderno (LORENZI et al., 2002). Grande parte da população mundial confia nos métodos tradicionais relativos aos cuidados diários com a saúde e cerca de 80% desta população, principalmente nos países em desenvolvimento, utilizam os derivados das plantas para esses cuidados (GURIB-FAKIM, 2006). No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo de medicamentos alopáticos; os 80% restantes encontram nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO et al., 2006).

No Brasil a regulamentação do uso de plantas medicinais é efetuado pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) do Ministério da Saúde. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi aprovada pelo Decreto nº 5.813/2006. As ações desta política estão manifestadas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e são imprescindíveis para melhoria do acesso da população ao

medicamento, bem como para o uso sustentável da biodiversidade brasileira e preservação do conhecimento tradicional (BRASIL, 2007).

O conhecimento sobre os usos das espécies medicinais é repassado de forma empírica e de maneira oral entre os indivíduos (OLIVEIRA, 2009). Ceolin et al (2011) citam que dentro de um grupo familiar existe um conhecimento próprio restrito àquele grupo, o qual é repassado de geração em geração. Porém, devido a necessidade de validação dos usos, bem como dos efeitos benéficos e maléficos causadas pelo uso das plantas, nem sempre é aceita a forma de utilização popular (OLIVEIRA, 2007). O Brasil, assim como outros países do mundo, tem se dedicado a estudos que comprovem as ações terapêuticas das plantas medicinais e, principalmente, a descobrir princípios ativos capazes de combater doenças e/ou melhorar a saúde da população como um todo (SOUZA et al., 2010).

As pesquisas por novas substâncias terapeuticamente úteis tem se tornado um assunto de grande interesse no século XXI, pois fornecem um embasamento científico aos conhecimentos oriundos da medicina popular. Além disso, estes estudos buscam encontrar novas substâncias que possam servir de fontes de estruturas químicas que sejam importantes para a indústria farmacêutica na elaboração de novos produtos (ISSA, 2006).

Entre os anos de 2001 a 2010, foram aprovadas nos EUA 16 novas substâncias, provenientes de produtos naturais, para serem usadas clinicamente pelo *Food Drug Administration*. A partir de então, a medicina ocidental vem utilizando substâncias obtidas de moléculas de origem natural. Isto explica a importância dos estudos atuais na busca da elucidação e purificação dos compostos com atividades biológicas observadas experimentalmente (KINGHORN *et al.*, 2011). A investigação do potencial terapêutico dos produtos naturais também tem se tornando uma fonte de lucro para alguns países como a China que, arrecadou cerca de 14 bilhões com produtos relacionados a medicina alternativa, incluindo diversos tipos de plantas medicinais (ROBINSON et al., 2011).

Há no mundo cerca de 250.000 a 300.000 espécies de plantas, sendo o Brasil detentor de cerca de 20% da flora mundial (CALIXTO, 2005). Dessa forma, nossas espécies vegetais demonstram o enorme potencial para a descoberta de novas moléculas terapeuticamente úteis (YUNES *et al.*, 2001). Dentre as famílias de vegetais, uma das mais importante é a Família Euphorbiaceae, destacando-se não só na medicina popular mas também no setor econômico. Esta Família tem tido um papel muito significativo, em especial, na determinação de compostos farmacologicamente ativos (BITTNER et al., 2001).

## 1.2 Família Euphorbiaceae

A Família Euphorbiaceae possui cerca de 300 gêneros e 8900 espécies identificadas (BITTNER et al., 2001). No Brasil, ocorrem 72 Gêneros e aproximadamente 1100 espécies (CONEGERO et al., 2003), o que torna uma família bastante comum na flora brasileira e uma das mais complexas do ponto de vista taxonômico (SOUZA et al., 2008).

Considera-se a Região Nordeste do Brasil como um centro de diversidade desta família (CORDEIRO et al., 2006) apresentando 240 espécies e 50 gêneros (LUCENA et al., 2010), distribuídos em grande parte no bioma caatinga, onde muitas das espécies são endêmicas (SÁTIRO et al., 2008).

As espécies da Família são distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América e da África, muitas das quais já demonstraram possuir alguma atividade farmacológica. Esta família possui hábito variado, crescendo em matas, cerrados, campos, pântanos e regiões alagadas. Podem ser ervas, arbustos, subarbustos, árvores, cipós e trepadeiras, sendo que algumas crescem rasteiras e outras são altaneiras. Possuem folhas alternas, inteiras ou partidas, sendo que algumas são latescentes. As flores são de sexo separado, monoicas ou dioicas, em regra actinomorfas, sendo que se reúnem em inflorescências tipo cacho. O fruto é seco, capsular. As sementes, com ou sem carúncula, são ricas em endosperma, oleaginos em sua maioria (OLIVEIRA et al., 2007; CONEGERO et al., 2003; SCHVMAN, 1979; DI STASI et al., 2002; SMITH et al., 1988). Seus principais gêneros em números de espécies incluem *Euphorbia* L. (1500), *Croton* L. (700), *Phyllanthus* L. (400) e *Acalypha* L. (400) (WEBSTER, 1994).

As Euphorbiaceae são muito utilizadas na medicina popular para fins terapêuticos. Algumas espécies contêm compostos bioativos, os quais conferem a estas plantas poder para o tratamento de doenças como atividade antitumoral (PUSZTAI et al., 2007; LAGE et al., 2009). Além disso, apresentam destaque no setor econômico, especialmente pela produção de látex (borracha) e óleos que são utilizados na indústria de tintas, sabão, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, batons e perfumes (MACHADO, 2007).

Apesar da Família ser objeto de estudos envolvendo pesquisas em taxonomia, filogenia, botânica econômica, morfologia e anatomia, o conhecimento ainda precisa ser melhor explorado (LIMA et al., 2008). Um dos gêneros desta família que se destaca é Gênero *Croton* devido seus potenciais terapêuticos já demonstrados na literatura.

### 1.2.1 Gênero *Croton* e *Croton rhamnifolioides*

*Croton* L. pertence à Família Euphorbiaceae e é um dos maiores gêneros desta família, com cerca de 1.300 espécies de ervas, arbustos e árvores. Apresenta distribuição pantropical, embora a maioria dos seus representantes ocorra nas Américas. No Brasil, o Gênero *Croton* apresenta 182 espécies. Este gênero está amplamente distribuído no Nordeste do Brasil, sendo comum encontrar seus representantes no Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas e Sergipe (FORZZA, 2010), principalmente na caatinga, e é de grande utilidade para os indivíduos que vivem longe dos grandes centros urbanos, pois servem para o tratamento de diversas doenças (SOUZA, 2003; DUARTE, 2005, CRUZ, 2007).

As plantas deste gênero estão entre as melhores fontes de compostos bioativos da família Euphorbiaceae, sendo ricas em terpenóides e alcaloides (BERRY et al., 2005; SALATINO et al., 2007). Eles representam a classe de metabólitos secundários dominantes no gênero *Croton*. Dentre os terpenóides, os diterpenos são os mais característicos neste grupo (SALATINO et al., 2007). Além disso, muitas espécies deste gênero se caracterizam pela produção de óleo essencial. (DIAS et al., 2006; BRASIL et al., 2009).

*Croton heliotropiifolius* Kunth, conhecido também como *Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffm é conhecido popularmente como “caatinga branca” ou “quebra faca” e é uma espécie endêmica do Nordeste Brasileiro. Esta planta cresce como subarbusto ou arbusto, com até três metros de altura, tem aroma agradável e é utilizado popularmente em forma de chás e infusões para tratamento de úlceras, inflamações e hipertensão (RANDAU et al., 2004).

#### 1.2.1.1 Óleo Volátil

Na literatura existem vários relatos das atividades farmacológicas de espécies do gênero *Croton* utilizando o potencial dos óleos voláteis encontrados nas plantas. Neste sentido, óleos voláteis podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis que são geralmente odoríferas, lipofílicas e líquidas. São compostos principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos- terpenóides (DEWICK, 2009). Dá-se a denominação “óleo volátil” devido as características que apresentam: geralmente são líquidos de aparência líquida à temperatura ambiente e se volatilizam nesta mesma temperatura (GUENTHER, 1948; OMS, 1992). Quando obtidos de diversas partes da planta, podem apresentar odores, caracteres físico- químicos e composição química variados. Além disso, a época da coleta, bem como o



solo e as condições climáticas também influenciam a composição química (SIMÕES et al., 2003).

A maior utilização dos óleos é na área de alimentos (condimentos e aromatizantes), cosméticos e farmácia. Mas drogas ricas em óleos essenciais também são empregadas *in natura* para a preparação de infusões e/ou sob a forma de outros preparos mais simples (DEBA et al., 2008; DIKBAS et al., 2008).

Na literatura existem vários relatos das atividades farmacológicas comprovadas cientificamente como por exemplo: Rosa et al. (2003), descreve que as folhas e o súber de *Croton cajucara* apresenta ação anti-inflamatória, antiulcerogênica, antitumoral, antimutagênica, antiestrogênica e hipoglicêmica. O óleo volátil, desta espécie, apresenta atividade antifúngica (SOUZA et al., 2006), anti-leishmaniose (ROSA et al., 2003), e anti-trypanossoma cruzi (CAMPOS et al., 2010). Oliveira et al., (2001) relata que o óleo volátil do *Croton sonderianus*, espécie comum no Nordeste do Brasil, apresenta atividade antinociceptiva. Este mesmo óleo, em outros estudos, apresentou atividade antibacteriana (RODRIGUES et al., 2009), larvicida (LIMA et al., 2006) e depressora do sistema nervoso central (LAZARINI et al., 2000).

Várias espécies de *Croton* possuem óleos voláteis que apresentam atividades fisiológicas e são empregados no tratamento de inflamações, dor de cabeça, dores musculares, diabetes e alguns tipos de câncer (COMPAGNONE et al., 2010) e contra malária e convulsões (MOHAMED et al., 2009). Além disso, são relatadas na literatura atividades contra úlceras e ação gastroprotetora (Hiruma-Lima, Gracioso et al., 2000; Hiruma-Lima, Gracioso et al., 2002; Paula, Toma et al., 2006; Coelho-De-Souza, Lahlou et al., 2011).

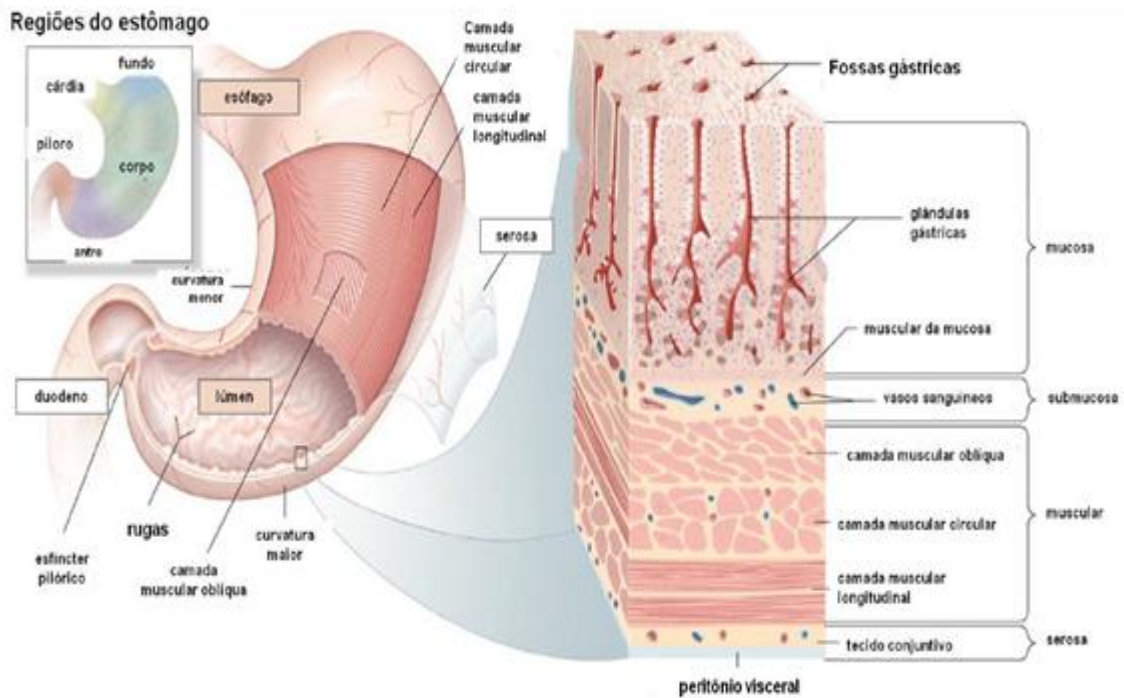
### **1.3 Anatomia e Fisiologia do Trato Gastrointestinal**

O Sistema digestório é formado basicamente de um tubo muscular com epitélio especializado que compreende a cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus. Ele ainda apresenta, como órgãos anexos, o fígado, pâncreas e as glândulas salivares. Juntamente com estes órgãos, o Trato Gastrointestinal (TGI) possui várias funções: receber, digerir, absorver e eliminar as substâncias digeridas. Esses processos são controlados pelo Sistema Nervoso e pelo Sistema Hormonal (MERCHANT, 2007).

O estômago, órgão em destaque neste estudo, secreta cerca de 2,5 litros de suco gástrico por dia (RANG et al., 2007) e apresenta funções que estão associadas ao armazenamento do alimento até o processo final nas demais partes do trato com o auxílio da

secreção gástrica para a formação do quimo e o esvaziamento do quimo para o intestino, finalizando o processo de digestão e absorção (GUYTON, HAIL, 2006). O estômago é dividido em cinco regiões (cárdia, fundo, corpo, antro e esfíncter pilórico) e apresenta duas curvaturas: a maior e a menor (ROBBINS, CONTRAN, 2005) (Figura 1).

**Figura 1:** Estrutura do Estômago Humano.



Fonte: Enciclopédia Britânica (on line), 2013.

A cárdia se dá na porção de união do estômago com o esôfago, está fixa ao diafragma e situa-se cerca de dois centímetros e meio à esquerda da linha média ao nível da nona vértebra torácica. O fundo é a porção do estômago que se estende da transição esofagogástrica até a grande curvatura. O corpo, por sua vez, está localizado entre o ângulo de hiss e o fundo. O antro é a porção entre o corpo e o piloro e seu peristaltismo promove a trituração dos alimentos, reduzindo-os às partículas menores que passam para o duodeno e vão sofrer a ação do suco gástrico. O piloro é um esfíncter constituído pelo espessamento da camada muscular circular do estômago e sua localização é aproximadamente ao nível da primeira vértebra lombar (VALEZI, 2002).

A parede do estômago é dividida em quatro camadas: mucosa, submucosa, camada muscular e a serosa. A região submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e contém

uma rica rede vascular e um plexo nervoso conhecido como plexo submucoso (DANGELO; FATTINI, 2007).

A camada muscular contém fibras musculares lisas que se apresentam em três orientações: circular, oblíqua e longitudinal (ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA, 2013). A mucosa é constituída por uma superfície epitelial. Esta superfície é formada por uma camada de células simples colunares que recobrem as fossas gástricas (EROSCHENKO, 2008). A camada mucosa é a camada da parte interna do estômago que abriga numerosas glândulas gástricas (DANGELO; FATTINI, 2007). Existem aí dois tipos de glândulas: as oxínticas que são compostas por células parietais (que secretam o ácido clorídrico), células enterocromafins (secretam histamina), células principais (secretam pepsinogênio), células D (secretam somatostatina) e células mucosas (secretam muco); e as glândulas pilóricas que possuem células G (secretam gastrina), células D e células mucosas (SCHUBERT; PEURA, 2008). As células mucosas também secretam bicarbonato que, junto com o muco, formam uma película que protege com a mucosa (GUYTON; HALL, 2006). A camada serosa é a chamada tecidual que reveste a maior parte do órgão, exceto em uma pequena porção da parte posterior do estômago (região da cárdia) (DANGELO; FATTINI, 2007).

O epitélio que recobre o corpo e o fundo do estômago (mucosa oxíntica ou glandular) contém as células parietais ou oxínticas, as células principais, as células mucosas superficiais e as células enteroendócrinas secretoras de hormônio (LAINE; TAKEUCHI, 2008). As células parietais, como dito anteriormente, são as responsáveis pela secreção de ácido clorídrico (HCl). Além disso, são responsáveis pela secreção do fator intrínseco, importante na absorção da vitamina B<sub>12</sub> (GUYTON; HALL, 2006).

#### **1.4 Secreção Gástrica**

A secreção gástrica está envolvida na digestão das proteínas, na absorção do ferro, cálcio e da vitamina B<sub>12</sub> e atuam contra bactérias invasoras (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A fisiologia da secreção gástrica é dividida nas fases cefálica, gástrica e intestinal. A fase cefálica ocorre antes do alimento penetrar no estômago, podendo ser resultado dos sentidos olfato, paladar e visão; por uma lembrança ou um processo de mastigação e deglutição. Esta fase é mediada pela atividade vagal. A fase gástrica envolve a ativação dos receptores, através da distensão gástrica, mediada por estímulos vagais. A fase intestinal é iniciada quando o alimento já se encontra na porção superior do intestino delgado, que

continuará a realizar secreção do ácido gástrico em pequenas proporções (ROBBINS, COTRAN, 2005; GUYTON, HALL, 2006).

O suco gástrico é uma mistura de secreção parietal (ácido e fator intrínseco) e secreções não parietais: muco, bicarbonato,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e pepsinogênio (YAO; FORTE, 2003). O início da secreção gástrica se dá por estímulos enviados às células. Estes estímulos ativam a bomba de prótons ou gástrica. As células parietais, localizadas nas glândulas oxínticas, irão favorecer a secreção de ácido clorídrico, as células ECL irão secretar histamina e as células G, o hormônio gastrina (ROBBINS; COTRAN, 2005; GUYTON; HALL, 2006).

A célula parietal em repouso apresenta canalículos intracelulares e um sistema túbulo-vesicular rico em bomba de prótons secretoras de  $\text{H}^+$ . Quando esta célula é ativada, o sistema túbulo-vesicular funde-se à membrana celular de tal modo que as microvilosidades se projetam para os canalículos, aumentando a área da membrana com o lúmen gástrico. As moléculas de  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPase ficam expostas ao  $\text{K}^+$  no líquido extracelular e começam a trocar  $\text{K}^+$  por  $\text{H}^+$ . O  $\text{H}^+$  secretado é oriundo do ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Este, por sua vez, é originado pela hidratação do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) mediada pela anidrase carbônica (GANONG, 2006).

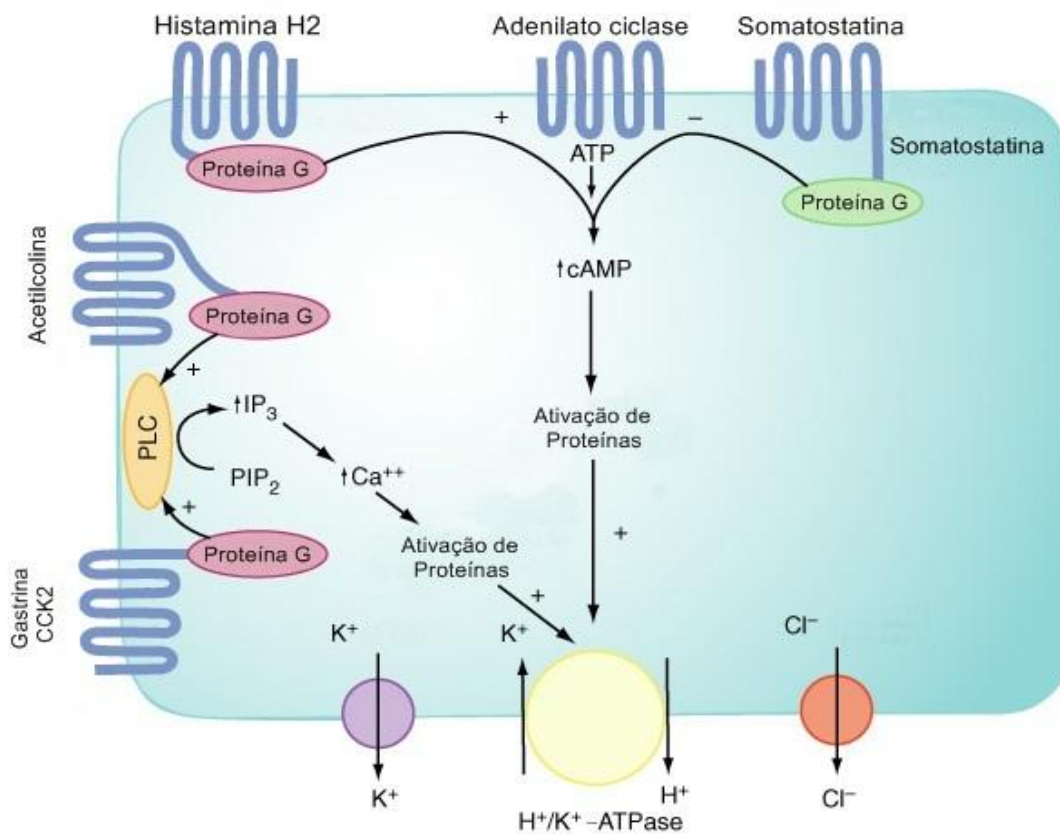
O ácido carbônico se dissocia em  $\text{HCO}_3^-$  e este deixa a célula parietal através de um antitransportador. Este antitransportador troca o  $\text{HCO}_3^-$  por outro íon, que geralmente é o íon cloreto por ser o íon mais abundante no líquido intersticial. Por fim, o íon cloreto deixa a célula através de canais presentes na membrana apical (GANONG, 2006).

A regulação da secreção gástrica é muito complexa e sofre influências parácrina (histamina), neural (acetilcolina), hormonal (gastrina), mecânica (distensão) e química (café e etanol) (SCHUBERT, 2010).

A histamina é liberada por estimulantes da secreção gástrica como o alimento ou gastrina. Ela atua sobre seus receptores e promove o aumento da secreção ácida por elevar os níveis intracelulares de AMPc (DOCKRAY et al., 1996). O receptor da histamina está acoplado a proteína G. A histamina aumenta a secreção gástrica pela mudança da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , através da ativação da adenilato ciclase, que eleva a concentração de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), promovendo a ativação da fosfoquinase A (PEREZ- ZOGHBI et al., 2008). A gastrina e a acetilcolina estimulam as células parietais através de suas ligações com receptores de colecistoquinina (CCK2) e receptores muscarínicos do subtipo M3, respectivamente. Estes receptores se acoplam a proteína Gq, determinando um aumento nos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  e na atividade da PKC (SCHUBERT; PEURA, 2008). A ativação das proteínas quinases resulta em fosforilação

e ativação da  $H^+/K^+$  ATPase da membrana canalicular, que bombeia íons  $H^+$  na luz do estômago. Um canal de  $Cl^-$  (cloreto) da membrana apical acopla o efluxo de  $Cl^-$  com o efluxo de  $H^+$ , enquanto um canal de  $K^+$  da membrana apical recicla o  $K^+$  para fora da célula. O resultado final desse processo consiste na rápida extrusão de HCl (ácido clorídrico) para a luz do estômago (GOLAN et al., 2009).

**Figura 2:** Controle da secreção do ácido pelas células parietais.



Fonte: <http://www.misodor.com/ESTOMAGO%20CIRURGICAL.html>

O HCl é capaz de inibir sua própria secreção através de uma alça de retroalimentação negativa, a qual envolve a liberação de somatostatina (SST). A somatostatina é produzida pelas células D da porção do antro e age inibindo a gastrina (GOODMAN, GILMAN, 2006). As prostaglandinas ( $PGE_2$  e  $PGI_2$ ) também inibem a célula parietal através do bloqueio do AMPc, favorecendo a diminuição da atividade da bomba de prótons, ou seja, a secreção do ácido (ATAY et al., 2000).

Em condições fisiológicas normais, no estômago existe um equilíbrio entre os fatores de agressão endógenos (HCl, bile, pepsina e enzimas pancreáticas) exógenos (álcool, Anti-

inflamatórios, fumo) ou biológicos (*Helicobacter pylori*), com os mecanismos de proteção (prostaglandinas, muco, bicarbonato, enzimas oxidantes, fluxo sanguíneo, barreira epitelial e óxido nítrico (POSSENTI, 2012).

### **1.5 Fatores de Proteção da mucosa gástrica**

O processo de defesa da mucosa inclui mecanismos locais e neuro-hormonais. Entre os mecanismos locais podemos citar a barreira muco-bicarbonato- fosfolipídio, as células epiteliais de superfície e sua capacidade de regeneração rápida, as prostaglandinas, a microcirculação, o óxido nítrico e o sistema de defesa enzimático (BRZOZOWSKI et al., 2005; LAINE et al., 2008).

A barreira muco-bicarbonato-fosfolipídio é a primeira defesa contra os agressores ( $H_+$  e pepsina) (DEFONESKA, KAUNITZ, 2010). O muco se apresenta de forma viscosa, elástica e aderente. É um gel composto por 95% de água e 5% de glicoproteínas que recobre a superfície da mucosa gastrintestinal (REPETTO et al., 2002). Devido à aderência e estabilidade, o muco é capaz de reter o bicarbonato, que é secretado pelas células superficiais do estômago e duodeno, mantendo um ambiente neutro (pH 7,0) que impede a penetração da pepsina e enzimas proteolíticas (LAINE et al., 2008). Prostaglandinas, agentes colinérgicos, secretina e gastrina estimulam a secreção de muco, enquanto a secreção de bicarbonato pode ser estimulada por prostaglandinas, L-aspartato, L-glutamato, L-leucina e inibidores da fosfodiesterase 5 (DEFONESKA; KAUNITZ, 2010).

Depois da camada de muco, a próxima linha de defesa é composta pelas células epiteliais. Essas células são hidrofóbicas, são ligadas intimamente por junções, permitindo a formação de uma barreira de defesa e estão em contínua renovação. A proliferação destas células ocorre graças a um fator de crescimento expresso nas células progenitoras gástricas e o receptor para este fator é o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) (LAINE et al., 2008).

As prostaglandinas representam outro fator de proteção da mucosa. Elas estimulam a produção de muco e bicarbonato, regulam o fluxo sanguíneo, reduzem a secreção gástrica, estimulam a renovação epitelial e inibem a expressão do TNF alfa, contribuindo para a integridade da mucosa (BRZOZOWSKI et al., 2005). As prostaglandinas são sintetizadas a partir de vários ácidos graxos essenciais, entre eles o ácido araquidônico (AA) e são liberadas após a síntese e aí vão exercer suas atividades interagindo com receptores presentes nas

células (DEY et al., 2006). Os prostanoídeos apresentam oito receptores, entre tipos e subtipos. Para prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ) existem os subtipos  $EP_1$ ,  $EP_2$ ,  $EP_3$  e  $EP_4$  (NARUMIYA, 2009).

O Fluxo sanguíneo na mucosa mantém a estrutura e a função do estômago e está associado à cicatrização de lesões gastrintestinais. É regulado e modificado por sistemas e fatores metabólicos locais como prostaglandinas, leucotrienos e outros mediadores químicos (KAWANO; TSUJI, 2000). O fluxo é importante para a entrada de oxigênio e nutrientes e remoção de substâncias tóxicas. Quando um agente irritante entra em contato com a mucosa gástrica ou quando ocorre uma re-difusão do ácido, há um aumento no fluxo sanguíneo que permite remover ou diluir o retorno do ácido. Esta resposta é essencial para a defesa porque a restrição do fluxo leva a uma necrose hemorrágica (LAINE et al., 2008).

O Óxido Nítrico é um gás volátil formado pela oxidação da L-arginina, cuja reação de oxidação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Existem três isoformas desta enzima: a óxido nítrico neuronal (nNOS ou NOS-1), a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS ou NOS-3) e a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS ou NOS-2). Quando gerado, O NO se liga ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GC`s), que catalisa a conversão da guanosina trifosfato (GTP) para guanosina monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc poderá se ligar a domínios específicos de proteínas e desencadear respostas celulares (LANAS, 2008). No TGI, o óxido nítrico participa da manutenção da homeostase, mantendo a barreira de muco. Além disso, é um potente vasodilatador, auxiliando na regulação do fluxo sanguíneo (SUGAMOTO et al., 2001; BAYIR et al., 2006).

O Sistema de defesa enzimático está presente nas células dos mamíferos e é um componente de defesa contra os radicais livres. Entre as enzimas que fazem parte deste sistema estão a catalase (CAT), a superóxido-desmutase (SOD) e a glutatona peroxidase ( $GP_x$ ). Além disso, a glutatona reduzida (GSH), um antioxidante não enzimático endógeno, e os antioxidantes não enzimáticos encontrados em frutas, vegetais e extratos de plantas, alguns minerais como zinco, vitamina E, vitamina C e os flavonoides auxiliam no combate aos radicais livres (KRVIDENIER, VERSPAGET, 2002).

## **1.6 Úlcera péptica**

As plantas medicinais são atrativas fontes de drogas e já está demonstrado que apresentam resultados promissores nos distúrbios gastrintestinais (BORRELL, IZZO, 2000). Entre os distúrbios gastrintestinais está a úlcera péptica. A úlcera é uma lesão necrótica

profunda que penetra através da mucosa e provoca a destruição dos componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos, células do músculo liso, vasos e nervos. e é resultante da necrose tecidual desencadeada pela isquemia, radicais livres e diminuição do oxigênio e nutrientes (TARNAWSKI et al., 2012). A úlcera já foi considerada a maior causa de morbidade e mortalidade por mais de um século (CHAN, LEUNG, 2002) e se desenvolve quando os fatores agressores prevalecem os fatores de defesa que mantém a mucosa intacta, (SIVRI, 2004; MALFERTHEINER et al., 2009).

Os fatores de agressão à mucosa compreendem uma variedade de fatores que produzem danos como o etanol, uso prolongado de medicamentos, fatores genéticos e infecção por *Helicobacter pylori* (SAUL, 2007).

O etanol é um dos fatores que agredem a mucosa e juntamente com o ácido, gera uma resposta inflamatória que destrói a camada protetora da mucosa e provoca necrose através de uma cadeia de eventos que incluem a liberação de radicais livres, enzimas e mediadores vasoativos que provocam vasoconstrição, hemorragia e edema, comprometendo o fluxo sanguíneo da mucosa (CASTRO et al., 2010; ROCHA et al., 2011). Os radicais livres lesam a membrana celular por coagular as proteínas, ácidos nucleicos e lipídios e tornam o tecido edemaciado, hemorrágico e necrosado (ROZZA, 2009). Além disso, depleta o muco da parede da mucosa (Al-KOWIRINY et al., 2003) e inibe a liberação de prostaglandinas E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub> (ABDEL-SALAM et al., 2001). A Inibição da síntese de prostaglandinas pode ser explicada pela ativação da via das lipoxigenases, que irão aumentar os níveis de leucotrieno C<sub>4</sub> e B<sub>4</sub>, diminuindo assim os produtos formados pelas ciclo-oxigenases (MAITY *et al.*, 2003; GOEL et al., 2002; PESKAR *et al.*, 2012).

A úlcera péptica abrange tanto as úlceras gástricas quanto as úlceras duodenais e apresenta-se como uma doença de alta morbidade e mortalidade. O sintoma predominante é a dor epigástrica, mas pode ser acompanhado por outros sintomas como o inchaço, saciedade e náuseas. As úlceras também podem ser assintomáticas e esta ausência de sintoma é comum nas úlceras induzidas por anti-inflamatórios não esteroidais. (AINES) (MALFERTHEINER et al., 2009).

A sua origem é multifatorial e esta enfermidade atinge um número considerável de pessoas em todo mundo. O estresse, dieta inadequada, fatores genéticos, álcool, uso indiscriminado de AINES e infecção por *Helicobacter pylori* são alguns fatores para o seu desenvolvimento (JAIN et al., 2007; MUSUMBA et al., 2009).

Estudos revelam a forte associação da bactéria *Helicobacter pylori* e as úlceras gástricas e duodenais. Estima-se que mais de 50% da população mundial tem infecção crônica



por esta bactéria e de 5%-10% dos infectados acabam desenvolvendo a úlcera (MALFERTHEINER et al., 2009).

O tratamento farmacológico para úlceras gástricas está baseado na utilização de medicamentos que diminuem a secreção ácida, e/ou a neutralização do ácido, e/ou a potencialização dos mecanismos protetores da mucosa (RANG et al., 2007). Atualmente, os fármacos utilizados para o tratamento de úlceras provocam muitos efeitos indesejáveis. Por isso, há um enorme interesse no uso das plantas como terapia alternativa (RATES, 2001; SCHMEDA-HIRSCHMANN, YESILADA, 2005). Os inibidores da bomba de prótons e os antagonistas dos receptores  $H_2$  são muito eficientes, mas apresentam alguns inconvenientes se utilizados por longos períodos. Esses efeitos incluem: osteoporose, riscos aumentados de infecções entéricas e desenvolvimento de pólipos gástricos que podem evoluir para câncer gástrico (CHUBINEH et al., 2012). Quando a *Helicobacter* está presente, o tratamento está baseado na sua erradicação com uso dessas drogas associadas com antibióticos (NAJM, 2011). Além disso, tem se tornado comum a resistência dos antibióticos a *Helicobacter pylori* (TCDER-UNAL et al., 2008) e muitos estudos tem se concentrado na erradicação da infecção por *Helicobacter pylori* utilizando plantas medicinais tradicionais (WANG et al., 2005; MAHONY et al., 2005; FONATOGAWA et al., 2004).

Apesar das terapias eficientes com o uso de inibidores da bomba de prótons e o combate à infecção por *Helicobacter pylori*, a úlcera péptica gástrica ainda se apresenta como um agravo de saúde com forte impacto econômico para os sistemas de saúde e com a diminuição da qualidade de vida dos indivíduos afetados (SUNG et al., 2009; LAU et al., 2011). Por isto, torna-se necessária e urgente a descoberta de produtos naturais que possam ser utilizados no tratamento desta patologia.

## **1.7 Produtos Naturais e Atividade Antiulcerogênica**

O conhecimento e uso de plantas medicinais acompanham a humanidade desde o início da civilização. Com o passar dos séculos, foi sendo acumulada uma gama de informações sobre as ações e os princípios ativos de várias espécies vegetais. Atualmente, são utilizadas pela medicina popular mais de 20.000 espécies distintas de plantas medicinais (DEEPIKA-GUPTA et al., 2008), simbolizando muitas vezes o único recurso terapêutico utilizado por várias comunidades e populações. A atividade gastroprotetora das plantas é atribuída à presença de substâncias como: cumarinas, terpenos, alcaloides, flavonoides,

taninos, ácidos fenólicos e micronutrientes como o cobre (Cu), Manganês (Mn) e Zinco (Zn) (MOTA *et al.*, 2009).

Atualmente, os fármacos utilizados para o tratamento de úlceras provocam muitos efeitos indesejáveis. Por isso, há um enorme interesse no uso das plantas como terapia alternativa (RATES, 2001; SCHMEDA-HIRSCHMANN, YESILADA, 2005). Além disso, a maioria dos fármacos derivados das plantas reduz os fatores que agridem a mucosa, são seguros, eficazes, mais acessíveis e mais toleráveis para o paciente (GOEL, SAIRAM, 2002).

Uma dos fatores que desencadeia a gastrite ou que potencializa o processo ulcerativo gástrico é infecção por *Helicobacter pylori*. Apesar das terapias eficientes com o uso de inibidores da bomba de prótons e o combate à infecção por *Helicobacter pylori*, a úlcera péptica gástrica ainda se apresenta como um agravo de saúde com forte impacto econômico para os sistemas de saúde e com a diminuição da qualidade de vida dos indivíduos afetados (SUNG *et al.*, 2009; LAU *et al.*, 2011). Outro fator limitante no tratamento das úlceras é o aumento da resistência aos antibióticos (TCDER-UNAL *et al.*, 2008) e muitos estudos tem se concentrado na busca por substâncias que possam erradicar a infecção por *Helicobacter pylori*. A utilização de plantas no tratamento desta infecção oferece vantagens significativas como maior conveniência e redução do custo do tratamento (WANG *et al.*, 2005).

### **1.8 Atividade Antimicrobiana e Resistência aos Antibióticos**

Várias são as razões que justificam a necessidade urgente da descoberta de novos antibióticos: a diminuição constante de agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA (PAYNE *et al.*, 2007), as infecções bacterianas como sendo a segunda causa de mortalidade no mundo, alta prevalência de resistência microbiana e a necessidade de se encontrar agentes que atuem por mecanismos diferentes aos fármacos em uso (LUZHETSKYY *et al.*, 2007; COATES; HU, 2007).

A identificação do papel da *Helicobacter pylori* em contribuir para o processo ulcerativo no duodeno e estômago fez surgir a ideia de que a eliminação desta bactéria seria uma estratégia para promover a cicatrização das úlceras e evitar a sua recorrência (ROBERTS; MORROW, 2001).

Atualmente, a terapia antibiótica utilizada para erradicar a infecção por *Helicobacter pylori* é uma combinação de dois antibióticos (Claritromicina e Amoxicilina) associados a duas ou três drogas, como os inibidores da bomba de prótons, bloqueador H<sub>2</sub> e sais de bismuto (DOORN *et al.*, 2000; GODOY *et al.*, 2003), mas a recorrência de infecção e a resistência aos

antibióticos tem se desenvolvido em diferentes partes do mundo (EGAN et al., 2007), o que torna essencial a procura por produtos naturais com atividade anti-*Helicobacter pylori*, que além de servir como fonte de novos fármacos poderia ainda ser associada a terapia convencional.

A pesquisa por novas substâncias com atividade contra bactérias se torna necessária, pois os patógenos clinicamente importantes têm se tornado resistentes aos antibióticos (COSTA et al., 2007). Nos últimos anos, houve um crescimento acelerado da resistência das bactérias a múltiplos agentes terapêuticos (LAI et al., 2011; GRUNDMANN et al., 2011).

Dentre os patógenos de relevância clínica, algumas se destacam como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e representam um dos focos na saúde pública, uma vez que estão envolvidos com diversas patologias (DIAS, MONTEIRO, 2010). Outra problemática é a resistência a leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente a terapia atualmente utilizada, o que torna difícil o tratamento das infecções fúngicas. Desta maneira, torna-se também importante a busca por novos compostos de origem vegetal que possam auxiliar nesta terapêutica (LIMA et al., 2006).

Na procura por substâncias com potencial antibacteriano, produtos naturais de plantas poderiam ser alternativas interessantes (OLIVEIRA et al., 2007, SILVA et al., 2007), uma vez que as plantas constituem uma das fontes mais importantes de substâncias utilizadas como agentes terapêuticos (BRAZ-FILHO, 2010). Recentemente, muitas plantas têm sido conhecidas não só por apresentarem efeito antibacteriano, mas também por atuarem como moduladores de antibióticos (GURIB-FAKIM, 2006; GIBBONS, 2004).

*Croton rhamnifolioides* popularmente conhecido como “Quebra-faca”, pertence a Família Euphorbiaceae. *Croton* é o segundo maior e mais diverso gênero desta família (FRODIM, 2004). Estudos demonstram que algumas espécies deste gênero apresentam atividades anti-inflamatória, antiulcerogênica, antimutagênica, antiestrogênica e hipoglicêmica (ROSA et al., 2003), atividades antifúngicas (VIEIRA, 2007) e antibacteriana (SILVA, 2011). Plantas deste gênero também são ricas em diterpenos (CARNEIRO et al., 2011) e se caracterizam pela produção de óleo essencial (DIAS et al.; 2006 e BRASIL et al., 2009).

Os óleos essenciais com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais têm sido investigados em todo mundo como fontes de novos compostos antimicrobianos e como agentes da promoção da conservação de alimentos (SAFAEI-GHOMI et al., 2010; ASTANI et al., 2010; BELLETTI et al., 2008, ALVIANO et al., 2008). De acordo com Daferera (et al. 2003), o uso de óleos essenciais com propriedades antimicrobianas oferece um baixo risco de

desenvolvimento de resistência bacteriana uma vez que estes apresentam em sua composição várias substâncias.

## 1.9 Justificativa

Em todas as civilizações sempre existiu uma estreita relação entre as plantas e os homens. O primeiro relato sobre o estudo do homem sobre plantas medicinais data do ano 2700 a.c, onde foram descritas 365 drogas (DAVID, 2006).

Atualmente, estudos de plantas medicinais que apresentam alguma ação sobre o trato gastrointestinal assumem grande importância em nossa sociedade, visto que os medicamentos hoje disponíveis para o tratamento desses distúrbios apresentam alguns efeitos colaterais como, por exemplo, constipação, diarreia e gastrinemia (POTRICH, 2009).

A úlcera péptica constitui uma desordem do trato gastrointestinal que afeta milhões de pessoas em todo mundo e é uma das causas de morbidade e mortalidade (BIRDANE et al., 2007). O tratamento para este problema de saúde é de alto custo e conseqüentemente não está acessível para a maior parte da população. Neste sentido, torna-se necessário a busca por substâncias que possam servir para o desenvolvimento de medicamentos eficazes, de baixo custo e com menos efeitos colaterais.

O uso popular de produtos naturais, principalmente os derivados de plantas medicinais, está entre as mais atrativas fontes de medicamentos, e tem mostrado resultados promissores no tratamento da úlcera gástrica. Estudos relacionados a prováveis mecanismos de ação sugerem que uma investigação fitoquímica detalhada, com identificação de frações e seguida do isolamento de princípios ativos, pode resultar no desenvolvimento de moléculas promissoras (VYAWAHARE, 2009). A maioria desses fármacos derivados de plantas reduz os fatores agressores à mucosa, é segura, clinicamente eficaz, mais tolerável para o paciente, relativamente barata e globalmente competitiva (GOEL, SAIRAM, 2002). A população da região onde foi coletada *Croton rhamnifolioides* utiliza diversas espécies do gênero *Croton* para fins terapêuticos, mas que ainda necessitam de estudos para a comprovação científica das atividades biológicas.

Estudos envolvendo plantas medicinais aumentam mundialmente devido a vários fatores como a exigência da população por um modelo de vida mais saudável e natural, a procura por medicamentos com menos efeitos adversos que são característicos dos produtos

sintéticos (NEGRI, 2007) e a resistência bacteriana e antifúngica aos antimicrobianos atualmente utilizados. Existe a preocupação de não haver produtos que possuam atividade contra microrganismos resistentes. A descoberta do potencial antimicrobiano das plantas é motivo de vários estudos, pois mesmo que algumas plantas já tiveram esta propriedade comprovada, tornam-se necessários estudos para entender como este processo ocorre (SCHELZ, HOHMANN, 2006). Já é relatado na literatura que o uso associado de plantas medicinais com antimicrobianos pode inibir ou intensificar os efeitos das drogas antimicrobianas convencionais, bem como não interferir na resposta esperada (NASCIMENTO et al., 2006). Sendo assim, é necessária e urgente, a descoberta de novos compostos com atividade antimicrobiana.

Apesar do crescente aumento das pesquisas envolvendo os produtos naturais, estudos mostram que apenas 15% a 17% das plantas já foram estudadas quando ao seu potencial terapêutico (ALLEMAND, 2009).

Várias espécies de *Croton*, plantas da família Euphorbiaceae, são frequentemente utilizadas na medicina popular por apresentar diversas atividades biológicas: anti-inflamatória, antiulcerogênica, antifúngica, antibacteriana, antiproliferativa, antinociceptiva, entre outras, já comprovadas cientificamente, *Croton rhamnifolioides* espécie em estudo, é utilizada na medicina popular para úlceras, inflamações e hipertensão e necessita de estudos para comprovar suas ações.

Diante do potencial da caatinga, da enorme quantidade de vegetais que ainda precisam ser explorados cientificamente e diante da necessidade de se encontrar novos compostos com ação antiulcerogênica e com potencial antimicrobiano, fica demonstrada a relevância quanto à busca de se conhecer as potencialidades de *Croton rhamnifolioides*, bem como indicar possíveis mecanismos de ação. Pode-se, assim, descobrir nesta espécie vegetal substâncias que sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos.

## **OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- ✓ Determinar perfil químico, avaliar atividade gastroprotetora e vias envolvidas e, estimar a atividade antimicrobiana e modulatória da resistência microbiana do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* utilizando ensaios *in vivo* e *in vitro*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a composição química do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS).
- ✓ Verificar a ação do OEC isolado e em associação com antimicrobianos frente às cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.
- ✓ Determinar a dose letal média (DL<sub>50</sub>) do OEC frente a modelos animais;
- ✓ Avaliar a atividade gastroprotetora do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides*. (OEC) em modelos de lesão gástrica induzidas por etanol, etanol acidificado e indometacina;
- ✓ Verificar o possível mecanismo envolvido na gastroproteção promovida pelo OEC, verificando a participação dos receptores: tipo vaniloides (TRPV-1), opioides, histamínicos, alfa<sub>2</sub>-noradrenérgico, participação do óxido nítrico e canais de potássio ATP dependentes;

# **MATERIAL E MÉTODOS**

---



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Breve caracterização da Área de Estudo

A caatinga é um bioma localizado no Nordeste do Brasil que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte de Minas Gerais e que se destaca como um patrimônio biológico desta região que não existe em nenhum outro lugar do mundo. De todos os biomas brasileiros, a caatinga é o menos protegido e ao mesmo tempo é a região que mais sofre com a deterioração ambiental. Por estes e outros fatores, o estudo e a conservação da biodiversidade tem se tornado um grande desafio para os pesquisadores brasileiros (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007; LEAL et al., 2003).

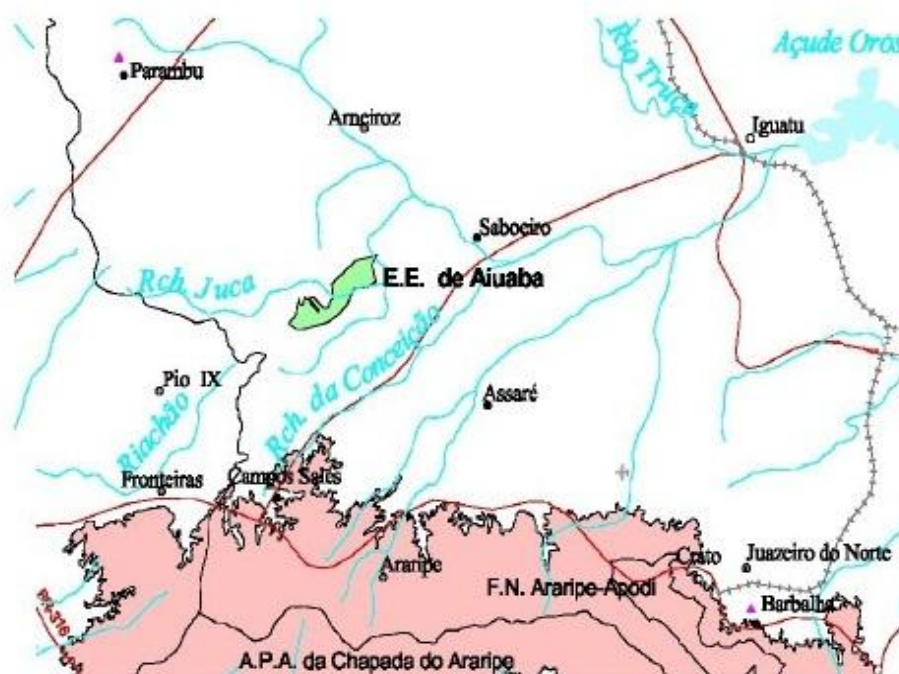
O termo “Caatinga” é de origem Tupi e significa “mata branca”, referindo-se ao aspecto de vegetação durante a estação seca, onde a maioria das árvores perdem as folhas e os troncos se tornam esbranquiçados e dominam a paisagem (PRADO, 2003). Este bioma ocupa uma área com cerca de 850.000 Km<sup>2</sup> (QUEIROZ, 2009), é o único restrito ao território brasileiro (TABARELLI et al., 2003) e apresenta uma riqueza em biodiversidade, apesar de ser em menor número quando comparado ao Pantanal e Amazônia (PIMENTEL, 2010).

Neste Bioma, no Estado do Ceará do Nordeste do Brasil, pode-se encontrar a Estação Ecológica de Aiuaba. As Estações Ecológicas foram instituídas através da Lei nº 6.902 de 27 de Abril de 1981 e estabelece no seu artigo 1º que “Estações Ecológicas” são áreas representativas de ecossistemas brasileiros destinadas à realização de pesquisas básicas e aplicadas a ecologia, à proteção do ambiente natural e ao desenvolvimento conservacionista (BRASIL, 1981).

A Estação Ecológica de Aiuaba (Figura 3 – área destacada em verde) está localizada no Município de Aiuaba, Estado do Ceará, e foi reconhecida como uma Estação Ecológica em 2001 através do Decreto sem nº de 06 de Fevereiro. Apresenta área de 11.525.34 há, perfazendo perímetro de 72,77 Km (BRASIL, 2001). Este local apresenta vegetação que varia do extrato arbóreo denso a vegetações mais arbustivas e com plantas espaçadas entre si (MEDEIROS, 2004).

Em estudo realizado por Samara (2010) demonstra que nesta região foram registradas cerca de 75 espécies de plantas de uso medicinal distribuídas em 40 famílias e 65 gêneros. Dentre os gêneros mais encontrados estão *Spondias* (Anacardiaceae), *Annona* (Annonaceae) e *Croton* (Euphorbiaceae).

**Figura 3:** Localização Geográfica da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Brasil



Fonte: IBAMA, 2006.

### 3.2 Material botânico

As folhas de *Croton rhamnifolioides*, utilizadas para a produção do óleo essencial, foram coletadas de indivíduos desta espécie, localizados no Bioma Caatinga, na Estação Ecológica de Aiuaba, Sul do Ceará. Para a realização desta coleta foi solicitada e obtida autorização do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio), Órgão responsável pela FLONA- Araripe- Apodi, sob o Número 34112-1 O Material foi coletado no mês de junho de 2012, sob as coordenadas: longitude oeste  $40^{\circ}10'46,27''S$  e  $6^{\circ}40'15,46''W$  latitude sul e altitude de 710 metros em relação ao nível do mar.

### 3.3 Preparação da exsicata

O material botânico, apresentando floração, foi coletado e herborizado com o auxílio de prensa e jornal, levado ao sol e com tempo de secagem necessário para a preparação da exsicata. A identificação do material botânico foi realizada pelo Pesquisador João Marcelo

Alvarenga do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. O processo de incorporação ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro ainda se encontra em fase de finalização.

### **3.4 Ensaaios *in vitro***

#### *3.4.1 Obtenção do óleo essencial*

O óleo essencial foi obtido utilizando o sistema de hidrodestilação em aparelho tipo clevenger. As folhas frescas de *Croton rhamnifolioides* foram colocadas em um balão de vidro de 5L acrescida de água destilada. Após este período, a mistura água-óleo obtida foi separada, tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o óleo mantido sob refrigeração até o momento das análises.

#### *3.4.2 Análise da composição química do óleo essencial*

A análise do óleo essencial foi realizada através do método de cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) em um aparelho Shimadzu GC MS-série QP2010 com as condições programadas: coluna capilar Rtx-5MS com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e com filme de 0,25 mm de espessura; gás de arraste; Hélio (1,5 mL/m); A temperatura da coluna variou de 60° C - 180°C a 5° C/min e depois a 180° - 280° a 10° C/min (10 minutos); Temperatura do injetor de 250° C; O volume de óleo injetado foi de 1mL/5mL de CHCl<sub>3</sub>; Relação split (1:200) com tempo de corte do solvente de 2,5 min. A velocidade de digitalização foi de 0,5 scan/seg de m/z40 e 350. O Espectrômetro de massas foi operado com 70 eV de energia de ionização. A identificação dos compostos foi baseada na sua fragmentação de espectro de massa registrados na biblioteca espectral NIST Mass 08, nos seus índices de retenção e comparação com dados já publicados.

#### *3.4.3 Atividade Antimicrobiana*

##### *3.4.3.1 Microrganismos*

Os microrganismos utilizados nos testes *in vitro* foram obtidos da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As linhagens bacterianas utilizadas foram: *Echerichia coli* (EC-ATCC25922 e EC06),

*Staphylococcus aureus* (SA-ATCC25923 e SA10) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA-ATCC9027 e PA15). As linhagens de fungos utilizadas foram: *Candida albicans* (LM122), e *Candida tropicalis* (LM18). Todas as linhagens foram mantidas em Agar infusão de coração (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Antes dos ensaios, as linhagens foram cultivadas por 18h a 37°C em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Difco Laboratories Ltda.). A origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos, das linhagens bacterianas multirresistentes, encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** A origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos

<b>Bactéria</b>	<b>Origem</b>	<b>Perfil de Resistência</b>
<i>Echerichia coli</i> 06 (EC06)	Urocultura	Ca, Cef, Cf, Cpm, Cro
<i>Staphylococcus aureus</i> 10 (SA10)	Swab retal	Ca, Cef, Cf, Oxa, Pen, Amp, Amox, Mox, Cip, Lev, Asb, Amc, Eri, Cla, Azi, Clin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 15 (PA15)	Ponta de cateter	Cpm, Ctz, Imi, Cip, Ptz, Lev, Mer

Ast – Aztreonan; Ax – Amoxicilina; Amp – Ampicilina; Asb – Ampicilina + Sulbactam; Ami – Amicacina; Amox – Amoxicilina; Amc – Amoxicilina + Ac. clavulânico; Azi – Azitromicina; Ca – Cefadroxil; Cfc – Cefaclor; Cf – Cefalotina; Cef – Cefalexina; Com – cefepime; Cla – Claritromicina; Cro – Ceftriaxona; Ctz – Ceftazidima; Cip – Ciprofloxacina; Clo – Cloranfenicol; Clin – Clindamicina; Imi – Imipenem; Can – Canamicina; Szt – Sulfametrim; Tet – Tetraciclina; Tob – Tobramicina; Oxa – Oxacilina; Gen – Gentamicina; Lev – levofloxacina; Mer – meropenem; Mox – Moxifloxacina; Neo – Neomicina; Para – Paramomicina; But – Butirosina; Sis – Sisomicina; Net – Netilmicina; Pen – Penicilina; Ptz – Piperacilina +Tazobactam ( - ) Ausência de resistência ou resistência sem relevância.

#### 3.4.3.2 Antibióticos

Para avaliar a atividade moduladora da ação antibiótica do OEC foram utilizadas diversas drogas (Amoxicilina, Amicacina, Gentamicina e Oxacilina.). Como antifúngicos foram utilizadas as drogas Nistatina, Benzoilmetronidazol e Anfotericina. As drogas foram obtidas do Laboratório Sigma Chemical Corp. St Louis , MO, EUA. Todas as soluções foram preparadas com base nas recomendações estabelecidas em NCCLS (2003).

### 3.4.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e Modulação da atividade dos antibióticos e de antifúngicos frente a resistência microbiana.

A CIM (concentração inibitória mínima) do óleo essencial e do DMSO foram determinados em ensaio de microdiluição em caldo (NCCLS 2003) utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentava uma concentração de  $10^5$  UFC/mL em placas de microtitulação com 96 poços, com diluições em série 1:2. Em cada poço foi adicionado 100µL do óleo essencial de *Croton rhamnifoloides*. As concentrações finais da substância variaram entre 512 – 8 µg/mL. Para os controles foram utilizados os antibióticos Amoxicilina, Amicacina, Gentamicina e Oxacilina cujas concentrações finais variaram entre 512 µg/mL – 8,0 µg/mL. Como antifúngicos foram utilizados Nistatina, Anfotericina e Benzoilmetronidazol. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de Resazurina. As CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento.

Para avaliar a substância como moduladora da ação antibiótica e antifúngica, a concentração subinibitória, determinado pela CIM/8 de antibióticos e dos antifúngicos, foram avaliados na presença e na ausência do óleo essencial e também na ausência e presença de DMSO em microplacas estéreis. Os antibióticos foram avaliados nas concentrações variando de 2500 a 2,44 µg/mL. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto a sigma.

O óleo essencial foi misturado em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias, obtidas e determinadas após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que para o teste de modulação a concentração da solução de óleo e do DMSO foi reduzida 8 (oito) vezes (CIM/8). A preparação das soluções dos antimicrobianos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100µL diluídos seriadamente 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100µL do meio de cultura continha a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para o óleo foram utilizados durante a modulação (COUTINHO *et al.*, 2008). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de Resazurina. O ensaio antibacteriano e antifúngico foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições.

### 3.5 Ensaios *in vivo*

#### 3.5.1 Animais e Aspectos éticos da pesquisa

Foram utilizados nos experimentos camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade *Swiss*, de ambos os sexos, pesando entre 20-30 g, oriundos da Unidade de Contenção de Animais da Universidade Regional do Cariri (URCA). Os animais foram mantidos em rotatividade de ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão e água “*ad libitum*”. No dia anterior ao ensaio, os animais foram marcados e a ração retirada 15 horas antes da experimentação, sendo a pesagem dos camundongos a primeira etapa de cada teste.

Todo trabalho foi realizado de acordo com as normas de Bioética reconhecidas pela Lei nº 11.794/08, a qual regulamenta o uso de animais para fins científicos e foi autorizado pelo Comitê de Experimentação e Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri CEUA/URCA 20/2012.2

#### 3.5.2 Determinação da Dose Letal Média ( $DL_{50}$ )

A dose letal média foi estabelecida a partir do método preconizado pela OECD, 2008, definido através do número de ocorrência de mortes. Os animais foram divididos em grupos, em número de três, e o OEC em várias concentrações (2000,1500,500,150,50,15 e 5mg/kg) foram administrados por via oral, através do processo de gavagem. Foram observadas alterações de pelo e de pele, alterações nos olhos e mucosas e também no sistema respiratório, na atividade motora, e no sistema nervoso, além da ocorrência de morte em períodos variados (10 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h e 24h) até o décimo quarto dia.

#### 3.5.3 Atividade Antiulcerogênica

##### 3.5.3.1 Lesão gástrica induzida por etanol absoluto (ROBERT.et al.,1979)

Os Camundongos *Swiss* (n=6) foram tratados oralmente com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.), Omeprazol (30 mg/ Kg v.o.) ou OEC (100, 200 e 400 mg/Kg v.o.). Este pré- tratamento foi realizado 1h antes da indução de lesões

por etanol <sub>abs</sub> (0,2 mL/ animal, v.o.). Decorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9%, comprimidos entre duas lâminas, escaneados e digitalizados. Para avaliação e quantificação das lesões gástricas as imagens foram analisadas no *software* (ImageJ) através da quantificação de pixel. Para determinação da área foi utilizada a relação percentual em relação à área total do corpo gástrico.

### 3.5.3.2 Lesão gástrica induzida por etanol acidificado (MIZUI et al., 1987)

Camundongos *Swiss* (n=6) foram tratados com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.), Omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) ou OEC (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.) uma hora antes da administração via oral de 0,2 mL de uma solução de 0,3 M de HCl em etanol 60 %. Após 1 h os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% comprimidos entre duas lâminas, escaneados e digitalizados. Para avaliação e quantificação das lesões gástricas as imagens foram analisadas no *software* (ImageJ) através da quantificação de pixel. Para determinação da área foi utilizada a relação percentual em relação a área total do corpo gástrico

### 3.5.3.3 Lesão gástrica induzida por indometacina (DJAHANGUIRI et al., 1969)

Camundongos *Swiss* (n=6) foram tratados oralmente com solução salina (1 % de *Tween* 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.), Omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) ou OEC (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.) uma hora antes da administração da indometacina (10 mg/Kg, v.o.). Após 3 h da administração do anti-inflamatório, os tratamentos foram repetidos com a salina, omeprazol e o OEC. Seis horas após a administração da indometacina os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. Para avaliação e quantificação das lesões gástricas as imagens foram analisadas no *software* (ImageJ) através da quantificação de pixel. A pontuação foi determinada pelo método de *score*, realizando uma quantificação das lesões gástricas que geraram um valor de acordo com a Tabela 2 abaixo ( ZINKIEVICK et al., 2010).

**Tabela 2** - Sistema de determinação de Pontuação de Lesão Gástrica.

PONTOS	TIPO DE LESÃO
0	AUSENTE
1	LEVE EDEMA
2	EDEMA E HEMORRAGIA
3	1-2 ÚLCERAS PONTUAIS
4	1-2 ÚLCERAS EXTENSAS
5	VÁRIAS ÚLCERAS PONTUAIS
6	ÚLCERAS EXTENSAS VISÍVEIS NA MUCOSA

#### 3.5.3.4 Teste de barreira física

Os animais foram tratados com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o..) e o OEC (200 mg/Kg, v.o.. ou i.p.). Após 1 hora dos tratamentos, os animais do grupo que receberam o OEC por via oral receberam etanol acidificado (0,2 mL v.o..) e o grupo de animais que receberam o OEC por via intraperitoneal receberam o etanol acidificado (0,2 mL i.p..) após 30 minutos. Decorridos 1 hora após a indução das lesões, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com o grupo, com posterior análise através do método informatizado anteriormente descrito. (vide 3.5.3.1).

### 3.6 Estudo dos possíveis mecanismos envolvido na atividade gastroprotetora do OEC

#### 3.6.1 Envolvimento do Óxido Nítrico (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999)

Para avaliar o envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito antiulcerogênico do OEC no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, camundongos *Swiss* (n=6) foram tratados com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o..), OEC (200mg/Kg, v.o.) 1 hora antes ou L-arginina (600mg/Kg, i.p..) 30 minutos antes de receberem



etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal, v.o.). Para verificar o envolvimento do óxido nítrico foi administrado NG nitro- L-arginina-metilester (L-NAME, 20mg/kg; i.p.), um inibidor inespecífico das enzimas óxido nítrico sintetases, 30 minutos antes da administração do OEC (200 mg/Kg, v.o.) ou L-arginina (600mg/Kg, i.p.). Após 30 minutos da administração da L-arginina e 1 hora após a administração do OEC os animais receberam etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal, v.o.). Trinta minutos após a administração do etanol<sub>abs</sub> os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ* conforme descrito no item 3.5.3.1

### 3.6.2 Envolvimento dos canais de $K^+$ -ATP-dependentes ( $K^+$ ATP) (RAHGOZAR et al., 2001)

Grupos de camundongos (n=6) *Swiss* foram tratados com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), OEC (20 mg/Kg, v.o.) ou diazóxido (DZO) (3mg/Kg, i.p.) 1 h antes ou 30 minutos antes de receberem etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal, v.o.). Para avaliar a possível participação dos canais de  $K^+$  ATP no efeito antiulcerogênico do OEC foi administrada glibenclamida (5mg/kg, v.o.), bloqueador seletivo dos canais de potássio, 30 minutos antes da administração do OEC (200mg/Kg, v.o.) ou diazóxido (3mg/Kg, i.p.) Após 30 minutos da administração do diazóxido e 1 hora após a administração do OEC os animais receberam etanol<sub>abs</sub>. Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ* conforme descrito no item 3.5.3.1

### 3.6.3 Envolvimento dos receptores $\alpha_2$ -noradrenérgicos (LAPA et al., 2008)

Camundongos *Swiss*, divididos em grupos (n=6), foram tratados com salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), OEC (200mg/Kg, v.o.) ou Clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) 1 hora ou 30 minutos antes da administração de etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal, v.o.). O envolvimento dos receptores noradrenérgicos- $\alpha_2$  foi avaliado pela administração prévia de da ioimbina (2mg/Kg, i.p.) 20 minutos antes da administração do OEC (200 mg/Kg, v.o.) ou Clonidina (0,1mg/Kg, i.p.). Após 1 hora da administração do OEC ou 30 minutos da administração da clonidina os animais receberam etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos após a administração do etanol<sub>abs</sub>, os animais foram sacrificados, os estômagos

retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ* conforme descrito no item 3.5.3.1

#### 3.6.4 *Envolvimento dos receptores histamínicos (H<sub>2</sub>)*

Camundongos *Swiss*, divididos em grupos (n=6), foram tratados com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), OEC (200mg/Kg, v.o.) ou Ranitidina (40 mg/Kg, v.o.) 1h antes da administração de etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal, v.o.). O envolvimento dos receptores H<sub>2</sub> foi avaliado a partir de combinações onde o OEC (200mg/Kg, v.o.) ou Ranitidina (40 mg/Kg, v.o.) foram administrados 30 minutos antes da administração da Histamina (3mg/Kg, s.c.) Trinta minutos após a administração do OEC e Ranitidina os animais receberam etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos da administração do etanol<sub>abs</sub> os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ* conforme descrito no item 3.5.3.1

#### 3.6.5 *Envolvimento dos receptores opioides*

Camundongos *Swiss*, divididos em grupos (n=6), foram tratados com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), OEC (200mg/Kg, v.o.) ou Morfina (5mg/Kg, s.c.) 30 minutos antes de receberem o etanol<sub>abs</sub> (0,2mL/animal; v.o.). A participação dos receptores opioides no efeito gastroprotetor do OEC foi evidenciado pela administração prévia de naloxona (2mg/kg, i.p.) 15 minutos antes da administração prévia de OEC (200 mg/Kg, v.o.) ou morfina (5mg/Kg, s.c.). Após 30 minutos da administração da morfina e 1h após a administração do OEC os animais receberam etanol<sub>abs</sub> (0,2mL/animal; v.o.). Decorridos 30 minutos após a administração do etanol<sub>abs</sub> os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ* conforme descrito no item 3.5.3.1

### 3.6.6 Envolvimento da participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina (MATSUDA, LI e YOSHIKAWA, 1999)

Camundongos *Swiss*, divididos em grupos (n=6), foram tratados com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), OEC (200mg/Kg, v.o.) 1 hora antes ou capsaicina (5mg/Kg; i.p.) 30 minutos antes de receberem o etanol<sub>abs</sub> (0,2mL/animal; v.o.).

Foi administrado aos animais dos demais grupos capsazepina (5mg/kg; i.p.) a fim de investigar a participação dos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina, 30 minutos antes do OEC (200mg/Kg, v.o.) ou capsaicina (5mg/Kg; i.p.). Após 30 minutos da administração da capsaicina e 1 hora após a administração do OEC os animais receberam etanol<sub>abs</sub> (0,2mL/animal; v.o.). Decorridos 30 minutos após a administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ*. conforme descrito no item 3.5.3.1

### 3.7 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), avaliados pela análise de variância (ANOVA) e os testes de múltipla comparação Sidak, Dunnett, Newman Keuls e Tukey (quando necessário), sendo os cálculos realizados a partir do software estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

## **RESULTADOS**

---

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Coleta do Material botânico e preparação do óleo

Foram obtidas 1990 g de folhas secas de *Croton rhamnifolioides* que posteriormente foram submetidas ao processo de hidrodestilação em um aparelho tipo Clevenger. Após este período, a mistura água- óleo obtida foi separada, tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o óleo mantido sob refrigeração até o momento das análises. Ao final, obteve-se 5 mL de óleo essencial, gerando um rendimento de 0,2%.

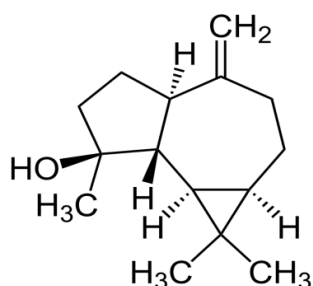
### 4.2 Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides*

A investigação da composição química dos óleos essenciais foi iniciada no século dezenove e levou a descoberta de hidrocarbonetos denominados terpenos (MORAES et al., 2007). A composição química do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* revelou 21 compostos, sendo o espatulenol e o 1-8 cineol os compostos majoritário conforme visto na Tabela 3.

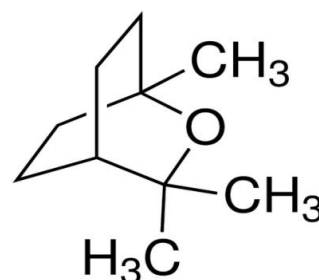
**Tabela 3:** Composição química (%) do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*.

Componente	(%)	RT (min)
$\alpha$ -pineno	2,14	6,56
Sabineno	2,81	7,99
$\alpha$ -felandreno	1,63	9,35
o-cimeno	7,22	10,24
1,8-cineol	18,32	10,63
linalol	2,71	13,87
isoborneol	1,04	17,52
4-terpineol	4,24	18,08
$\alpha$ -terpineol	6,12	18,95
$\beta$ -elemeno	1,00	29,18
<i>trans</i> -cariofileno	6,09	30,71
$\alpha$ -humuleno	1,78	32,49
aromadendeno	2,64	32,71
germacreno D	1,09	33,80
$\beta$ -selineno	2,09	34,20
$\gamma$ -elemeno	4,45	34,59
espatulenol	22,46	38,79
globulol	1,77	39,87
óxido cariofileno	1,53	40,10
$\delta$ -cadineno	3,92	41,90
$\alpha$ -cadinol	1,66	42,59
<b>TOTAL</b>	<b>96,71</b>	

**Figura 4:** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides*.



Epatulenol



1,8-cineol

Muitos dos compostos encontrados no óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* são também encontrados em várias espécies do gênero *Croton* e já possuem atividades biológicas comprovadas cientificamente. A constituição química do OEC se assemelha também a constituição química do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides*, onde dos oito constituintes identificados, 04 também foram identificados no OEC:  $\alpha$  pineno, sabineno, linalol e germacreno-D (COSTA et al., 2013)

O espatulenol, encontrado no OEC, é abundante nas Angiospermas, sendo encontrado também em outras famílias: Myrtaceae (APEL et al., 2006), Lamiaceae (ZIAEI et al., 2010), Poaceae (HESS et al., 2007) e Asteraceae (MENDES et al., 2010). O espatulenol também se apresentou como composto majoritário em *Croton argyrophyloides* e possui atividade anticâncer, atividade imunomoduladora (ZIAEI et al., 2010) e antibacteriana (ALCÂNTARA et al., 2010) comprovadas. Em *Croton argyrophyllus*, o espatulenol se apresenta como um dos compostos majoritário e em estudo realizado por RAMOS et al., 2013, o óleo essencial apresentou propriedades anti-inflamatórias e antioxidante. Este composto também foi encontrado em *Croton matounensis* (COMPAGNONE et al., 2010), *Croton zambesicus* (USMAN et al., 2009, BOYOM et al., 2002), *Croton urucurana* (SIMIONATTO, 2007), *Croton sonderianus* (LIMA et al., 2006). *Croton argyrophyllus* (RAMOS et al., 2013), *Croton isabelli*, *Croton pallidulus*, *Croton ericoides* (VUNDA et al., 2012).

Os outros constituintes de *Croton rhamnifolioides* também são comuns de serem encontrados em outras espécies do gênero. Em outros estudos, o óleo de *Croton pullei* apresentou Germacreno-D que apresenta atividade antinociceptiva (ROCHA, 2008). O

Linalol também foi encontrado em *Croton oligrandum* e apresenta atividade antioxidante (AGNANIET et al., 2005). Rosa et al. (2003) relata a atividade anti-leishmania para o linalol. Além destas atividades, o linalol também apresenta atividade sedativa (LINCK et al., 2009), antinociceptiva (BLANK et al., 2007) e larvicida (SYLVESTRE et al., 2007).

Dados da literatura mostram que o-cimeno, constituinte presente no OEC, apresenta atividade inseticida e repelente (TAVARES, 2009). O  $\alpha$ -pineno, composto majoritário de *Hyptis spicigera*, e também composto encontrado no OEC, apresenta sinergismo com outros pinenos e apresenta várias atividades biológicas, entre elas a atividade anti-inflamatória (NEVES et al., 2010). Este composto, também apresenta atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* resistente (SILVA et al., 2012). O  $\alpha$ -felandreno apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* e *Escherichia coli* (BELHAMEL et al., 2008).

O  $\alpha$ -humuleno, foram encontradas na literatura as atividades inseticida (YANG, 2003), antioxidante (WEEL et al., 2005), antimicrobiana e anticâncer (LEGAULT, 2003). O 1,8-cineol, um dos compostos majoritários de *Croton rahminofolioides*, é muito comum em outras espécies como *Croton zehntneri*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophyllodes* (MORAIS et al., 2006) e apresenta atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (AMARAL et al., 2004). O 1,8 cineol, também se apresenta como composto majoritário do óleo essencial de *Hyptis martiusii*. Esta espécie apresenta atividade gastroprotetora frente ao modelo clássico de lesão gástrica induzida por etanol (CALDAS et al., 2014).

Tanto o óleo essencial de *Croton argyrophyllus* e o OEC apresentam em sua composição terpenos. O potencial anti-inflamatório destes compostos é descrito na literatura por alguns autores (BENTO et al., 2011; RIELLA et al., 2012; CHAVAN et al., 2010). A presença do espatulenol, um sesquiterpeno, como um dos compostos majoritários tanto do *Croton argyrophyllus* quanto do OEC juntamente com os outros compostos pode estar contribuindo para os efeitos anti-inflamatórios e gastroprotetor promovidos por estas espécies.

Geralmente os componentes refletem muito bem as características biofísicas e biológicas do óleo essencial a partir da qual foram isolados. No entanto, é possível que a atividade do componente principal seja modulada por outros componentes menores. Nesse sentido para fins biológicos é importante o estudo do óleo como um todo em vez de estudar alguns de seus componentes, pois o sinergismo entre os componentes é significativo (BAKKALI et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009; MERCIER,PROST, 2009).

### 4.3 Atividade Antimicrobiana

#### 4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Muitos antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* produzem inúmeros efeitos colaterais e muitas vezes podem induzir a resistência fúngica, principalmente em pacientes imunocomprometidos (FICA, 2004). Os aminoglicosídeos podem provocar nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular como efeitos tóxicos (VALLEJO et al., 2001; OLIVEIRA, 2006). A resistência às penicilinas se tornou frequente. Cerca de 90% a 95% das cepas de *Staphylococcus aureus* é resistente as penicilinas (CASAL et al., 2005). A descoberta de substâncias que promovam efeito sinérgico quando combinados com eles torna-se relevante uma vez que o efeito sinérgico pode ser utilizado para minimizar estes efeitos.

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do produto natural e do DMSO frente às linhagens bacterianas e antifúngicas comparativamente apresentaram o mesmo resultado revelando CIM de 128 µg/mL para as bactérias e CIM de 64 µg/mL para os fungos, não demonstrando atividade clínica relevante. O óleo essencial não apresentou atividade antimicrobiana e a atividade antimicrobiana observada é devido à ação do DMSO. No entanto, o OEC em combinação com os antibióticos gentamicina e oxacilina apresentou atividade importante na potencialização dos efeitos desses fármacos.

Atividades antimicrobianas de óleos essenciais tem sido extensivamente investigadas devido as suas aplicações na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos, já que a resistência aos antibióticos e a resistência aos agentes microbiológicos mais utilizados na indústria de alimentos tem aumentado (ADAM, 2002). Neste sentido, novas substâncias obtidas de espécies vegetais que apresentem atividade antimicrobiana podem vir a ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso para a população.

O teste de modulação tem como objetivo analisar a influência da concentração do OEC sobre a ação de concentrações variadas dos antibióticos frente às cepas bacterianas multirresistentes. Para isso, uma concentração de 16 µg/mL (CIM/8) foi utilizada nos ensaios de modulação da resistência bacteriana.

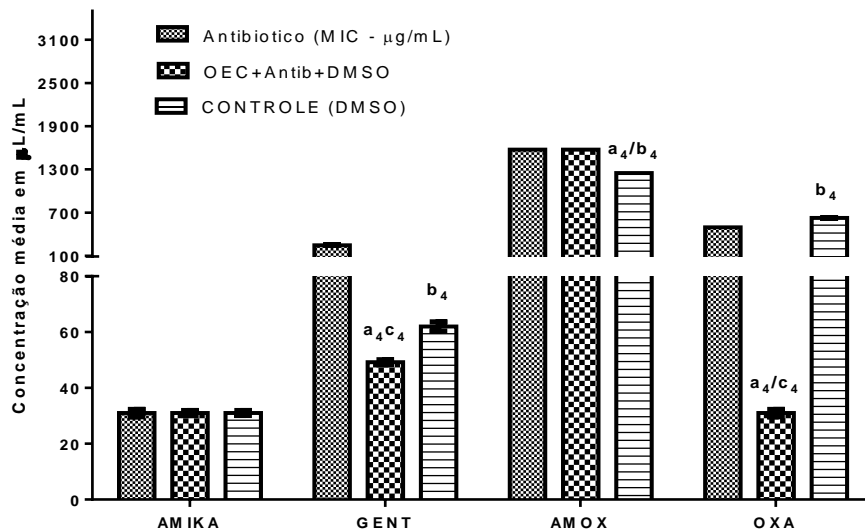
Os aminoglicosídeos foram escolhidos para serem utilizados no teste de modulação porque podem provocar nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular como efeitos tóxicos (VALLEJO et al., 2001; OLIVEIRA, 2006). As penicilinas foram também utilizadas no teste uma vez que se torna crescente a resistência aos  $\beta$ - lactâmicos.



O OEC demonstrou efeito modulador significativo em associação com a gentamicina e oxacilina frente à *Escherichia coli* e frente à *Staphylococcus aureus* (Figura 5A e 5C). Esta última associação foi potencializada pelo DMSO, uma vez que o DMSO na ausência do OEC também apresentou sinergismo com o antibiótico. O DMSO foi responsável por modular a atividade da amoxicilina e modular o efeito do antibiótico oxacilina frente à *Pseudomonas aeruginosa*. O DMSO também antagonizou o efeito da amoxicilina frente à *Staphylococcus aureus*.

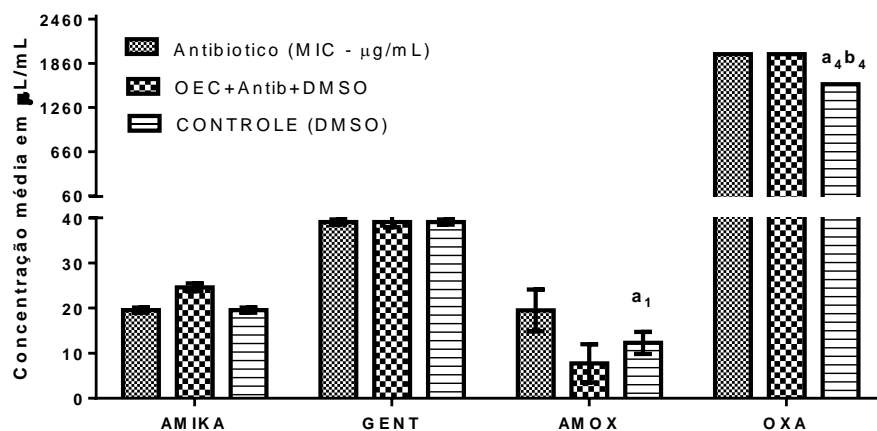
**Figura 5:** Atividade moduladora de antibióticos do Óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* (OEC) em associação com aminoglicosídeos e penicilinas frente a *Escherichia coli* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B) e *Staphylococcus aureus* (C).

A)



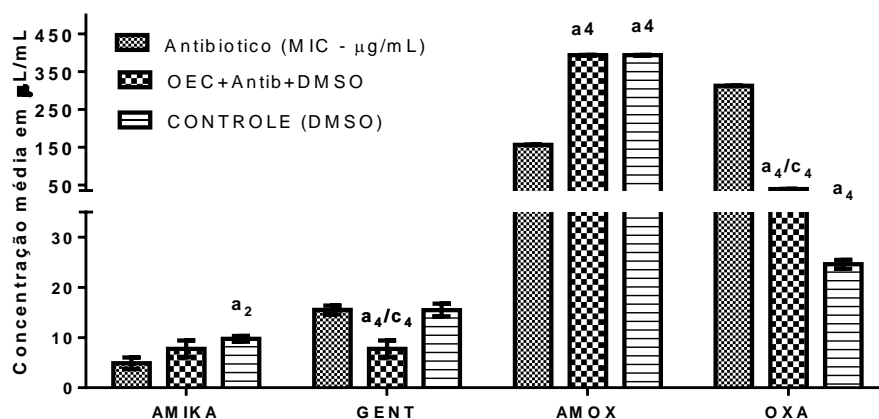
ANOVA : <sup>a4</sup>p < 0,0001 controle vs MIC; <sup>b4</sup>p < 0,0001 controle vs EOC

B)



ANOVA <sup>a1</sup>P < 0.05 vs MIC; <sup>b4</sup>p < 0,0001 vs EOC; <sup>a4</sup>p < 0,0001 vs MIC

C)



ANOVA  $a^2P < 0.05$  vs MIC;  $a^4 p < 0,0001$  vs MIC  $c^4 p < 0,0001$  vs controle (DMSO).

Muitas plantas medicinais são utilizadas como fonte de drogas antimicrobianas para o tratamento de doenças infecciosas, inclusive contra bactérias multirresistentes aos antibióticos (BUTLER et al., 2006). Os produtos de origem vegetal ou animal podem alterar o efeito de antibióticos seja reduzindo ou aumentando suas atividades podendo assim serem denominados de modificadores da atividade antibiótica (COUTINHO et al., 2008, RODRIGUES et al., 2009). Os componentes voláteis do óleo essencial de *Lantana camara* aumentou a atividade do antibiótico amicacina em 65% contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (SOUSA et al., 2012). O óleo essencial de *Lippia alba* modificou a atividade do antibiótico eritromicina frente a *Staphylococcus aureus* (VERAS et al., 2011). O óleo essencial de *Lippia sidoides* conseguiu modificar a atividade da Penicilina G e Ceftriaxona frente a *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* (VERAS et al., 2013). O sinergismo dos produtos naturais com os agentes antimicrobianos pode ser utilizado nos tratamentos terapêuticos (MATIAS et al., 2010, SOUSA et al., 2011).

O uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos oferece baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana, pois eles representam uma mistura de substâncias e a atividade pode estar relacionada a vários compostos, o que dificulta a adaptação dos microrganismos (DAFERERA et al., 2003). Eles podem inibir os microrganismos por vários modos de ação, e em parte, este efeito pode ser devido a hidrofobicidade, o que altera a permeabilidade da membrana celular e torna mais permeável à absorção dos antibióticos, causando perda do conteúdo vital da célula (BURT et al., 2004; JUVEN et al., 1994).

Os terpenos presentes nos óleos atuam sobre as estruturas da membrana celular causando danos (SIKKEMA et al., 2004) e são classificados como modificadores da atividade antibiótica (NICOLSON et al., 1999). Estudos relatam a atividade antimicrobiana 1,8-cineol, um dos compostos majoritários do OEC (OKE et al., 2009; ALT-OVAZZOU et al., 2011). Em alguns estudos, óleos que apresentaram o espatulenol como composto majoritário demonstraram atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (COBOS et al., 2001; TZAKOU et al., 2003).

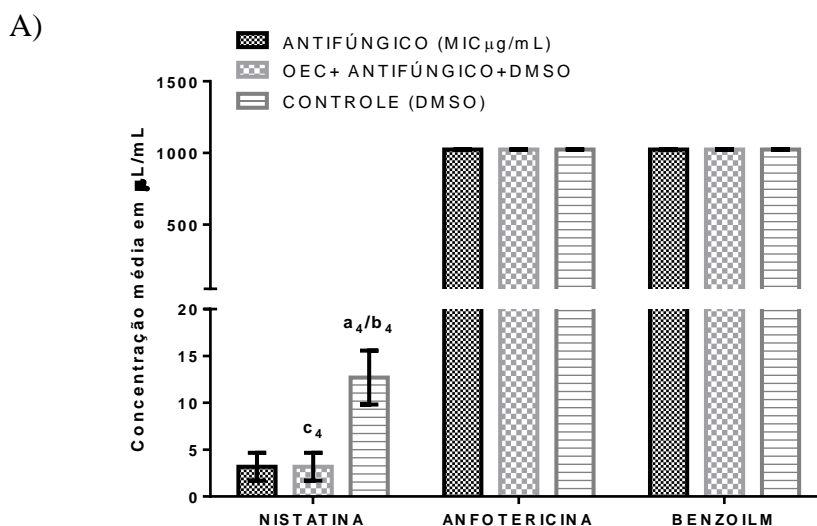
No nosso estudo tanto bactéria Gram-positiva quanto a Gram-negativa foram susceptíveis a interação do OEC com drogas antimicrobianas. Geralmente, as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a modulação do que as Gram negativas. Uma explicação para este fato é que as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular que não impede a entrada de moléculas tóxicas e as bactérias Gram-negativas apresentam um sistema de barreira constituída pela parede celular, conferindo permeabilidade aos agentes antimicrobianos e aumentando a resistência (LAMBERT, 2002). As bactérias gram-negativas são rodeados por uma membrana adicional, que proporciona uma superfície hidrofílica e funciona como uma barreira de permeabilidade para os diversos agentes hidrofóbicos externos e essa barreira é devida à presença de lipopolissacarídeo (HELANDER et al., 1997; NIKAIDO, 2003).

São comuns na literatura espécies do Gênero *Croton* que apresentam atividade antimicrobiana, como por exemplo: o óleo essencial das folhas de *Croton campestris* potencializou os efeitos de aminoglicosídeos, exceto gentamicina (ALMEIDA et al., 2013). *Croton zehntneri* apresentou atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* utilizando o método de difusão em discos (COSTA et al., 2008). *Croton rhamnifolioides* também apresentou atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* utilizando o método de difusão em discos (COSTA et al., 2013). Compostos obtidos de *Croton urucurana*, catequina e ácido acetil aleuritpólico, apresentaram efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. O linalol, composto presente no óleo essencial de *Croton cajucara*, inibe o crescimento de colônias de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* (SALATINO et al., 2007). Esses estudos foram realizados através da técnica de difusão. Entretanto, vale a pena ressaltar que a técnica de microdiluição, técnica utilizada no nosso estudo, representa a técnica mais aceita para estes bioensaios (HADACEK; GREGER, 2000).

No presente estudo o óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* demonstrou efeito modulador significativo em associação com a gentamicina e oxacilina frente à *Escherichia coli* e frente à *Staphylococcus aureus*.

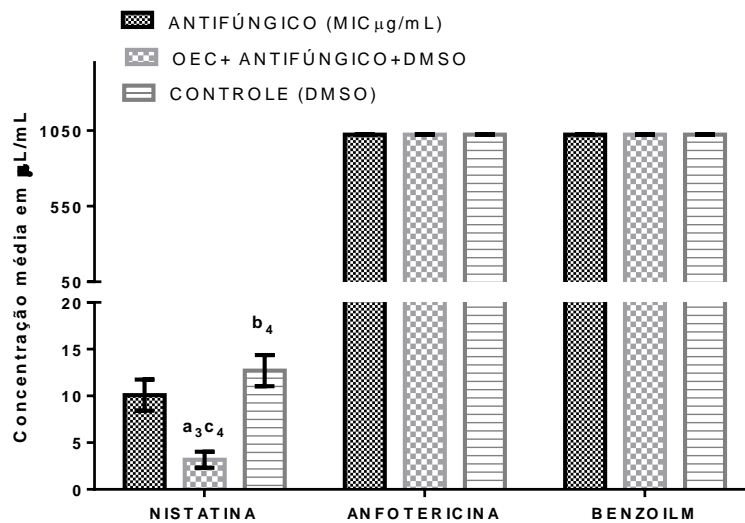
Na modulação de Antifúngicos, a concentração subinibitória de 8 µg/mL (determinado pela CIM/8), foi utilizada. Os resultados na figura 6 demonstraram que o OEC não potencializou a ação dos antifúngicos anfotericina e benzoilmetronidazol frente às linhagens de fungos: *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. O OEC potencializou somente o efeito do antifúngico nistatina frente à linhagem de *Candida tropicalis*. A redução da CIM do antifúngico na presença do produto natural indica que o mesmo é capaz de atuar sinergicamente favorecendo o efeito antifúngico. Pode-se observar que o DMSO, agente emulsificante, foi responsável por promover antagonismo em relação ao OEC quando utilizou-se nistatina frente à linhagem de *Candida albicans*.

**Figura 6:** Atividade moduladora de antibióticos do Óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* (OEC) em associação com nistatina, anfotericina e benzoilmetronidazol frente à *Candida tropicalis* (A), e *Candida albicans* (B)



ANOVA: <sup>a3</sup>p < 0,001 OEC vs MIC; <sup>b4</sup>P < 0.0001 controle vs OEC; <sup>c4</sup>P < 0.0001 OEC vs controle

B)



ANOVA: <sup>a4</sup>P < 0,0001 controle vs MIC; <sup>b4</sup>p < 0,0001 controle vs EOC; <sup>c4</sup>P < 0,0001 OEC vs controle.

Muitos antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* produzem inúmeros efeitos colaterais e muitas vezes podem induzir a resistência fúngica, principalmente em pacientes imunocomprometidos (FICA,2004). Este sinergismo observado pode ser importante para aumentar o efeito antifúngico e diminuir a resistência.

Ao se introduzir um agente emulsificante ele pode possuir atividade antimicrobiana ou está sujeito a interações com a substância em teste, (HAMMER et al., 1999; JANSEN et al., 1987), podendo agir de modo sinérgico ou antagônico aos componentes do óleo (TAKARADA et al., 2004; COX et al., 2000).

Várias espécies do gênero *Croton* tem demonstrado ação antifúngica, como por exemplo, *Croton zehntneri*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophyloides* (FONTENNELE et al., 2007). Em alguns estudos, óleos que apresentaram o espatulenol como composto majoritário demonstraram atividade antifúngica contra *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton menthagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* (FLACH et al., 2002). Provavelmente, a atividade antifúngica do óleo essencial é devido aos componentes majoritários. Colaborando com esta hipótese, estudos anteriores tem demonstrado que o espatulenol e o óxido de cariofileno são compostos que apresentam atividade contra fungos filamentosos (FARAG et al., 2004; WENQIANG et al., 2006). A atividade antifúngica apresentada pelo OEC pode ser atribuída em parte ao seu componente majoritário, o espatulenol.

#### 4.4 Avaliação da Toxicidade aguda e Dose Letal Média (DL<sub>50</sub>)

O valor da dose letal média é estabelecido com a finalidade de evitar o uso inadequado de superdoses que possam levar a mortalidade ou morbidade. Considerando a inexistência de estudos anteriores com administração oral do OEC, determinou-se a partir das concentrações testadas (2000, 1500, 500, 250, 150, 50, 15 e 5 mg/Kg) que o óleo não foi capaz de provocar mortalidade dos animais em doses inferiores a 2000 mg/kg por via oral, nesse sentido, pode-se concluir que dose letal média (DL<sub>50</sub>) deva ser maior que 2000 mg/Kg (DL<sub>50</sub> > 2000 mg/Kg), representando baixa toxicidade. O resultado obtido com o OEC pode ser comparado ao óleo essencial de *Croton cajucara* que também apresentou baixa toxicidade em camundongos (HIRUMA-LIMA et al., 1999).

#### 4.5 Atividade Antiulcerogênica

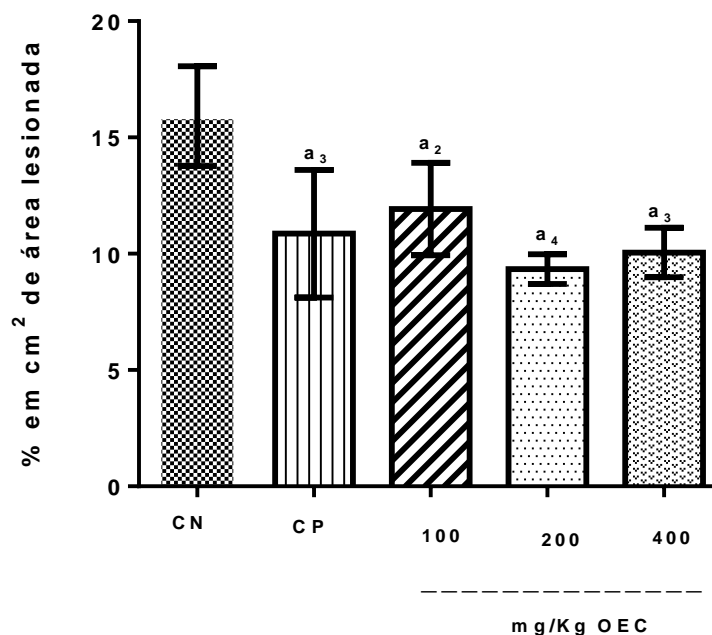
##### 4.5.1 Lesão Gástrica induzida por etanol

A administração intragástrica de etanol absoluto representa um modelo clássico de indução de lesões gástricas em animais, sendo utilizado para o estudo fisiopatológico e prospecção de novas moléculas (KWIECIEN et al., 2002; KONTUREK et al., 1998; KONTUREK et al., 2001). A origem das lesões gástricas induzidas pelo etanol é de origem multifatorial, mas tem como ponto de partida a capacidade do etanol penetrar na mucosa, causar a liberação de substâncias vasoativas e provocar lesão endotelial (SZABO et al., 1985; SZABO et al 1987). O etanol, quando administrado, provoca uma diminuição da defesa fisiológica da mucosa, uma vez que diminui o fluxo sanguíneo local, a produção de muco, a secreção de bicarbonato e os níveis de glutathione e prostaglandina endógena. O etanol também ativa os mecanismos que são considerados fatores agressores que podem provocar ulceração e aumentam a liberação de histamina, influxo de cálcio, produção de leucotrienos e geração de radicais livres (POSSENTI et al., 2012).

Neste modelo, os estômagos dos animais que receberam solução salina apresentaram a maior porcentagem de área lesionada devido a ação do etanol administrado, com média de  $15,92 \pm 0,87\%$ . O grupo que recebeu omeprazol (30mg/Kg, v.o.), medicamento utilizado como referência, apresentou média de  $10,86 \pm 1,12\%$ . Os grupos que receberam 100, 200 e

400 mg/Kg do OEC apresentaram as médias  $11,96 \pm 0,81\%$ ,  $9,34 \pm 0,26\%$ ,  $10,05 \pm 0,43\%$ , respectivamente (Figura 7).

**Figura 7:** Efeito da administração oral do OEC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos com cada grupo contendo a média de seis animais. Os mesmos foram tratados com salina (1% de Tween 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.-controle negativo), Omeprazol (30 mg/ Kg v.o.) ou OEC (100, 200 e 400 mg/Kg v.o.). Após 1h dos tratamentos, os animais receberam etanol absoluto (0,2 mL/ v.o.). Decorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados e submetidos a análise no programa *Imaje J*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), avaliados pela análise de variância (ANOVA), comparado ao *Sidak*, sendo os cálculos realizados a partir do Software estatístico *GraphPad Prism* e de acordo com os valores obtidos nos testes.  $a_2 p < 0,01$  versus Controle negativo.  $a_3 p < 0,001$  versus Controle negativo e  $a_4 p < 0,0001$  versus controle negativo.



O etanol quando administrado produz uma resposta inflamatória e promove a destruição da camada protetora da mucosa causando uma necrose celular, resultante de vários eventos que incluem a liberação de radicais livres, enzimas e substâncias vasoativas. Isto provoca vasoconstrição, edema e hemorragia, comprometendo assim o fluxo sanguíneo da mucosa (CASTRO et al., 2010; ROCHA et al., 2011). As lesões ocorrem predominantemente na parte glandular do estômago com formação de Leucotrienos C4 (LTC<sub>4</sub>), ERO's, produtos secretados dos mastócitos, diminuição do muco e depleção dos grupamentos sulfidrílicos, resultando em dano à mucosa gástrica (RAO et al., 2004).

Os resultados obtidos neste modelo mostram que o OEC protegeu a mucosa, sugerindo haver atividade gastroprotetora para o OEC. Este resultado reforça a utilização na medicina popular deste gênero como *Croton malambo* (SUAREZ et al., 2003), *Croton nepetaefolius* (LAHLOU et al., 2000), *Croton cajucara* (CAMPOS et al., 2002), *Croton*

*Zehntneri* (COELHO DE SOUZA et al., 1997) e *Croton palanostigma* (MILLER et al., 2000) para o tratamento das desordens do TGI.

A atividade gastroprotetora das plantas pode ser atribuída a presença de substâncias como cumarinas, terpenos, alcaloides, flavonoides, taninos e ácidos fenólicos (MOTA et al., 2009). As plantas do gênero *Croton* são ricas em terpenóides e alcaloides e a presença desses compostos pode explicar a ação gastroprotetora do OEC. Os terpenos compreendem o maior grupo de produtos vegetais, apresentam grande variedade estrutural (DEGENHARDT et al., 2009) e possuem, entre as propriedades medicinais, a atividade gastroprotetora (PERTINO et al., 2007).

Resultado semelhante ao nosso foi encontrado em estudos anteriores com *Croton Zehntneri* e *Croton cajucara* Coelho-de-Souza et al., 2011, relatam o efeito gastroprotetor do óleo essencial de *Croton Zehntneri* frente aos modelos de lesão gástrica induzidos por etanol e indometacina. *Croton cajucara*, popularmente conhecida como sacaca, é utilizada na Amazônia para desordens do TGI e seu óleo essencial possui atividade gastroprotetora comprovada cientificamente frente aos modelos de lesão gástrica induzidos por etanol e indometacina (HIRUMA-LIMA, 1999). A presença de terpenos em *Croton rhamnifolioides* pode explicar a ação gastroprotetora apresentada.

Muitos dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas da espécie em estudo também estão presentes no óleo essencial das folhas da *Hyptis martiusii*. Podemos encontrar nas duas espécies 1,8 cineol, trans-cariofileno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno-D, espatulenol, óxido de cariofileno, globulol e  $\delta$ -cadineno (CALDAS et al., 2011). Destes compostos, o 1,8-cineol se apresenta como um dos compostos majoritários tanto em *Hyptis martiusii* quanto na espécie em estudo. Além disso, estes dois produtos naturais tem em comum a atividade gastroprotetora. Em estudo realizado por Caldas et al., 2011, o óleo das folhas de *Hyptis martiusii* apresentou atividade gastroprotetora frente aos modelos clássicos de indução de úlceras gástricas (etanol, etanol acidificado e indometacina). A presença destes compostos pode explicar em parte a atividade protetora da mucosa gástrica.

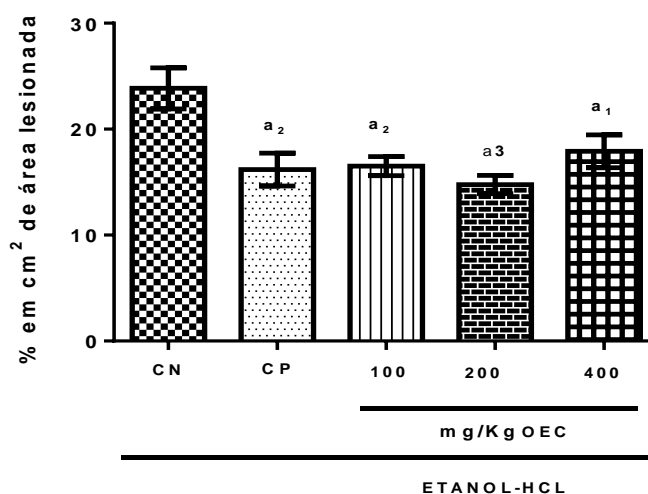
#### 4.5.2 Lesão gástrica induzida por etanol acidificado

Neste modelo, os estômagos dos animais do grupo controle negativo (salina) apresentaram a maior porcentagem de área lesionada devido a ação do etanol administrado, com média de  $23,85 \pm 1,94\%$ . O grupo que recebeu omeprazol (30 mg/Kg), medicamento utilizado como referência, apresentou média de  $16,18 \pm 1,54\%$ . Os grupos que receberam 100,



200 e 400 mg/Kg do OEC apresentaram as médias  $16,51 \pm 0,89\%$ ,  $14,76 \pm 0,86\%$ ,  $17,91 \pm 1,54\%$  respectivamente. Todos os grupos apresentaram significância em relação ao controle salina, onde o grupo omeprazol 30 mg/kg e a dose de 100 do OEC com significância de  $p < 0,01$ , a dose de 200 mg/Kg com significância de  $p < 0,001$  e a dose de 400 mg/kg com significância de  $p < 0,05$ . (Figura 8)

**Figura 8: Efeito da administração oral do OEC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos com cada grupo contendo a média de seis animais.** Os mesmos foram tratados com salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.), Omeprazol (30 mg/ Kg v.o.) ou OEC (100, 200 e 400mg/Kg v.o.). Após 1h dos tratamentos, os animais receberam etanol acidificado (0,2 mL/ v.o.). Decorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados e submetidos a análise no programa *Imaje J*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), avaliados pela análise de variância (ANOVA) comparado com *Dunnet*, sendo os cálculos realizados a partir do Software estatístico *GraphPad Prism* e de acordo com os valores obtidos nos testes.  $a_1 p < 0,05$  versus controle negativo.  $a_2 p < 0,01$  versus controle negativo. e  $a_3 p < 0,001$  versus controle negativo.



Os resultados da atividade antiulcerogênica do OEC no modelo de Lesão gástrica induzida pela administração oral de etanol acidificado demonstrou significativo efeito antiulcerogênico em todas as doses testadas. O etanol induz a liberação de histamina a partir de mastócitos (OATES; HAKKINEN, 1988). É bem conhecido que as lesões gástricas induzidas pelo etanol não são inibidas por agentes anti-secretores, mas são inibidas por agentes que aumentam fatores defensivos da mucosa, tais como o misoprostol (ROBERT et al., 1979). Estes resultados indicam que o OEC promove atividade protetora eficiente atividade provavelmente por aumentar os elementos de proteção da mucosa gástrica, tais como muco e bicarbonato, uma vez que inibe a formação de lesões ulcerativas nos modelos até agora apresentados. Esta hipótese é corroborada com a ação do OEC obtida no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina, uma vez que, a lesão provocada por este modelo está relacionada à diminuição de compostos sulfidrílicos e o aumento de peróxidos e

compostos como cisteína, glutathiona reduzida (GSH) e cisteamina promovem citoproteção contra este tipo de indução (MIZUI, DOTEUCHI, 1987).

O composto  $\alpha$ -humuleno, um dos compostos encontrado no OEC apresenta atividade antioxidante, o que pode explicar em parte, a gastroproteção promovida pelo OEC. O 1,8-cineol, também conhecido como cineol ou eucaliptol, é um dos compostos majoritários da espécie em estudo (Tabela 3). Na literatura constam diferentes aplicações terapêuticas para este composto, entre elas, atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (SANTOS, RAO, 1998), e antitumoral (MOTEKI, 2002). SANTOS, RAO, 2001, relata a atividade gastroprotetora deste composto no modelo de lesão gástrica induzida por etanol. 1,8-cineol se apresenta como um dos compostos majoritários tanto em *Hyptis martiusii* quanto na espécie em estudo. Estes dois produtos naturais tem em comum a atividade gastroprotetora. O óleo das folhas de *Hyptis martiusii* apresentou atividade gastroprotetora frente aos modelos clássicos de indução de úlceras gástricas (CALDAS et al., 2011). Em outro estudo, o linalol, um dos constituintes do OEC, também apresentou atividade gastroprotetora frente ao modelo de lesão gástrica induzida por etanol (BAROCELLI et al., 2004). É possível que os compostos minoritários modulem a atividade dos componentes majoritários, ocorrendo desta maneira, um sinergismo entre eles. Portanto, neste sentido, para fins biológicos, estudar o óleo essencial do que alguns constituintes separadamente fornece resultados mais significativos (MARTINEZ et al., 2009; MERCIER, PROST, 2009). Face do que foi apresentado, pode-se inferir que a presença destes constituintes na composição do OEC pode ser responsável pela atividade gastroprotetora observada.

#### 4.5.3 Lesão gástrica induzida por Indometacina

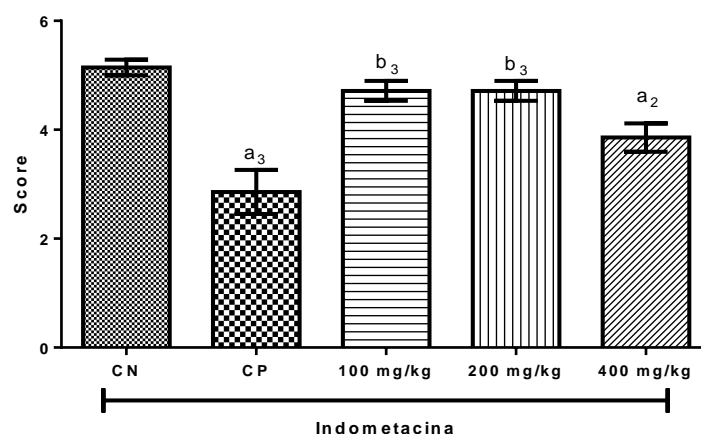
Os Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo e são comumente utilizados para o alívio da dor e processo inflamatórios. Laine, (2002) relata relação entre o uso de AINES e o aparecimento de úlceras gástricas e duodenais Os AINES são divididos em várias classes químicas, sendo a indometacina um derivado indólico. Trata-se de um potente inibidor não-seletivo da ciclooxigenase (COX), enzima que catalisa a formação de prostaglandinas, que também pode inibir a fosfolipase A e C, reduzir a migração de neutrófilos e diminuir a proliferação de células T e B (KATZUNG, 2007). O contato da indometacina com a mucosa é capaz de agredi-la devido a sua ação irritante local (GONÇALEZ et al., 2001).

Lesões induzidas experimentalmente por indometacina são consideradas ferramentas de valor para o estudo da patogênese da ulceração aguda da mucosa gástrica e como teste de novas substâncias com potencial atividade gastroprotetora (SZABO *et al.*, 1985, ALAM *et al.*, 2009).

As úlceras induzidas com a utilização de AINES ocorrem por inibição das enzimas cicloxigenases que são responsáveis pela síntese de prostaglandinas. As prostaglandinas protegem a mucosa por inibir a secreção gástrica, aumentar a quantidade de muco, e por ser uma substância vasodilatadora que garante o aporte nutritivo necessário para o bom funcionamento celular (WALLACE, MCKNIGHT, 2000, LEWIS, HANSON, 1991). Os AINES podem provocar danos no endotélio vascular, redução do fluxo sanguíneo, formação de micros-trombos e ativação de neutrófilos (GUTH, 1992).

Neste modelo, os estômagos dos animais são avaliados por pontuação determinada pelo método de *score*, realizando uma quantificação das lesões gástricas que geraram um valor de acordo com a tabela 2 (ZINKIEVICK *et al.*, 2010). Neste sentido, os animais que receberam solução salina, apresentaram *score* com média de  $5,14 \pm 0,14$  e, conseqüentemente, maior área lesionada. As lesões nesse modelo podem está relacionada a ação da indometacina sobre a produção do muco-bicarbonato. O grupo que recebeu omeprazol (30 mg/Kg), medicamento utilizado como referência, apresentou um *score* médio de  $2,85 \pm 0,40$ . Os grupos que receberam 100, 200 e 400 mg/Kg do OEC apresentaram *score* médio de  $4,71 \pm 0,18$ ,  $4,71 \pm 0,18$  e  $3,85 \pm 0,26$  respectivamente. Somente os grupos omeprazol 30 mg/Kg e OEC 400mg/Kg apresentaram significância em relação ao controle salina, onde o grupo omeprazol 30 mg/Kg com significância de  $p < 0,001$ , a dose de 400 mg/Kg com significância de  $p < 0,01$ . A dose de 400 mg/kg apresentou a dose mais eficiente em relação a redução da área lesionada (Figura 9).

**Figura 9:** Efeito da administração oral do OEC sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos com cada grupo contendo a média de seis animais. Os mesmos foram tratados com salina (1% de Tween 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.), Omeprazol (30 mg/ Kg v.o.) ou OEC (100, 200 e 400 mg/Kg v.o.). Após 1h dos tratamentos, os animais receberam indometacina (10mg/kg v.o.). Decorridos 6 horas da administração da indometacina, os animais foram sacrificados e submetidos a análise no programa *Imaje J*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), avaliados pela análise de variância (ANOVA) comparado com *Tukey*, sendo os cálculos realizados a partir do Software estatístico *GraphPad Prism* e de acordo com os valores obtidos nos testes.  $a_3 p < 0,001$  versus controle negativo.  $a_2 p < 0,01$  versus controle negativo.  $b_3 p < 0,001$  versus controle positivo.



Neste modelo de lesão gástrica induzida por indometacina, o OEC apresentou um efeito gastroprotetor na dose de 400 mg/Kg, v.o. Nesta dose, a indometacina não foi capaz de reverter a gastroproteção promovida pelo OEC. Este resultado pode ser comparado ao resultado obtido com a utilização do óleo essencial de *Croton cajucara*, onde conseguiu reduzir as lesões na mucosa gástrica promovida pela indometacina (HIRUMA-LIMA et al., 1999). O resultado obtido com o óleo essencial de *Hyptis martiusi* também pode ser comparado ao resultado obtido com o OEC. O óleo essencial de *Hyptis martiusi* que semelhante ao OEC apresentou 1,8 cineol como um dos compostos majoritários, apresentou atividade gastroprotetora quando as lesões gástricas foram induzidas por etanol, etanol acidificado e indometacina (CALDAS et al., 2011).

Vários óleos essenciais de plantas aromáticas são utilizados devido as suas atividades gastroprotetoras: *Bacharis dracunculifolia* (MASSIGNANI et al., 2009; MENEZES et al., 2005); *Casearia sylvestris* (ESTEVEZ et al., 2005; LORENZI et al., 2002); *Croton cajucara* (ROZZA et al., 2011), *Hyptis martiusi* Benth (AGRA et al., 2008) e *Hyptis spicigera* (TAKAYAMA et al., 2011). Em todas essas espécies, o 1,8 cineol ou o espatulenol, apresentam-se como compostos majoritários. Em outro estudo, para este composto é relatada a propriedade de proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por indometacina (SANTOS & RAO, 2001). Santos et al., 2004 relata os efeitos anti-inflamatório, analgésico, hepatoprotetor e gastroprotetor do 1,8 cineol. A presença destas substâncias pode explicar em parte o efeito gastroprotetor promovido por estes produtos naturais.

Outro estudo realizado mostrou que o óleo essencial de *Croton zehntneri* é composto por várias substâncias entre elas, 1,8- cineol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -elemeno e óxido de cariofileno e que este produto natural apresenta atividade gastroprotetora frente a modelos clássicos de indução de lesão gástrica (MORAIS et al., 2006). Essas mesmas substâncias foram encontradas no

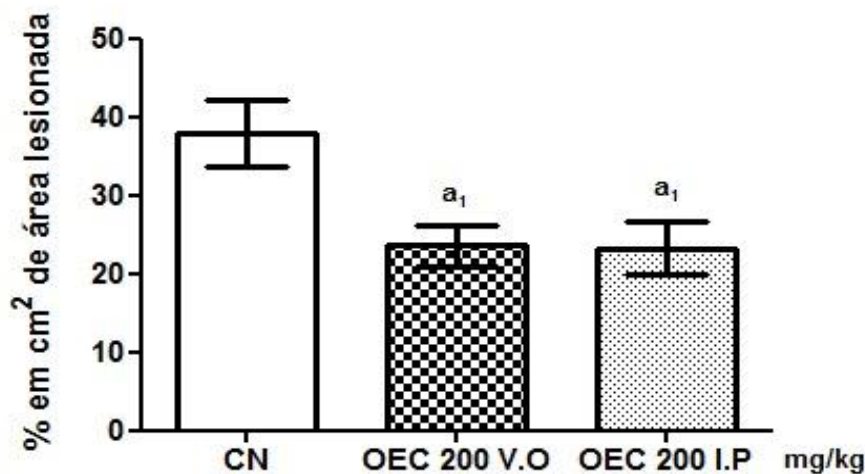
OEC. Pode-se sugerir que a presença de tais compostos pode influenciar a atividade protetora da mucosa gástrica apresentadas por estes óleos essenciais. Nesse sentido para fins biológicos é importante o estudo do óleo como um todo em vez de estudar alguns de seus componentes, pois o sinergismo entre os componentes é significativo (BAKKALI et al., 2008).

#### 4.6 Teste de barreira física

O teste de barreira física permite descartar a hipótese que o OEC estivesse atuando apenas como uma proteção física, exercendo, portanto, uma ação mecânica formando uma película do OEC sobre a mucosa, a qual impediria que o etanol removesse a camada de muco.

Neste modelo, os estômagos dos animais que receberam solução salina, apresentaram a maior porcentagem de área lesionada devido à ação do etanol administrado, com média de  $37,89 \pm 4,30\%$ . O grupo que recebeu OEC (200 mg/Kg, v.o.) apresentou média de  $23,60 \pm 2,66\%$  com significância de  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina. Esta mesma significância foi observada com o grupo que recebeu OEC (200 mg/Kg, i.p.). O grupo que recebeu o OEC (200 mg/Kg v.i.p.) apresentou uma média de  $23,29 \pm 3,38\%$ . (Figura 10)

**Figura 10: Efeito do teste de barreira física.** Os camundongos foram tratados com solução salina (1% de Tween 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.) e OEC (200 mg/Kg v.o.) ou OEC (200 mg/Kg i.p.). Após 1h dos tratamentos, os animais do grupo via oral receberam etanol acidificado (0,2mL/ v.o.) e o grupo que recebeu o OEC por via intraperitoneal receberam o etanol acidificado(0,2mL/ v.o.) depois de 30 minutos. Decorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados e submetidos a análise no programa *Image J*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), avaliados pela análise de variância (ANOVA), sendo os cálculos realizados a partir do Software estatístico *GraphPad Prism* e de acordo com os valores obtidos nos testes.  $a_1 p < 0,05$  versus controle negativo (v.o. / i.p.).



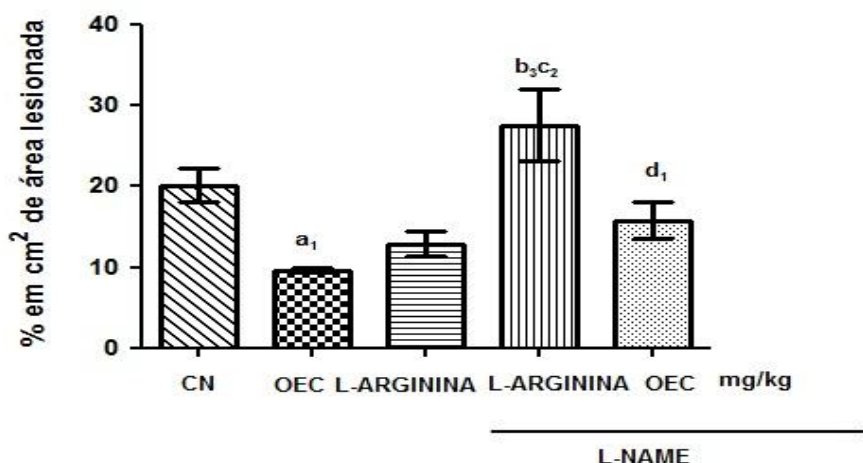
Os grupos que receberam o OEC, tanto por via intraperitoneal quanto por via oral, demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo salina, permitindo concluir que a contribuição na proteção gástrica promovida pela formação de uma barreira física não é considerável. Fazendo a comparação entre os grupos que receberam o OEC, não houve diferença significativa entre os dois grupos analisados, reforçando a ideia que o OEC apresenta atividade gastroprotetora independente da via de administração ser oral ou intraperitoneal. Resultado semelhante foi observado com *Croton cajucara*. Estudo realizado mostrou que o óleo essencial de *Croton cajucara* apresenta atividade protetora quando administrado seja pela via oral, seja pela via intraperitoneal (HIRUMA-LIMA et al., 1998).

#### 4.7 Elucidação do Mecanismo de Ação envolvido na Atividade Gastroprotetora

##### 4.7.1 Envolvimento do Óxido Nítrico

Neste mecanismo, os animais tratados apenas com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% v.o.) mostraram após a administração do etanol absoluto uma área de lesão da mucosa gástrica de  $20,16 \pm 2,08\%$ . O grupo tratado com o OEC (200 mg/Kg v.o.) reduziu de forma significativa o percentual de lesão gástrica ( $9,62 \pm 0,27\%$ ) em comparação com o grupo tratado apenas com salina ( $20,16 \pm 2,08\%$ ), correspondendo um percentual de inibição de 52,29%. A L-arginina (600 mg/kg, i.p.) também reduziu a porcentagem de área lesada ( $12,87 \pm 1,53\%$ ), porém esta redução não foi significativa em relação ao grupo salina. A administração de L-NAME reverteu o efeito protetor da L-arginina ( $27,56 \pm 4,43\%$ ). O L-NAME quando administrado antes do OEC (200mg/Kg v.o.) teve seu efeito agressor reduzido de forma significativa ( $15,81 \pm 2,31\%$ ), com  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado com L-NAME e L-arginina. O OEC (200mg/Kg v.o.) quando associado ao L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) teve seu efeito protetor reduzido de forma significativa, apresentando percentual de área ulcerada de  $15,81 \pm 2,31\%$ . (Figura 11)

**Figura 11:** Efeito do pré-tratamento com L-NAME na gastroproteção promovida pelo OEC. Os animais foram tratados previamente com salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% v.o.), L-arginina (600 mg/kg, v.o.) ou OEC (200 mg/kg, v.o.) 1 h antes da administração do etanol (0,2 mL/animal). Nas combinações, L-NAME (10 mg/kg, i.p.) foi administrado 1h após os animais receberem L-arginina (L-arginina + L-NAME) ou OEC 200 mg/Kg (grupo OEC 200 + L-NAME). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo).  $a_1p < 0,05$  versus controle negativo;  $b_3p < 0,001$  versus OEC 200mg/Kg,  $c_2p < 0,01$  versus L-arginina;  $d_1p < 0,05$  versus L-arginina + L-NAME (ANOVA e Teste de Tukey).



O Óxido Nítrico (NO) é produzido pela enzima óxido nítrico sintetase e é um mediador que desempenha importante função para a defesa da mucosa gástrica. Após a sua liberação, rapidamente se transforma em nitrito e nitrato que são seus metabólitos estáveis (VICENT et al., 2010). Este mediador é importante na regulação do fluxo sanguíneo (WALLACE et al., 2006), regulação da secreção do muco aumentando a disponibilidade de bicarbonato oriundo da circulação (UNEYAMA et al., 2009; MORAIS et al., 2010; BROWN et al., 2003), aumento do fluxo sanguíneo (WALLACE et al., 2000) e inibição da infiltração de neutrófilos (WALLACE et al., 1997).

Para investigar a participação do óxido nítrico no efeito gastroprotetor foi utilizado L-arginina, substrato para a síntese de do óxido nítrico, e L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metilester), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) (OLINDA et al., 2008). Os bloqueadores da eNOS agravam macro e microscopicamente as lesões associadas ao etanol e reduzem o fluxo sanguíneo da mucosa, alterando a hemodinâmica gástrica. Esses efeitos são reduzidos pela L-arginina que funciona como substrato para a gênese do óxido nítrico (MASUDA et al., 1995). A utilização de inibidores da síntese de NO, como o L-NAME, tem sido utilizado para avaliar o efeito da via da síntese do NO sobre o efeito gastroprotetor de várias drogas (LEITE et al., 2008; OLINDA et al., 2008; MORAIS et al., 2010, CERQUEIRA et al., 2012).

De acordo com estes dados, fica evidente que o efeito gastroprotetor do OEC (200 mg/Kg) tem o envolvimento desta via, uma vez que o L-NAME, um inibidor da síntese do NO, reverte de forma significativa a proteção da mucosa produzida pelo OEC. O envolvimento do óxido nítrico também foi observado com o óleo essencial de *Croton nepetaefolius* Respostas vasodilatadoras promovidas por este óleo e um dos seus componentes,  $\alpha$ -terpineol foram atenuadas na presença do L-NAME (MAGALHÃES et al.,

2008) *Lippia gracilis*, que apresenta assim como *Croton rhamnifolioides*, o orto cimeno na sua composição, também teve a participação da via do óxido nítrico no seu efeito antinociceptivo (GUILHON et al., 2011). O efeito gastroprotetor do OEC pode ser devido a ações isoladas dos compostos majoritários ou a um sinergismo entre os compostos.

#### 4.7.2 Envolvimento dos Canais de potássio ATP-dependentes

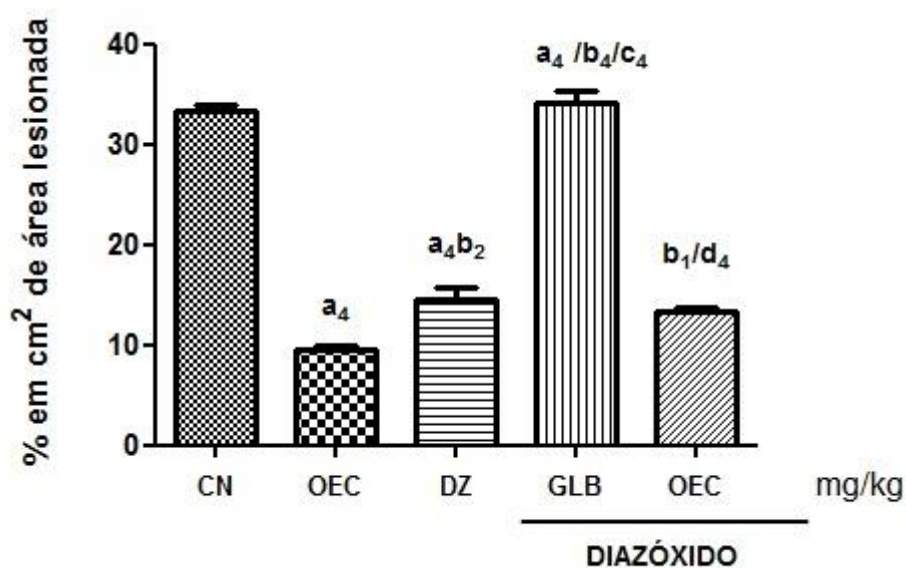
Os canais de potássio estão envolvidos em várias atividades fisiológicas do estômago e esta propriedade pode ser inibida por substâncias como indometacina, bloqueadores dos canais de potássio e glibenclamida (PESKAR et al., 2002).

A abertura dos canais de potássio nas células endoteliais ajuda a proteger a mucosa gástrica dos agentes ulcerogênicos. A abertura destes canais provoca um influxo de potássio. Isto altera o potencial de ação da membrana fazendo com que ocorra uma diminuição da entrada de cálcio através dos canais levando a vasodilatação (NILUS; DROOGMANS, 2001).

Neste mecanismo, os animais tratados apenas com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% v.o.) mostraram após a administração do etanol absoluto uma área de lesão da mucosa gástrica de  $33,42 \pm 0,57\%$ , demonstrando a capacidade do etanol absoluto em promover lesões gástricas. O grupo tratado com o OEC (200 mg/Kg v.o.) reduziu de forma significativa o percentual de lesão gástrica ( $9,63 \pm 0,28\%$ ) em comparação com o grupo tratado apenas com salina ( $33,42 \pm 0,57\%$ ). A participação dos canais de potássio ATP-dependentes foi evidenciada realizando um pré-tratamento com glibenclamida (5mg/Kg, v.o.) antes da administração do diazóxido (3mg/Kg, i.p.) ou OEC (200 mg/Kg, v.o.), que resultaram em valores de média de  $34,16 \pm 1,10\%$  e  $13,27 \pm 0,48\%$ . A glibenclamida conseguiu reverter o efeito gastroprotetor promovido pelo OEC, demonstrando o envolvimento dos canais de potássio como mecanismo de ação. (Figura 12)

**Figura 12:** Efeito do pré-tratamento da glibenclamida na gastroproteção promovida pelo OEC. Os animais foram tratados previamente com salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% v.o.), OEC (200 mg/kg, v.o.) ou diazóxido (3 mg/kg, i.p.) 1 h ou 30 min antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, glibenclamida (5mg/kg, v.o.) foi administrada 1h ou 30 min após o OEC (200 mg/kg, v.o.) e diazóxido (3 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo). a<sub>4</sub> p < 0,0001 versus controle negativo, b<sub>1</sub> p < versus OEC . b<sub>2</sub> p <0,01 versus OEC . b<sub>4</sub> p < 0,0001 versus OEC. c<sub>4</sub> p < 0,0001 versus diazóxido. d<sub>4</sub> p < 0,0001 versus glibenclamida + diazóxido. (ANOVA e *Teste deTukey*)





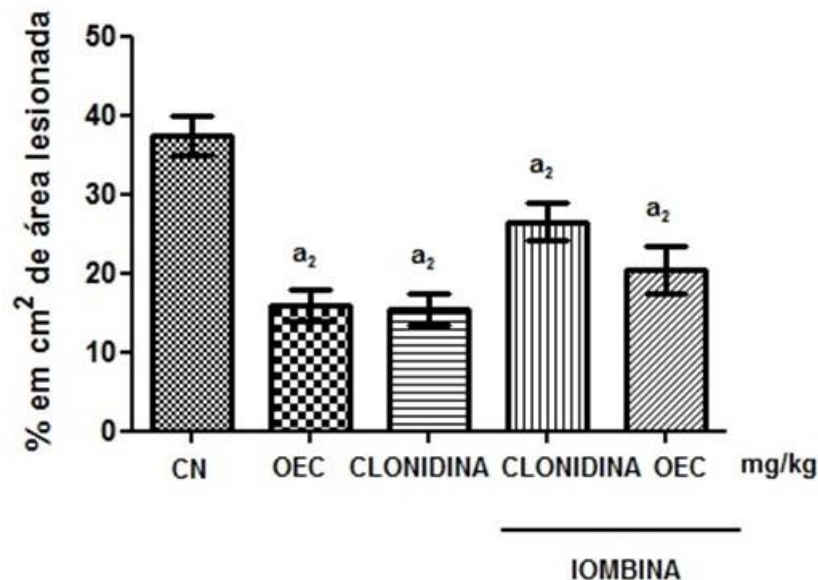
Várias pesquisas vêm mostrando o envolvimento dos canais de potássio com as atividades biológicas apresentadas por compostos isolados de produtos naturais. E nosso estudo corrobora com isto. Os canais de potássio podem ser ativados ou bloqueados por substâncias. Quando ativados, aumentam o influxo de íons potássio, ocorre fechamento dos canais de cálcio diminuindo a quantidade de íons cálcio que entra na célula e isto leva a vasodilatação (STENDEN; QUAYLEN, 1998). Guedes et al., 2008 mostra a participação dos canais na atividade gastroprotetora promovida pelo ácido centipédico, um diterpeno de *Egletes viscosa*. O isopulegol exerce atividade gastroprotetora e esta atividade é devido em parte a participação dos canais de potássio (SILVA et al., 2008). O linalol, um dos compostos presentes no OEC, exerce seus efeitos analgésicos interagindo com receptores e canais de potássio (DE SOUSA, 2011). O óleo essencial de *Croton sonderianus*, que semelhante ao OEC apresenta 1,8 cineol e espatulenol na sua composição, produz antinocicepção e esta atividade tem envolvimento dos canais de potássio (SANTOS et al., 2005). O óleo essencial de *Croton nepetaefolius* e seu constituinte majoritário, 1,8-cineol, bloqueiam a excitabilidade do nervo ciático de ratos por ação indireta com os canais de potássio (LIMA- ACCIOLY et al., 2006).

#### 4.7.3 Envolvimento dos receptores noradrenérgicos $\alpha_2$ .

Neste mecanismo, os animais tratados apenas com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% v.o.) mostraram após a administração do etanol absoluto uma área de lesão da mucosa gástrica de  $34,67 \pm 0,85\%$ . A administração prévia de OEC (200 mg/kg v.o.)

e Clonidina (0,05 mg/Kg v.o.) reduziram de forma significativa o percentual de lesão gástrica ( $22,38 \pm 2,24\%$ ) e ( $21,54 \pm 1,56\%$ ) quando comparados ao grupo tratado com solução salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% v.o.), correspondendo a um percentual de inibição de 35,47% e 37,88%, respectivamente. Os grupos tratados previamente com iombina e que posteriormente receberam a clonidina e o OEC, também apresentaram uma redução significativa da porcentagem da área lesada ( $22,48 \pm 2,38\%$ ) e ( $22,09 \pm 3,09\%$ ) em comparação ao grupo tratado com salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% v.o.), o que corresponde a um percentual de inibição de 35,17% e 36,28%, respectivamente. (Figura 13)

**Figura 13:** Efeito do pré-tratamento da iombina na gastroproteção promovida pelo OEC. Os animais foram tratados previamente com salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% v.o.), OEC (200 mg/kg, v.o.) ou Clonidina (0,01 mg/kg, i.p.) 1 h ou 30 min antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, Iombina (2mg/kg, i.p.) foi administrada 1h ou 30 min após o OEC (200 mg/kg, v.o.) e Clonidina (0,01 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M da porcentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo).  $\alpha_2$  p < 0,01 versus controle negativo (ANOVA e *Teste de Tukey*).



Os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos são encontrados no sistema nervoso central e periférico, em tecidos não neuronais, pâncreas, plaquetas, fígado, rins e olhos, onde exercem funções fisiológicas específicas. Podem ser pré ou pós-sinápticos e estão ligados a uma proteína G (HAYASHI, 1993). Os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos pré- sinápticos são descritos na

literatura por atuar na proteção de úlceras induzidas por indometacina, etanol, ácido acetil salicílico, e estresse (DEL SOLDATO, 1986; DI JOSEPH et al., 1987; KUNCHANDY et al., 1985; GYIRES et al., 2000). Estes receptores produzem efeitos gastroprotetores por múltiplos mecanismos que envolvem a inibição da secreção do ácido gástrico e da motilidade (GYIRES et al., 2000; JAMES et al., 2004). A estimulação dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos no trato gastrointestinal pode aumentar a absorção de cloreto de sódio e de líquido (CHANG et al., 1986).

A iombina é um antagonista adrenérgico  $\alpha_2$  seletivo encontrada na casca da planta *Pausinystalia yohimbe* e na raiz da *Rauwolfia* é utilizada para reduzir ou melhorar problemas de ereção (HOFFMAN et al., 1996). Em nosso estudo, ficou evidenciado que a iombina, antagonista adrenérgico  $\alpha_2$  seletivo, não conseguiu reverter a gastroproteção induzida pelo OEC. Isto nos sugere que o efeito gastroprotetor do OEC não está relacionado com os receptores noradrenérgicos

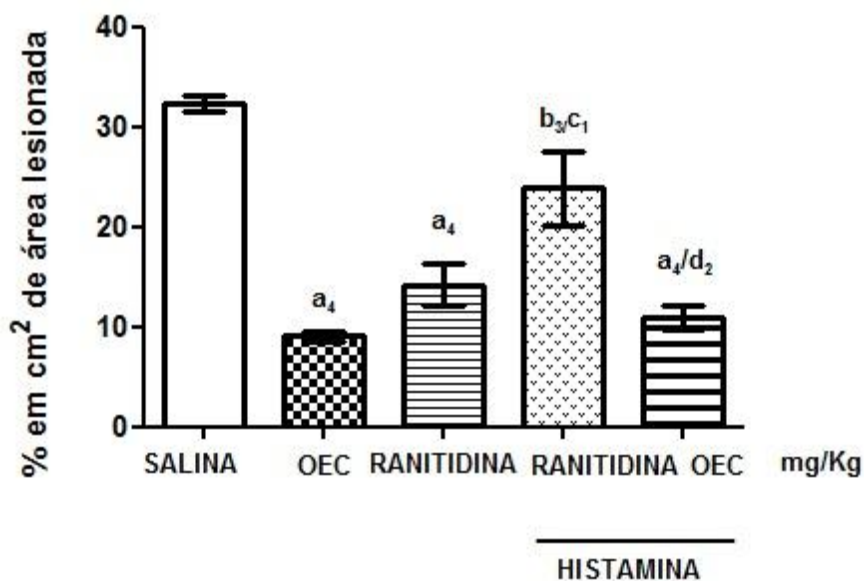
#### 4.7.4 Envolvimento dos receptores Histamínicos ( $H_2$ )

A histamina é produzida no estômago pelas células enterocromarfinas (ECL) e é liberada após alguns estímulos como a gastrina e acetilcolina (MOSSNER et al., 2005). A histamina, depois de liberada, difunde-se para seus alvos, as células parietais, ocasionando a secreção gástrica pela ativação dos receptores histaminérgicos ( $H_2$ ) presentes nessas células (KOEPPEN, STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2010). A histamina também pode estimular a secreção de ação de forma indireta ao se ligar nos receptores  $H_3$  que estão acoplados nas células D produtoras de somatostatina (KAZUMORI et al., 2004).

No estudo deste mecanismo, os animais tratados apenas com solução salina (1% de Tween 80 em solução salina 0,9% v.o.) mostraram após a administração do etanol absoluto uma área de lesão da mucosa gástrica de  $32,25 \pm 0,78\%$ . A administração prévia do OEC (200mg/Kg v.o.) e Ranitidina (40 mg/kg v.o.) reduziram de forma significativa o percentual de área lesada ( $9,06 \pm 0,53\%$ ) e ( $14,19 \pm 2,14\%$ ) em comparação ao grupo tratado apenas com salina ( $32,25 \pm 0,78\%$ ), correspondendo a um percentual de inibição de 71,90% e 56%, respectivamente. O grupo que recebeu o OEC (200mg/kg v.o.), mesmo na presença da histamina, conseguiu reduzir de forma significativa a área de lesão da mucosa gástrica ( $10,97 \pm 1,18\%$ ) quando comparado ao grupo tratado com salina ( $32,25 \pm 0,78\%$ ). Em contrapartida, o grupo que recebeu Ranitidina (40 mg/kg v.o.), na presença de histamina não teve a área de

lesão reduzida significativamente ( $23,89 \pm 3,69\%$ ), quando comparado ao grupo salina ( $32,25 \pm 0,78\%$ ). A administração de histamina ( $2\text{mg/kg}$ , s.c), um dos estimulantes da secreção gástrica, não foi capaz de reduzir de forma significativa o efeito protetor do óleo. Entretanto, foi capaz de reverter a ação da Ranitidina, com  $p < 0,05$ . Além disso, o grupo que recebeu o OEC e que foi previamente tratado com histamina apresentou uma redução significativa da área lesionada ( $10,97 \pm 1,18\%$ ) quando comparado ao grupo que recebeu a Ranitidina e foi previamente tratado com histamina ( $23,89 \pm 3,69\%$ ), correspondendo a um percentual de inibição da área lesionada de 34,01% e 25,92%. Em nosso estudo, ficou evidenciado que não há envolvimento dos receptores  $H_2$ , pois, a histamina não conseguiu reverter a gastroproteção induzida pelo OEC. Isto nos sugere que o efeito gastroprotetor dom OEC não está relacionado com esta via. (Figura 14)

**Figura 14:** Efeito do pré-tratamento com histamina na gastroproteção do OEC. Os animais foram tratados previamente com salina (1% de Tween 80 em solução salina 0,9% v.o.), OEC (200 mg/kg, v.o.) ou Ranitidina (40 mg/kg, v.o.) 1h ou 30 min antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, Histamina (3 mg/kg, s.c) foi administrado 1h ou 30 min após o OEC (200 mg/kg, v.o.) e Ranitidina (40 mg/kg, v.o.). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo).  $a_4$   $p < 0,0001$  versus controle negativo.  $b_3$   $p < 0,001$  versus OEC.  $c_1$   $p < 0,05$  versus Ranitidina.  $d_2$   $p < 0,01$  versus Histamina/ranitidina (ANOVA e Teste de Tukey).



A Ranitidina é um antagonista dos receptores  $H_2$  e inibem a secreção gástrica por competir com a histamina pelos receptores  $H_2$  nas células parietais. A avaliação do envolvimento dos receptores  $H_2$  na atividade antiulcerogênica do OEC no modelo de úlcera gástrica induzida pelo etanol demonstrou que o efeito gastroprotetor do OEC não foi revertido na presença de histamina, sugerindo que este ação biológica do OEC não tem envolvimento dos receptores histamínicos  $H_2$ .

#### 4.7.5. *Envolvimento da Participação dos neurônios aferentes sensíveis a capsaicina (TRPV1)*

A capsaicina é uma substância irritante extraídas de pimentas vermelhas presentes em plantas do gênero capsicum (MAGA *et al.*, 1975). No TGI existem subpopulações de neurônios aferentes primários que contem receptores TRPV-1 (SZOLCSANYI, BARTHO, 2001). Estes receptores são ativados pela capsaicina, que em pequenas doses promove efeitos gastroprotetores, aumentando o fluxo sanguíneo e a secreção de muco e bicarbonato (WARZECHA *et al.*, 2011).

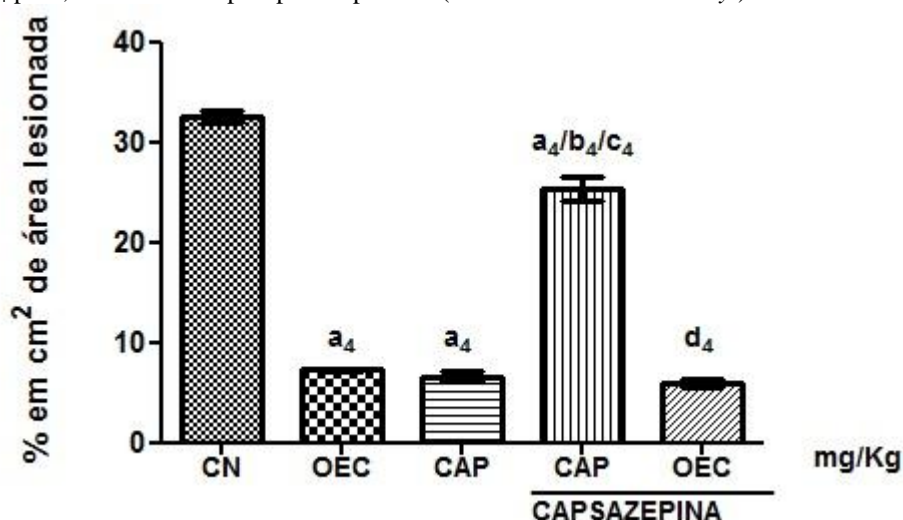
Trabalhos presente na literatura mostram que a capsaicina ativa os receptores TRPV-1 e promove efeito protetor contras lesões gástricas induzidas pelo etanol e que este mecanismo se deve ao aumento do muco e bicarbonato, aumento da circulação da mucosa e participação das prodtglandinas (PARK *et al.*, 2000, BRZOZOWISKI *et al.*, 2005).

Com base no exposto acima, investigou-se a participação dos canais sensíveis a capsaicina na gastroproteção promovida pelo OEC. Neste mecanismo, o grupo de animais que recebeu apenas salina apresentou o maior índice de área lesionada, correspondendo a uma média de  $32,60 \pm 0,58\%$ . Os grupos tratados com OEC (200mg/Kg, v.o.) e capsaicina (5mg/kg, i.p.) demonstraram uma redução no percentual de área lesionada em relação ao grupo controle, com médias de  $7,30 \pm 0,08\%$  e  $6,57 \pm 0,51\%$ , respectivamente, confirmando o poder da capsaicina e do OEC em proteger a mucosa gástrica.

Para elucidar a participação dos neurônios sensíveis a capsaicina na gastroproteção, foi realizado um pré-tratamento com capsazepina (5mg/kg, i.p.) antes dos animais receberem o capsaicina (5mg/kg, i.p.) e OEC (200mg/Kg, v.o.), o que resultou em valores de média de  $25,35 \pm 1,25\%$  e  $5,94 \pm 0,42\%$  (Figura 15). De acordo com os resultados, pode-se observar que o efeito protetor da capsaicina foi revertido pela capsazepina. Os resultados mostraram também que os neurônios sensíveis a capsaicina não estão envolvidos no efeito gastroprotetor

do OEC, uma vez que a capsazepina quando administrada não conseguiu reverter os efeito protetor do OEC.

**Figura 15:** Efeito do pré-tratamento com capsazepina na gastroproteção promovida pelo OEC. Os animais foram tratados previamente com salina (1% de Tween 80 em solução salina 0,9% v.o.), OEC (200 mg/kg, v.o.) ou capsaicina (5 mg/kg, i.p.) 1h ou 30 min antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, capsazepina (5 mg/kg, i.p.) foi administrado 30 minutos antes do OEC (200 mg/kg, v.o.) e capsaicina (5 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo). a<sub>4</sub> p <0,0001 versus controle negativo. b<sub>4</sub> p < 0,001 versus OEC. c<sub>4</sub> p < 0,0001 versus capsaicina. d<sub>4</sub> p < 0,0001 versus capsazepina/capsaicina (ANOVA e Teste de Tukey).



#### 4.7.6 Envolvimento dos Receptores Opioides

Os receptores opioides ( $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ ) produzem efeitos no Trato Gastrointestinal. Eles são acoplados a proteína G, inibem a adenilato ciclase e inibem o AMPc. Ao nível de membrana, diminuem a excitabilidade neuronal (por provocar o aumento da permeabilidade ao potássio, causando hiperpolarização) e inibem os canais de cálcio. (RANG et al., 1999). Assim, substâncias que agem nesses receptores podem promover gastroproteção (STERNINI et al., 2004).

O termo opioide se refere a qualquer substância, sintética ou endógena, com efeitos similares ao da morfina e que são bloqueados pelo antagonista naloxona (ARVIDSSON et al., 1995). Os opiáceos ou opioides interagem com receptores proteicos situados nas membranas de células do Sistema Nervoso Central e em células do Trato Gastrintestinal. Esses receptores são divididos em três principais grupos: receptor mu ( $\mu$ ), receptor delta ( $\delta$ ) e receptor Kappa ( $\kappa$ ) (KATZUNG, 2006).

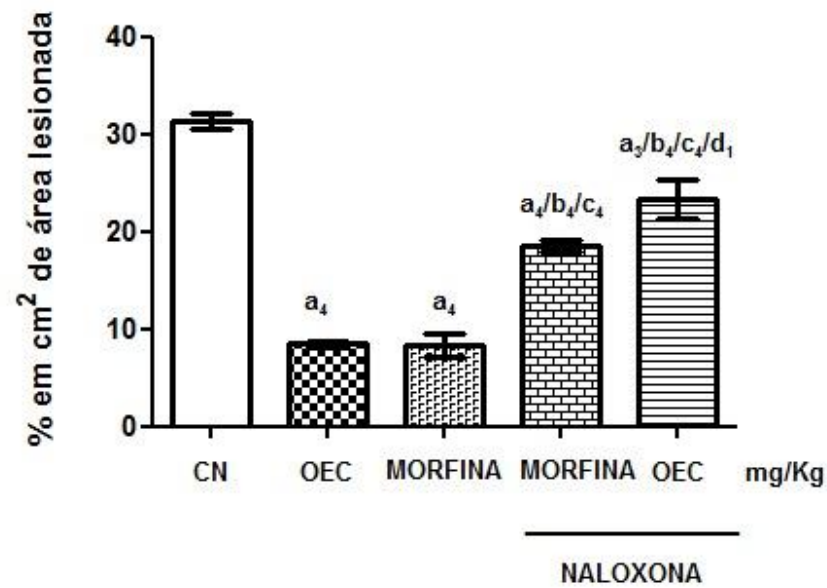
Os opioides promovem a gastroproteção principalmente pela ativação de receptores  $\mu$  e  $\delta$ , tanto central como periféricamente (GYIRES et al., 2000; GYIRES et al., 2012). Além da

gastroproteção, os opioides no trato gastrointestinal provocam redução da propulsão intestinal, motilidade gástrica e aumentam a absorção de fluidos e eletrólitos (BEARD *et al.*, 2011). A naloxona, o antagonista dos opioides, tem alta afinidade pelos receptores  $\mu$  e menor afinidade pelos receptores  $\delta$  e  $\kappa$  (KATZUNG, 2007) e desta maneira reverte as ações dos opioides.

Para investigar o envolvimento destes receptores na gastroproteção um grupo recebeu solução salina e apresentou maior índice de área lesionada ( $31,25 \pm 0,78$ ), confirmando o potencial do etanol em desenvolver lesões gástricas. Todos os grupos tratados apresentaram resultados significantes em relação ao grupo salina. Os grupos tratados com o OEC (200mg/kg, v.o.) e morfina (5mg/kg, s.c) apresentaram  $8,50 \pm 0,26\%$  e  $8,24 \pm 1,2\%$  como valores de média da porcentagem da área lesionada, respectivamente, e não apresentaram significância entre si. A naloxona, um antagonista opióide, foi administrada para verificar a participação dos receptores opioides na gastroproteção do OEC. Este antagonista foi administrado antes da aplicação da morfina e do OEC e resultou em valores de média  $18,46 \pm 0,62\%$  e  $23,40 \pm 2,01\%$ , respectivamente.

De acordo com os dados obtidos, verificou-se que a naloxona quando administrada antes da morfina antagonizou o efeito protetor do opioide. A reversão do efeito protetor também foi observado quando a naloxona foi administrada antes do OEC. O grupo que recebeu somente o OEC apresentou  $8,50 \pm 0,26\%$  como média da porcentagem da área lesionada, enquanto que o grupo que recebeu a naloxona previamente a administração do OEC apresentou  $23,40 \pm 2,01\%$  como média da porcentagem da área lesionada, indicando, portanto, a participação dos receptores opioides no efeito gastroprotetor do OEC. (Figura 16)

**Figura 16:** Efeito do pré-tratamento com naloxona na gastroproteção do OEC. Os animais foram tratados previamente com salina (1% de Tween 80 em solução salina 0,9% v.o.), OEC (200 mg/kg, v.o.) ou Morfina (5 mg/Kg, s.c) 1h ou 30 minutos antes de receberem (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, naloxona (2 mg/Kg, i.p.) foi administrado 15 min antes do OEC (200 mg/kg, v.o.) ou Morfina (5 mg/Kg, s.c). Após 30 minutos da administração da morfina e 1 hora da administração do OEC os animais receberam etanol<sub>abs</sub> (0,2mL/animal, v.o.). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo).  $a_3$  p < 0,001 *versus* controle negativo.  $a_4$  p < 0,0001 *versus* controle negativo  $b_4$  p < 0,0001 *versus* OEC.  $c_4$  p < 0,0001 *versus* Morfina.  $d_1$  p < 0,05 *versus* Naloxona/morfina (ANOVA e Teste de Tukey).



Estudos corroboram com o resultado obtido com o OEC. O linalol é um monoterpeneo comumente presente em óleos essenciais e também se faz presente na constituição do OEC. Este composto promoveu antinociceção utilizando modelos experimentais em dor e esta atividade teve o envolvimento dos receptores opioides (PEANA et al., 2003). O óleo essencial de *Croton cajucara*, rico em terpenos, apresentou efeito antinociceptivo e este efeito tem o envolvimento dos receptores opioides (BIGHETTI et al., 1999) O óleo essencial de *Alpinia zerumbet* é rico em 4-terpineol, 1,8 cineol, trans cariofileno e  $\alpha$  terpineol, compostos que também estão presentes no OEC. O óleo essencial de *Alpinia zerumbet* apresentou efeito antinociceptivo e este efeito tem o envolvimento dos receptores opioides (PINHO et al., 2005). Diante destes dados, pode-se sugerir que o envolvimento com os receptores opioides seja atribuído aos terpenos presentes nestas plantas.



## CONCLUSÃO

---

## 5 CONCLUSÃO

- A partir da cromatografia gasosa coplada a espectrometria de massa o OEC apresentou 21 componentes, sendo o espatulenol e 1,8 cineol os compostos majoritários.
- Os resultados indicam que o OEC não apresentou atividade antimicrobiana significativa pela técnica de microdiluição, no entanto, o mesmo apresentou importante ação moduladora frente às drogas antimicrobianas utilizadas.
- O teste para determinar a dose letal média do OEC demonstrou que OEC apresenta uma dose letal média por via oral maior que 2000 mg/Kg.
- O OEC apresentou atividade gastroprotetora frente aos modelos clássicos de lesão gástrica (etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina).
- O estudo dos possíveis mecanismos envolvidos na gastroproteção revelou a possível participação dos receptores opioides, óxido nítrico e canais de potássio.

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, O. M.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSANYI, J.; MOZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. **Journal of Physiology**, v.95, p.105-127, 2001.
- ABDELSALAM, O. M.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSANYI, J.; MOZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. **Journal of Physiology**, v.95, p.105-127, 2001.
- ADAM, D. Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v.50, n.4,p.1-5,2002.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.472-508, 2008.
- AIT-OVAZZOU, A.; CHERRAT, L.; ESPINA, L.; LARAN, S.; ROTA, C.; PAGAN, R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined process of food preservation. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, Wageningen, v.12, n.3, p.320-390, 2011.
- AKTAR, M. S & MUNIR, M. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *solanum nigrum*, *Brassica oleraceae* and *ocimum basilicum* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, p. 163-176, 1989.
- ALAM, S.; ASAD, M.; ASDAQ, S.M.; PRASAD, V.S. Antiulcer activity of methanolic extract of *Mormodica charantia* L. in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v.123, n.3, p.464-469, 2009.
- AL-HOWIRINY, T.; AL-SOHAIBANI, M.; EL-TAHIR, K.; RAFATULLAH, S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of "Parsley" *Petroselinum crispum*. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.31, n.5, p.699-711, 2003.
- ALLEMAND, A. **Efeito cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. em úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- ALMEIDA, T.S.; ROCHA, J.B.T.; RODRIGUES, F.F.G.; CAMPOS, A.R.; COSTA, J.G.M. Chemical composition antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.44, p.630-638, 2013.
- ALVIANO, D.S; ALVIANO, C.S: Plant extract : search for new alternatives to treat microbial diseases. **Curr pharm Biotechnolol**, v.10, p.106-121, 2009.
- ARVIDSSON, U., *et al.* Delta opioid receptor immune reactivity: distribution in brainstem and spinal cord and relationship to biogenic amines and enkephalin. **Journal of Neuroscience**, v.15, n.2, p.1215-1235, 1995.

ASTANI, A. REICHLING, J.SCHNITZLER, P: Comparative study on the monoterpenes derived from essential oils. **Phytotherapy**, v.24,p.673-679, 2010.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.61, n.3-4, p.105-124,2000.

BAGCHI, D.; CARRYL, O.R.; TRAN, M.X.; ROHN, R.L.; BAGCHI, D.J.; GARG, A.; BAGCHI, M.; MITRA,S.; STOHS, S.J. Stress, diet and alcohol – induced oxidative gastrointestinal mucosa injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. **Journal Applied and Toxicology**, v. 18 (1), p. 3-13, 1998.

BAKKALI,F.;AVERBECK.;S.;AVERBECK,D.;WAOMAR, M. Biological effects of essential oils-a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475,2008.

BAKER, D.D; CHU, M.; OZA, V.V; RAJGARHIA,V. The value natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Report**, v.24, p. 1225-1244, 2007.

BAROCELLI,E.;CALCINA,F.;CHIVARINI, M. Antinociceptive and Gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. **Life Sciences**, v.76, n.2,p.213-223,2004.

BAYIR, Y.; ODAB, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H. HALICI, M.; KARAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffracton acid. **Phytomedicine**, v.13, p.584-590, 2006.

BEARD,T.L.;LESLIE,J.B.;NEMETH, J. The opioid component of delayed gastrointestinal recovery after bowel resection. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v.15,n7,p.1259-1268,2011.

BELLETII, N.; LANCIOTTI, R.; PATRIGNANI, F.;GARDINI, F: Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit- based salads. **Journal Food Science**, v.73, p.331-338, 2008.

BENTO,A.F.;MARCON,R.;DUTRA,R.C.;CLAUDINO,R.F.;COLA,M.;PEREIRA,L.D.F.;C ALIXTO,J.B.  $\beta$  carophyllene inhibits dextran sulfate sodium induced colitis in mice through cb2 receptor Activation Pathway. **American Journal of Pathology**, v.178, p.1153-1166, 2011.

BERRY, P.E.; HIPPI, A.L; WURDACK, K.J.; VAN E, RIINA, B.W.R. Molecular Phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae ( Euphorbiaceae sensu stricto) using its and trnL sequence data. **American Journal of Botany**, cap 92, p. 1520-1534, 2005.

BIGHETT,E.J.B.;HIRUMA-LIMA,C.A.;GRACIOSO,J.S.;SOUZA-BRITO,A.R.M.Anti-inflammatory and Antinociceptive effects in roedents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth.**Journal pharmaceutical and Pharmacology**, v.51,p.1447-1453,1999.

BITTNER, M. et al. Estudio quimico de species de La Família Euphorbiaceae em Chile. **Boletín de La sociedad Chilena de química**, v.46, p. 1-15, 2001.

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

BOYOM, F.F.; NGOUANA, N.; ZOLLO, P.H.A.; MENUT C.; BESSIERE, J.M.; GUT,J.; ROSENTHAL, P.J. Composition and antiplasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**. V.64, p.1269-1275, 2003

BOYOM,F.F.;KEUMEDJIO,F.,DONGMO,P.M.J.;NGADJUI,B.T.;ZOLLO,P.H.A.;MENUT, C.;BESSIERE,J.M.Essential oils from *Croton zambesicus* Muell. Arg. Growing in Cameroon. **Flavour and Fragrance Journal**.v,17,p.215-217,2002.

BRASIL, D. S, B.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, G. S. Essential oil composition of *Croton palonostigma* Klotzsch from North Brazil. **Journal Brazilian Chemical Society** , v.20,p.1188-1192,2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Decreto 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 20 out. 2013, 19h00min.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Portaria 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 20 agosto. 2013, 19h00min.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRZOZOWOSKI, T. KONTUREK P.C; KONTUREK, S.J; BRZOZOWOSKI, A.I; PAWLIK, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal Physiology Pharmacology**, v.56, n 5, p. 33-55, 2005.

BUTLER,M.S.;BUSS,A.D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics? **Biocemical Pharmacology**, v.71,n.7,p.919-929,2006.

BURT,S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food: a review. **International Journal od Food Microbiology**, v.94,n.3,p.223-253,2004.

CALIXTO, J.B. Medicamentos e Fitoterapicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna.** YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Chapeco: Editora Argos. p. 297- 315, 2001.

CALDAS,G.F.R.;COSTA,I.M.A.;DASILVA,J.B.R.;NÓBREGA,R.F.;RODRIGUES,F.F.G.;COSTA,J.G.M.;WANDERLEY,A.G.Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiussi* Beth ( Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.886-892,2011.

CAMPOS, M.C.O.; SALOMÃO, K.; CASTRO-PINTO, D.B.; LEON, L.L.; BARBOSA, H.S.; MACIEL, M.A.M. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on trypanosoma Cruzzi. **Parasitology Research**, v.107, n 5, p.1193- 1204, 2010.

CAMPOS,A.R.;ALBUQUERQUE,F.A.A.;RAO,V.S.N.;MACIEL,M.A.M.;PINTO,A.C. **Fitoterapia**,v.73,p.116,2002.

CASTRO, G.A.; CARVALHO, J.E.; TINTO, S.V.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V.C. Antiulcerogenic effect of a whey protein isolate and collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions on oral administration to rats. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.1, p.83-90, 2010.

CASAL, M.; VAQUEIRO, M.; RINDER, H.; TORTOLLI, E.; GROSSET, J.; RUSCH GERDES, S.; GUTIERREZ, J.; JARLIER, V. A Case control study for multidrug-resistant tuberculosis: risk factors in four European Countries. **Microbial Drug Resistance**, v.11, p.62-67, 2005.

CEOLIN, T. *et al.* Plantas medicinais: transmissão do conhecimento nas famílias de agricultores de base ecológica no Sul do RS. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, 2011; 45 (1): 47 - 54.

CERQUEIRA, G.S.; SILVA, G.S.; VASCONCELOS, E.R.; FREITAS, A.P.F.; MOURA, B.A.; MACEDO, D.S.; SOUTO, A.L.; FILHO, J.B.M.; LEAL, L.K.A.; BRITO, G.A.C.; SOUCCAR, C.; VIANA, G.S.B. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **Eur. Journal Pharmacology**, v.683, p.260-269, 2012.

CHANG, E.B.; FEDORAK, R.N.; FIELD, M. Experimental diabetic diarrhea in rats: intestinal musosal denervation hypersensitivity and treatment with clonidine. **Gastroenterology**, v.91, p.564-569, 1986.

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

CHAVAN, M.J.; WAKTE, P.S.; SHINDE, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of cariophyllene oxide from *Annona squamosa* L. Bark. **Phytomedicine**, v.17, p.149-151, 2010.

CHBINEH, S.; BIRK, J. Proton pump inhibitors: the good, the bad and unwanted. **Southern Medical Journal**, v 105, n 11, p.613-618, 2012.

COATES, A.R.M.; HU, Y. Br. **J. Pharmacol.**, v.152, p.1147, 2007.

COBOS, M. I.; RODRIGUEZ, J.L.; OLIVA, M.L.; DEMO, M.; FAILLACI, S.M.; ZYGADLO, J.A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserghila*. **Planta Medica**, v.67, p. 84, 2001.

COELHO-SOUZA, A.N.; LAHLOU, S.; BARRETO, J.E.F.; YUM, M.E.M.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, H.D.; CELEDONIO, N.R.; FEITOSA, R.G.F.; DUARTE, G.P.; SANTOS, C.F.; DE ALBUQUERQUE, A.A.C.; LEAL-CARDOSO, J.H. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental e Clinical Pharmacology**, p.288-298, 2011.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; BARATA, E.L.; MAGALHÃES, P.J.C.; LIMA, C.C.; LEAL CARDOSO, J.H. **Phytother res**, v.11, p.299, 1997.

COELHO-DE-SOUZA AN, LAHLOU S, BARRETO JE, YUM ME, OLIVEIRA AC, OLIVEIRA HD, CELEDÔNIO NR, FEITOSA RG, DUARTE GP, SANTOS CF. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & clinical pharmacology** 2011.

COMPAGNONE, R.S., CHAVEZ, K., MATEU, E., ORSINING, G., ARVELO, F., SUAREZ, A.I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Methods**, v.2, 101-108, 2010.

CONEGERO, L.S.; et al. Constituintes químicos de Alchorhea glandulosa (Euphorbiaceae). **Química Nova**. v.26, n.6, p. 825-827, 2003.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Euphorbiaceae. In: BARBOSA, M.R.V et al (ongs). **Checklist das plantas do nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia: v.1, p.71-74, 2006.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Some Thoughts on the future of ethnopharmacology. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 5-14, 2005. In: RUIZ, A. L. T. G. et al. Farmacologia e toxicologia de *Peumus Boldus* e *Baccharis genisteloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, 2008.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; AGÉLICO, E. C. " Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 583-586, 2007.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C.K.B.; SOUZA, E.O.; CALDAS, G.F.R.; SILVA, M.R.; SANTOS, N.K.A.; MOTA, M.L.; SANTOS, P.F.C.Q. Avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.583-586, 2008.

COSTA, A.C.V.DA.; MELO, G.F.A.; MADRUGA, M.S.; COSTA, J.G.M.; JUNIOR, F.G.; NETO, V.Q. Chemical composition and antibacterial of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax e Hoffm. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v.43, n.6, p.2853-2864, 2013.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; LIMA, E.O. *In vitro* Staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.670-675, 2008.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARHAM, J.L. The mode of antibacterial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J. Appl. Microbiol**, v.88, p.365-371, 2000.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA, A. M.; MELO, D. L. F.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLY, A. R., ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal Ethnopharmacology**, v.111, p.409-412, 2007.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp* and *Clavibacter michiganensis*. **Crop. Prot**, v.22, p. 39-44, 2003.

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

DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M. **Plantas Mediciniais: fármacos derivados de plantas**. In: SILVA, P. Farmacologia. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. P.148.



DEBA, F.; XUAN, T. D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. **Radioata**, v.19,p.346-352, 2008.

DEFONESKA, A.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current opinion in Gastroenterology**, v.26, n.6, p.604, 2010.

DEGENHART,J.;KOLLNER,T.G.;GERSHENZON,J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v.70,p.1621-1637,2009.

DEL-SOLDATO, P. Gastric lesion- preventing or potentiating activity of clonidine in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.41, p.257-259, 1986.

DE-SOUZA, D.P. Analgesic like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v.16,p.2233-2252,2011.

DI JOSEPH, J. F.; EASH, J. R.; MIR, G. N. Gastric antisecretory and antiulcer effects of WOHR1582A, a compound exerting alpha 2 adrenoceptor agonist activity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.241, p.123-138,1985.

DI STASI, L. C. hiruma-lima. **Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. Ed. rev. Ampl. São Paulo: UNESP, 2002.

DIAS, I. J.M.; DA CÂMARA, C.A.G.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile constituents of the leaves of *Croton sellowii* Bail ( Euphorbiaceae). **Journal Essential oil**, v.18, p.360-361, 2006.

DIKBANS,N.;KOTAN,R.;DADASOGLU,F.; SAHIN, F. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol of *Satureja hontensis*? REVISTA v.124,p.179-182,2008..

DOCKRAY, G.L.; VARRO, A.; DIMALINE, R. Gastric endocrine cells: gene expression, processing and targeting of active products. **Physiological Reviews**, v.76, n.3, p.767-768, 1996.

DOORN JUAN,L.; SCHEEBERGER, P.M.; NOUHAN, N.;PLAISIER, A.P.; QUINT, W.G.V.; BOER,W.A. Importance or *Helicobacter pylori* cagA and vacA status for the efficacy of antibiotic treatment,v.46,p.321-326,2000.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anticândida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

EBERHANT, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoides and gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, 109,p.285-301,1995.

EGAN,B.J,KATICICI,M.,O CONNOR,H.J.;O MORAIN,C.A. Treatment Helicobacter pylori. **Helicobacter**,v 12, n 1, p.31-37,2007.

ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA ON LINE: **Stomach: Structure**. Disponível em: <<http://www.britanica.com/EBchecked/media/68634/structure-of-the-human-stomach-the-somach-has-three-layers>>Acesso em: 15 de out de 2013.

ESTEVEES,I.;SOUZA,I.R.;RODRIGUES,M et al.Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw.**Journal Ethnopharmacol**,v.101,p.191-196,2005.

FARAG,R.S.;SHALABY,A.S.;ELBAROTY,G.A.;IBRAHIM,N.A.;ALI,M.A.;HASSAN,E.M .Chemical and biological evaluation of the essential oil of different Melaleuca species. **Phytother Res**, v.18,p.30-35,2004.

FERNANDES, A. G.; BEZERRA, P. **Estudo Fitogeográfico do Brasil**. Fortaleza: Stylus Comunicações, p.205, 1990.

FICA,C.A. Tratamiento de Infecciones fungicas sistêmicas. Primeira Parte: fluconazol,itraconazol,voriconazol.**Revista Chilena de Infectologia**,v.21,n.1,p.26-38,2004.

FLACH, A.; GREGEL, B.; SIMIONATTO, E.; DA SILVA, U.F.; ZANATTA, N.; MOREL, A.F.; LINARES, C.E.; ALVES, S.H. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*.**Planta Med.**, v.68, p.836-838, 2002.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapeuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Revista Eletronica MultiCiencia**, v. 7, p 32, 2006.

FONATOGAWA,K.;HAYASHI,S.;SHIMOMURA,H.;YOSHIDA,T.;HATANO,T.;ITO,H. Antibacterial activity of hydrolyzate tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiology and immunology**, v.48,p.251-261,2004.

FONTENNELE,R..O.S.;MORAIS,S.M.;BRITO,E.H.S.;KERNTOPF,M.R.;BRILHANTE,R.S .N.;CORDEIRO,R.A.;TOMÉ,A.R.;QUEIROZ,M.G.R.Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* cham. **J.Antimicrob.Chemother**, v.59, p.934-940,2007.

FORZZA, R. C.; DE JANEIRO, J. B. D. R. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 22 ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill Interamericana do Brasil, 653 p, 2006.

GODOY, A. P. O.; RIBEIRO, M. L.; BENVENGO, Y. H. B.; VITUELLO, L.; MIRANDA, M. C. B.; MENDONÇA, S.; PEDRAZZOLI, J. JR. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. **BMC Gastroenterology**, v.3, p.201, 2003.

GOEL, R. K E.; SAIRAM, K. Antiulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasha*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. **Indian Journal Pharmacology**, 34, p.100-110, 2002.

GOLAN, P. E.; TASHJIAN, A. H. **Princípios de Farmacologia: A base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 914 p, 2009.

GONÇALVES, C.V. Os pequizeiros da Chapada do Araripe. Revista de Geografia. Recife: Universidade Federal do Pernambuco- DCG/NAPA, 25. P. 88-103. 2008.

GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da Terapêutica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, HDM. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 135-141, 2007.

GRUNDMANN, H.; DE KRAKER, M.; DAVEY, P: Clinical impact of antimicrobial resistance: design matters. **Lancet infect Dis.**, v.11, p.344, 2011.

GURIB-FAKIM. A Medicinal Plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, n. 27, p.1-93, 2006.

GUEDES, M.M.; CARVALHO, A.C.S.; LIMA, A.F.; LIRA, S.R.S.; QUEIROZ, S.S.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Gastroprotective Mechanisms of Centipedic Acid, a Natural Diterpene from *Egletes viscosa* Less. **Biological e Pharmaceutical bolletin**, v.31, n.7, p.1351-1355, 2008.

GUTH, P.H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **Yale Journal Biological medicine**, v.65, p.677-688, 1992

GUILHON, C.C.; RAYMUNDO, L.J.P.; ALVIANO, D.S.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; MATHEUS, M.E.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil, **Journal of Ethnopharmacology** v.135, p.406-413, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Funções secretoras do trato alimentar . **Tratado de Fisiologia Médica**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GYIRES, K.; MULLNER, K.; FURT, S.; RONAI, A. Z. alpha 2 adrenérgic and opioid receptor mediated gastroprotection. **Journal of Physiology**. Paris, v.94, p.117-121, 2000.

GYIRES, K.; NEMETH,.; ZADORI, Z. Gastric Mucosal Protection and Central Nervous System. **Current Pharmaceutical Design**, 2012

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products :methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v.11, p.137-147, 2000.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.U. Antimicrobial activity of essential oils and others plants extracts. **J.Appl. Microbiol**, v.86, p.985-999, 1999.

HELANDER, I.M.; VON WRIGHT, A.; T. MATTILA-SANDHOLM, T. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. **Trends Food Sci Technol**, v. 8 , pp. 146–150, 1997.

HIROKAWA, M.S.; YOSHIDA, H.; KUROSE, I.; SHIGEMATSU, T.; HOKARI, R.; HIGUCHI, H.; WATANABE, N.; YOKIMURA, Y.; KOYAMA, H.; KATOS., ISHIL, H. Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration Alcohol. **Clin. Exp. Res**, v.22 (3 suppl), p. 111-114, 1998.

HIRUMA-LIMA C, GRACIOSO J, RODRIGUEZ J, HAUN M, NUNES D, SOUZA BRITO A. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth.(Euphorbiaceae). **Journal of ethnopharmacology** 2000, 69(3):229-234.

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

HIRUMA-LIMA,C.A.;GRACIOSO,J.S.;NUNES,D.S.;SOUZA BRITO,A.R.M.Effects of na Essential Oil from the Bark of *Croton cajucara* Benth on Experimental Gastric Ulcer Models in Rats and Mice.**J.Pharma.Pharmacol**,v.51,p.341-346,1999.

HIRUMALIMA,C.A.;GRACIOSO,J.S.,BIGHETTLE,J.B.;GRASSIKASSISSE,D.M.;NUNES ,D.S.;SOUZA BRITO,A.R.M. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth,on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. **Phytomedicine**, v.09,p.523-529,2002.

HOFFMAN, B.B.; LEFKOWITZ, R.J. **Catecholamines, sympathomimetic drugs and adrenergic receptor antagonists**. In: Goodman, L.S.S.; GILMAN, A.G. The pharmacological basis of therapeutics . 9 ed. New York: Mac Millian., p.199-248,1996.

IBAMA. **Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Disponível em: [https://www.ibama.gov.br/recursos\\_florestais/araripe.htm](https://www.ibama.gov.br/recursos_florestais/araripe.htm). Consultado: em 23 de setembro de 2013.

JAIN, K.S, SHN, A.K; BARIWAL, J., SHELKE, S.M., KALE, A.P., JAGTAP, J.R; BHOSALE, A.V. Recent and vances in proton pump innibitors and management of acid peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v.15, p.1181-1205, 2007.

JAMES, A.N.; RYAN, J.P.; PARKMAN, H. P. Effects of clonidine and tricyclic antidepressants on gastric smooth muscle contractility . **Neurogastroenterol**, v.16, p.143-153, 2004.

JANSEN,A.M.;SCHEFFER,J.J.C.;BAERHEIM-SUENDSEN,A.Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review.Aspects of the lest methods. **Planta Med**,v.53,p.985-990,1999.

JUVEN,J.;KANNER,J.;SCHUED,F.;WEISSLOWICK,H. Factors that interact with antimicrobial action of thyme essential oil and its active constituents. **J. Appl. Bacteriol**, v.76,p.626-631,1994.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: Básica e Clínica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KAWANO, S.; TSUJI,S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal Gastrointestinal & Hepatology**, v.15,p.1-6, 2000.

KAZUMORI, H.; ISHIHARA, S.; RUMI, M. A. K; Transforming growth factor directly augements histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enterocromaffin-like cells. **American Journal Gastrointestinal and liver Physiology**, v.286, p.508-514,2004.

KINGHORN, A.D.; PAN, L.; FLETCHER, J.N.; CHAI, H. THE RELEVANCE OF HIGNER Plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, p.1539-1555, 2011.

KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. BERNE & LEVY. **Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.491-543, 2009.

KONTUREK, P.C.H.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; TAUT, A.; KWICIEN, S.; PAJDO, R.; SLIWOWSKI, Z.; HANH, E.G. Bacterial lipopolysaccharide protects gastric mucosa against acute injury in rats by activation of genes for ciclooxigenases and endogenous prostaglandins. **Digestion**, v.59, n.4, p.284-297, 1998.

KONTUREK, P.C.H.; BRZOZOWSKI, T.; MEIXNER, H.; PTAK, A.; HAHN, E.G.; KONTUREK, S.J. Central and peripheral neural aspects of gastroprotective and ulcer healing effects of lipopolysaccharides. **Journal Physiology Pharmacology**, v.52, n.4, pt.1, p. 611-623, 2001

KUNCHANDY, J.KHANNA.; KULKARNI, S.K. Effect of alpha agonist clonidine, guanfacine and B-HT 920 on gastric acid secretion and ulcers in rats. **Archives internationaux de pharmacodynamie et de therapie**, v.275, p.123-138, 1985.

KWICIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **J Journal Physiology Pharmacology**, v.53, n.1, p.39-50, 2002.

LAGE, H.; DUARTE, N.; COBURGER, C.; HILGEROTH, A.; FERREIRA, M.J. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. **Phytochemistry**, v.17, v.6, p.441-448, 2010.

LAI, C.C.; WANG, C.Y.; CHU, C.C.; TAN, C.K.; LU, C.L.; LEE, Y.C.; HUANG, Y.T.; LEE, P.I.; HSUEH, P.R. Correlation between antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria causing health-care associated infections at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2009. **Journal Antimicrobial Chemother.**, v.66, p.1374-1382, 2011.

LAINE, L.; TAKEVCKI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to bedside. **Gastroenterology**, v.135, n.1; p.41-60, 2009.

LAINE, L. The gastrointestinal effects of nonselective NSAIDs and COX-2 selective inhibitors. **Sem. Arthritis Rheum.**, v.32, n.3, p.25-32, 2002.

LAMBERT, P.A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement**, v.92, p.465-545, 2002.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre: Metrópole, 2008.

LAU, J. Y.; SUNG, J.; HILL, C.; HENDERSON, C.; HOWDEN, C. W.; METZ, D. C. Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality. **Digestion**, v.84, n.2, p.102-113, 2011.

LAZARINI, C.A.; UEMA, A. H.; BRANDÃO, G. M.; GUIMARÃES, A. P.; BERNARDI, M. M. Croton zehntneri essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. **Phytomedicine international Journal of Phytotherapy and phytopharmacology**, v.7 (6), p. 477-481, 2000.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 804 p.

LEITE, G. D.; PENHA, A. R.; FERNANDES, C.N.; SOUZA, H. H. F.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. **Fitoterapia**, v.80, p.77-80, 2008.

LEWIS, D. A.; HANSON, P. J.; **Antiulcer drugs of plant origin** In: Progress in medicinal chemistry. Ed. G.P. Ellis and G.B.West. Elsevier Science Pubisbers, Amsterdam, v.28, p.201-231, 1991.

LICHTENBERGER, L.M. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr opin Gastroenterol**, v.15, p.463-472, 1999.

LIMA, M. G. A.; MAIA, I.; SOUSA, MORAIS, L.; FREITAS, S. Effect of stalk and leaf extract from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 48 (4), 211.

LIMA, I. O et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Cândida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.197-201, 2006.

LIMAACCIOLY,P.M.;LAVORPORTO,P.R.;CAVALCANTE,F.S.;MAGALHÃES,P.J.C.;LAHLOU,S.;MORAIS,S.M.;LEALCARDOSO,J.H.**Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.33,p.1158-1163,2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LUCENA, M. F. A.; ALVES, M. Notas Taxonômicas para Euphorbiaceae do Nordeste do Brasil. **Hoehnea**, v.37, n.1,p.: 71- 85 , 2010.

LUZHETSKYY,A.;PELZER,S.;BECHTHOLD,A.;**Curr Opin.Investig .D**, v.8,p.608,2007.

MACHADO, A. A. **Caracterização fitoquímica e Avaliação da Citotoxicidade de *Synaderium carinatum* Boiss ( Euphorbiaceae)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MAGALHÃES,P.J.C.;LAHLOU,S.;JUCÁ,D.M.;COELHOSOUSA,L.N.;FROTA,P.T.T.;COSTA,A.M.G.;LEAL CARDOSO,J.H.Vasorelaxation induced by essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundamental e Clinical Pharmacology**,v.22,n.2,p.169-177,2008.

MAIA, G. N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilizadas**. 1ª Ed. Leitura e Arte. 19-31p. 2004.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R.K.; BANDYO PADHYAY, U. Smoking and pathogenesis of gastroduodenal ulcer- recent mechanistic update ethanol-induced gastric lesions in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.253, n.1, p.329-338,2003.

MALLONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C.A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Llooydia**, v.25, p.320-322, 1962.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease **Lancet**, v.374, p. 1449-1461, 2009.

MARK, C.; ENRIGHT, M.; ROBINSON, A.; RANDLE, G.; FEIL, E.; GRUNDMANN, H.; SPRAT T, B. The evolutionary history of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) **PNAS**, v.99, p.7687-7698, 2002.

MARTINEZ, A.L.; GONZALEZ-TRAJANO, M.E.; LOPEZ-MUNOZ, F.J.; NAVARRETE, A. antinociceptive effect and CG/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. **Planta Médica**, v.75, p.508-511, 2009.

MASSIGNANI, J.J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytother. Res**, v.23, p.1355-1360, 2009.

MASUDA, E.; KAWANO, S.; NAGANO, K.; TSUJI, S.; TAKEI, Y.; TSUJII, M.; OSHITA, M.; MICHIDA, T.; KOBAYASHI, I.; NAKAMA, A. Endogenous Nitric Oxide Modulates Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Gastroenterology**. v.108, p.58-64, 1995.

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenaceae* DC, **Latin American Journal of pharmacy**, v.29, n.6, p.1049-1052, 2010.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sciences**, v.65, n.2, p.PL27-PL32, 1999.

MEDEIROS, J.B.L.P. **Zoneamento fito ecológico da Estação Ecológica de Aiuaba- uma contribuição ambiental e à pesquisa científica**, UFC, 2004.

MEDEIROS, J. R.; CAMPOS, L.B.; MENDONÇA, S.C.; DAVIN, L.B.; LEWIS, N.G. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the azones, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. **Phytochemistry**. v.64, p.561-565, 2003.

MENEZES, H. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v.72, p.1-64, 2005.

MERCHANT, J. L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines in gastrointestinal homeostasis and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.6-12, 2007.

MERCIER,B.;PROST,M. The essential oil of tupertine and its major volatile fraction ( $\alpha$  e  $\beta$  pinenes): a review. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v.22,p.331-342,2009.

MINCIS, M.; CHEBLI, J.M.F.; KHOURI, S.T.; MINCIS, R.Etanol e o Trato Gastrintestinal. **Arq. Gastroenterol**, v.32, p.131-139, 1995.

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal Pharmacology**, v.44(1),p.43-50,1987.

MOHAMED, I.E.; BUSHRA, E.; NUR, E.E.; CHOUDHARY, MUHAMMAD I, KHAN, S.N. Bioactive Natural products from two sudnese medicinal plants diospyros mespiliformis and Croton zambesicus. **Rec. Nat. Prod**, v3, n.4,p 198-203,2009.

MILLER,M.J.S.;MACNAUGHTON.;W.K.;ZHANG,X.J.;THOMPSON,J.H.;CHARBONNE T,R.M.;BOBROWSKI,P.;LAO,J.;TRENTACOSTI,A.M.;SANDOVAL,M.**Am.J.Physiol.Gastroint. Liver. Physiol**, v.279,p.G192,2000.

MONTANARI, J. I. **Aspectos da Produção Comercial de Plantas Mediciniais nativas**. Campinas /Brasil: CPQBA-Unicamp.2002

MORAIS, T.C.; PINTO, N.B.; CARVALHO, K.M.; RIOS, J.B., RICARDO, N.M.P.S .; TREVISAN, M.T.S.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Protective effect of anacardic acids from cashew *Anacardium occidentale* on ethanol induced gastric damage in mice. **Chemico-biological Interactions**, v.183, n.1, p.264-269, 2010.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO. **Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos**. Fortaleza: Ed UECE, 2007.

MORAIS,S.M.;JÚNIOR,F.E.A.C.;SILVA,A.R.A.;NETO,J.S.M. Atividade antioxidante dos óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil.**Química Nova**, v.29, n.5,p.907-910,2006.

MOTA, K. S. D et al. Flavonoids with gastroprotective activity molecules (S.I), v.14, n.3, p.979-2012, 2008.

MOTEKI,H.;HIBASAMI,H.;YAMADA,Y.;KATSUZAKI,H.;IMAI,K.;KOMIYA,T. Specific induction of apoptosis by 1,8 cineole in two human leukemia cells linells, but not a in human stomach cancer cell line. **Oncology Letters**, v.9,p.757-760,2002.

MUSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal Clinical Investigation**, v.35, n.8, p.469-475, 2005.

MUSUNBA, C.;PRITCHARD,D.;PIRMOHAMED,M.Review article: cellular e molecular mechanisms of NSAID- induced peptic ulcers . **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, v.30, n.6, p.517-531, 2009.

NAJM, W. I. Peptic ulcer disease. **Primary care**, v.38, p.383-394, 2011.

NARUMI, Y. A. S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. **Journal of Molecular Medicine**, v.87, n.10, p.1015-1022,2009.



NASCIMENTO,G.G.F.;LUCATELLI,J.;FREITAS,P.C.;SILVA,G.L.;Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. **Braz J.Microbiol**, v.31,p.247-256,2000.

NCCLS. National Comitee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: Approved standard,6<sup>th</sup> ed. NCCLS document M7-A6. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards,2008.

NEGRI, M. L. S. **Secagem das folhas de Espinheira Santa – Maytenus ilicifolia Mart . ex Reiss sob diferentes temperaturas e influências nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos**, 2f, 2007.

NEVES,A.;ROSA,S.;GONÇALVES,J.;RUFINO,A.;JUDAS,F.;SALGUEIRO,L.;LOPES,M.C .;CAVALEIRO,C.;MENDES,A.F.Screening of Five essential oils identification of potential inhibitors of IL-1- induced Nf KappaB activation and NO production in human chondrocytes:characterization of the inhibitory activity of alpha-pinene.**Planta Médica**, v.76, p.303-308,2010.

NICOLSON,K.;EVANS,G.;O TOOLE,P.W.Potential of methicilin activity against methicilin resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes.**FEMS Microbiol.Lett**, v.179,p.233-239,1999.

NIKAIDO,H.Molecular basics of bacterial outer membrane permeability revisited **Microbiol Mol Biol Rev**, v.4, pp. 593–656,2003.

NILIUS,B.;DROOGMANS,G.Ion channels and their functional role in vascular endothelium. **Physiol Rev**, v.81,p.1415-1459,2001.

OATES,J.M;HAKKINEN,J.P.Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats.**Gastroenterology**, v.94, p.10-21,1988.

OKE,F.;ASLIM,B.;OZTURK,S.;ALTUNDAG,S. Essential oil composition, antimicrobiaand antioxidant activities of *Satuneja cuneifolia* Ten.**Food Chemistry**, v.112,n.4,p.874-879,2009.

OLINDA, T. M.; LEMOS, T. L. G.; MACHADO, L. L.; RAO, V. S.; SANTOS.; F. A. Quebrachitol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: Role of prostaglandins, nitric oxide and K<sup>+</sup> ATP channels. **Phytomedicine**, v.15, p.327-333, 2008.

OLIVEIRA, A.C., LEAL-CARDOSO, J.H., SANTOS, C.F., MORAIS, S.M., COELHO DE SOUZA, A.N ., Antonociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Journal Of Medical And Biological Research**, v.34, n.11,p.1411-1474.,2001.

OLIVEIRA,J.F.P.;CIPULLO,J.P.;BURDMANN,E.A.;Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos **Brazilian J. of Cardiovascular surger**, v.21,n.4,p.444-452,2006.

OLIVEIRA, C.J.; ARAÚJO, T.L. Plantas medicinais: usos e crenças dos idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.9, n.1, p. 93-105, 2007.

OLIVEIRA, G. L. **Etnobotânica nordestina: Plantas medicinais da comunidade muribeca**, Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), 3f, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2007.

OLIVEIRA, L. S. T.; CUNHA & SILVA, S. L.; TAVARES, D. C.; SANTOS, A. V. S.; OLIVEIRA, G. C. B. Uso de plantas medicinais no tratamento de animais. **Enciclopedia Biosfera**. Goiânia, v.5, n.8, 2009.

OLIVEIRA, R.B; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S.A.P. Intoxicações com espécies da família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, Brasil, v.5, n. 1, p.69-71, jul., 2007.

OMAHONY,R.;ALKHTHEERI,H.;WEERASEKERA,D.;FERNANDO,N.;VAIRA,D.;HOLT ON,J. Bactericidal and anti-adhesive proprieties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **World Journal of Gastroenterology**, v.11,p.7499-7507, 2005.

PAULA ACBD, TOMA W, GRACIOSO JDS, HIRUMA-LIMA CA, CARNEIRO EM, SOUZA BRITO A. The gastroprotective effect of the essential oil of Croton cajucara is different in normal rats than in malnourished rats. **British journal of nutrition** 2006, 96(02):310-315.

PASA, M. C.; BASTOS, E. A. S. **A etnobiologia no fragmento florestal Recanto do Sol, Campo Verde, MT**. In: Santos, Jeater W. M. C. (Org). Produção do espaço e transformações socioambientais das paisagens do Mato Grosso. Edufimt. p: 71 – 94. 2010.

PEANA,A.T.;DAQUILA,P.S.;CHESSA,M.L.;MORETTI,M.D.L.;SERRA,G.;PIPIIA,P.(-) Linalool produces antinocicepcion in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v.460,p.37-41,2003.

PEREZ- ZOGHBI, J. F.; MAYORA, A.; RUIZ, M. C.; MICHELANGELI, F. Heterogeneity of acid ecretion induced by carbachol and histamine along the gastric gland axis and its relationship to (ca<sup>2+</sup>) i. **American Journal of Physiology- Gastrintestinal and Liver Physiology**, v.295.n.4, p. G671-G681, 2008.

PERTINO,M.;SCHMEDAHIRSCHMANN,G.;RODRIGUES,J.A.;THEODULOZ,C.Gastropr oteective effect and citotoxicity of terpenes from the Paraguayan Crude "Yagua Rova" (*Jatropha isabelli*). **Journal of Ethnopharmacology**, v.111,p.553-559,2007.

PESKAR, B. M.; HOPPE, U.; LANGE, K.; PESKAR, B. Effects of non steroidal anti-inflammatory drug\_on rat gastric mucosal lekotriene C4 and prostanoid release : relation to ethanol-induced injury. **British Journal of Pharmacology**, v.93, n.4,p.937-943, 2002.

PIMENTEL, J. V. F. **Caatinga e Manejo agnossilvipastoril**. In: ANDRADE, E; PEREIRA, O.; DANTAS, E. Semi- árido e o manejo dos recursos naturais: uma proposta de uso adequado do capital natural. Fortaleza, CE. p. 106-132, 2010.

PINHO,F.V.S.A.;COELHO DE SOUZA,A.N.;MORAIS,S.M.;SANTOS,C.F.;LEAL-CARDOSO,J.H.**Phytomedicine**, v.12,p.482-486,2005.

POSSENTI, A. *et al.* Efeito de fermentado (utilizado como alimento funcional) sobre: a citoproteção gástrica , atividade antsecretória e a motilidade intestinal em animais. **International Journal of Nutrology**, v.5, n.1, p. 35-41, 2012.

POTRICH, F. B. **Atividade Gastroprotetora do Extrato Bruto Hidroalcoólico da *Achilleamillefolium* L.: Envolvimento do Sistema Antioxidante.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PRADO, D. E. **As Caatingas d América do Sul.** In: LEAL, I.R., TABERELLI, M., SILVA, J.M.C ( Eds). Ecologia e conservação da Caatinga. Ed. Universitária da Universidade Federal do Pernambuco. Cap. 1.3-p.73, 2003.

PUSZTAI, R.; FERREIRA, M.J.; DUARTE, N.; ENGI, H.; MOLNAR, J. Macrocyclic lathynane diterpenes as antitumor phomoters. **Anticancer Res**, v.27, n.1A, p.201-205, Jan-Fev, 2007.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga.** Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, p.467, 2009.

RAHGOZAR, M.; PAZOKITOROUDI, H.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGUIRI, B. Diazoxide, a KATP opener, accelerates restitution of ethanol or indomethacin-induced gastric ulceration in rats independent of polyamines. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.16, n.3, p.290-296,2001.

RAMOS,J.M.O.;SANTOS,C.A.;SANTANA,D.G.;SANTOS,D.A.;ALVES,P.B.;THOMAZZI, S.M.Chemical constituentsand potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*.**Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.4, p.644-650,2013.

RANDAU,K.P.;FLORÊNCIO,D.C.;FERREIRA,C.P.;XAVIER,A.S. Estudo Farmacognóstico De *Croton rhamnifolius* e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm ( Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v.14,n.2,p.89-96,2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier.p.385-390, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J.M.Analgesic drugs.**Pharmacology**, p.579-603,1999.

RAO, C. H. V.; OJHA, S. K.; RADHAKRISHNAN, K.; GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Antiulcer activity of *Utleria salicifolia* rhizome extract. **Journal Ethnopharmacology**, v.91, n.2/3,p.243-249, 2004.

RAO,V.S.;GURGEL,L.A.;LIMAJUNIOR,R.C.P.;MARTINS,D.T.O.;CECHINELFILHO,V.; SANTOS,F.A.Dragons Blood from *Croton Urucurana* ( Bail) attenuates visceral nociception in mice.**Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p.357-360, 2007.

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

REPETTO, M.G.; LLESUY,S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers natural antiulcerogenic antioxidant compounds. **Journal of medical and Biological Research**, v.35,p. 523-534, 2002.

RIELLA,K.R.;MARINHO,P.R.;SANTOS,J.S.;PEREIRAFILHO,R.N.;CARDOSO,J.G.;ALB UQUERQUE JUNIOR,R.L.C.;THOMAZZI,S.M. **Antiinflammatory and cicatrizing**

**activities** of thymol a monoterpenoide of the essential oil from *Lippia gracilis* in rodents. **J. Ethnopharmacol**, v.143,p.656-663,2012.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl,NaOH,hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v.77, p.433,1979.

ROBERT,L.J.;MORROW,J.D.Analgesic antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In:HARDMAN,J.G.;LIMBIRD,L.E.;GILMAN,A.G.; Editores Goodman and Gilman. **The Pharmacological Basics of Therapeutics**, 10 ed,New York,p.687-731,2001.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **The world medicines situation 2011- Tradicional medicines: global situation, issues and challenges**. 3. Ed., Genova: World Health Organization. p.14, 2011.

ROCHA, N.F.M.; OLIVEIRA, G.V.; ARAÚJO, F.Y.R.; RIOS, .R.V.; CARVALHO, A.M.R.; VASCONCELOS, L.F.;MACÊDO, D.S .; SOARES, P.M.G.; DE SOUSA, D.P.;SOUSA, F.C.F. ( -)  $\alpha$  bisabolol induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation , superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, p.455-461, 2011.

RODRIGUES, F.F.G., COSTA, J.G.M. COUTINHO, H.D.M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton Zehntneri* . *Phytomedicine international. Journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 16. P. 1052-1055, 2009.

ROSA, M. D. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZU, H.R.; RODRIGUES, I.D.H.; SOARES, R.M.A.; SOUTO-PADRÓN, T. Antileishmanial activity of a linalool- rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47 (6), 1895- 1901, 2003.

ROZZA,A.L.;MORAES,T.M.;KUSHIMA,H.;NUNES,D.S.;HIRUMALIMA,C.A.;PELLIZO N,C.H.Involvement of glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide,vasoactive intestinal peptide, and heat-shock protein 70 in the gastroprotective mechanism of *Croton cajucara* Benth.(Euphorbiaceae) essential oil. *J.Med. Food*, v.14,p.1011-1017,2011.

ROZZA,A.L.;PELLIZON,C.H. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer healing activities. **Fundamental e Clinical Pharmacology**, p.51-63,2012.

SAFAEI-GHOMI, J. AHD, A. A.; Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largi* intertexta. **Pharmacogn Mag**,v.6, p.172-175, 2010.

SALATINO, A., SALATINO, M.L.F., NEGRI, G.Tradicional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18, n.1,p.11-33., 2007.

SANTOS,F.A.;SILVA,R.M.;CAMPOS,A.R.;DEARAÚJO,R.P.;LIMAJÚNIOR,R.C.P.;RAO, V.S.N.1,8 cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-Colitis. **Food Chemistry and Toxicology**, v.42, p.579-584,2004.

SANTOS,F.A.;RAO,V.S,N.Inflammatory edema induced by 1,8 cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds. **Phytomedicine**, v.5, n.2, p.115-119,1998.

SANTOS,F.A.;RAO,V.S.N.1,8 cineol, a Food Flavoring Agent Prevents Ethanol induced Gastric injury in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v.46, n.2,p.331-337,2001.

SANTOS,F.A.;RAO,V.S.N. Antiinflammatory and Antinociceptive effects of 1,8 cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oil.**Phytotherapy Reserch**, v.14, n.2,p.240-244,2000.

SANTOS,F.A.;JEFERSON,F.A.;SANTOS,C.C.;SILVEIRA,E.R.;RAO,V.S.N.Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**, v.77,n.23,p.2953-2963,october,2005.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A Família Euphorbiaceae nas Caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, cap 22,p 99-119, 2008.

SCHEMEDA-HIRSCHMANN. G, YESILADA, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. **Journal Ethnopharmacology** v.100, p.61-66, 2005.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.26, n.6, p.598, 2010.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842 – 1860, 2008.

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

SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas**. São Paulo: Sarvier, p. 76-98, 1979.

SCHELZ,Z.M.J.;HOHMANN,J.Antimicrobial and antiplasmid activies of essential oils.Fitoterapia, v.77, p.279-285,2006.

SHLAMOVITZ, G.Z., GUPTA, M. DIAZ, J.A. A case of acute Keratoconjunctivitis from exposure to latex of *Euphorbia tirucalli*. **J. Emerg. Med**, v.36, n.3. p. 239-241, 2009.

SIKKEMA,J.;BONT,J.A.M.;POOLMAN,B.Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269,p.8022-8028,1994.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, p.687-719, 2010.

SILVA,M.I.G.;MOURA,B.A.;NETO,M.R.A.;TOME,A.R.;ROCHA,N.F.M.;CARVALHO,A.M.R.;MACEDO,D.S.;VASCONCELOS,S.M.M.;SOUSA,D.P.;VIANA,G.S.B.;SOUSA,F.C.F. . Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action.**Nauryn-Schimied Arch Pharmacol**, v.380, p.233-245,2008.

SIQUEIRA,R.J.;MAGALHÃES,P.J.C.;LEAL-CARDOSO,J.H.;DUARTE,G.P.;LAHLOU,S. cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents anethole and estragole in normotensive conscious rats.**Life Sciences**,v.78,p.2365-2372,2006.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J.; KLEIN, R.M. **Flora Ilustrada Catarinense planejada e editada por Raulino Reitz: Euphorbiáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988.

STAMATIS,G.;KYRIAZOPOULOS,P.;GOLEGOU,S.;BASAYIANNIS,A.SKALTSAS,S.;SKALTSAS,H.In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, p.175-179,2003.

SOUZA, M. D.; FERNANDES, R. P.; PASA, M. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá-MT. **Revista Biodiversidade**, v. 9, n. 1, p. 91-100, 2010.

SOUSA,E.O.;BARRETO,F.S.;RODRIGUES,F.F.G.;COSTA,J.G.M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* Linn e *Lantana montevidensis* Briq na resistência aos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.67,p.845-851,2011.

SOUSA, E.O., ALMEIDA, T.S., MENEZES, I.R.A., RODRIGUES, F.F.G., CAMPOS, A.R., LIMA, S.G., DA COSTA, J.G.M.Chemical Composition of Essential Oil of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) and Synergistic Effect of the Aminoglycosides Gentamicin and Amikacin. **Records of Natural Products**, v. 6, p.144-150, 2012.

SOUZA, M.A.A., SOUZA, S.R., VEIJA JR, V.F. CORTEZ, J. K.P.C., LEAL, R.D.S., DANTAS, T.N.C. Composição química do óleo fixo de Croton cajucara e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 16 ( supl), 599-610, 2006.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; SOUZA JUNIOR, A. H.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. Antimicrobial activity of Hyptis ovalifolia towards dermatophytes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98,p.963-965,2003.

STERNINI,C.;PATIERNO,S.;SELMER,I.S.;KIRCHGESSNER,A.The opioid system in the gastrointestinal tract. **Neurogastroenterology e Motility**, v.16,p.3-16,2004.

STANDEN,N.B.;QUAYLE,J.M.K.Channel modulation in arterial smooth muscle.**Acta physiol Scand**, v.164,p.549-557,1998.

SUAREZ,A.I.;COMPAGNONE,R.S.;SALAZAR BOOKAMAN,M.M.;TILLET,S.;DELLE MONACHE,F.;DI GIULIO,C.;BRUGES,G.;**J.Ethnopharmacol**, v.88,p.11,2003.

SUGAMOTO, S.; KAWAUCH, S.; FURUKAWA, O.; MIMAKI, H.; TAKEUCHI, K. role of endogenous nitric oxide and prostaglandin in duodenal bicarbonate e response induced by mucosal acidification in rats. **Digestive diseases and sciences**, v.46, n.6, p.1208-1216, 2001.

SUNG, J.; KUIPERS, E.; EL-SERAG, H. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.29, n.9, p.938-946,2009.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHINOOR, J.; HOMAN, H.D., BRADFORD, J.C. A quantitative method for assessing the extent of experimental erosions and ulcers. **Journal Pharmacology Methods**, v.13, n.1, p. 59-66, 1985.

SZABO, S.; TRIER, J.S.;PIHAN, G.; RAZA, A.; MULLEN, E.A.; HAUSCHKA, P.V. Multiple mechanisms of cell injury in the gastric mucosa. **Fed. Proc.**, v.46, p.1152, 1987.

TABARELLI, M., SILVA, J.M.C. **Áreas e ações prioritárias para conservação da Biodiversidade da Caatinga.** In: Ecologia e conservação da Caatinga. Ed. Universitária da Universidade Federal do Pernambuco. Cap. 20-p.777-796, 2003.

TCDER-UNAL,M;CAN,F.;DEMIRBILEK,M.;KARABAY,G.,TUFAN,H.;ARSLAN, H. The bactericidal and morfological effects of peroxyntirite on *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.13,p.42-48., 2008.

TAKAYAMA,C.,DE FARIA,F.M.;DE ALMEIDA,A.C et al.Gastroprotective and of ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam.(lamiaceae). **J.Ethnopharmacol**, v.135,p.147-155,2011.

TAKARADA,K.;KIMIZUKA,R.;TAKAHASHI,N.;HONA,K.;OKUDA,K.;KATO,K.A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens oral. **Oral Microbiol Immunol**, v.1,p.61-64,2004.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A. Molecular mechanisms of ephitelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and sesophageal ulcers. **Current Meicinal Chemistry**, 19 ( 1), p.16-27, 2012.

TZAKOU, O.; SKALTSA, H. Composition and bacterial activity of the essential oil Satuneja parnassica subsp parnassica. **Planta Med.**, v.69, p.282, 2003.

UNEYAMA, H.; NIIJIMA, A.; KITAMURA, A.; TORII, K. Existence of NO- triggered vagal afferent activation in the rat gastric mucosa. **Life Sciences**, v.85, n.23, p. 782-787, 2009.

VALEZI, A. C. **Bases Anatômicas**, In: GARRIDO, J.A.B. Cirurgia da obesidade. São Paulo, Atheneu, 2002.

VALLEJO,J.C.;SILVA,M.N.;OLIVEIRA,J.A.A.;CARNEIRO,J.J.;ROCHA,L.S.O.;FIGUEIR EDO,J.F.G.;CHIOSI,M.F.V. Detecção precose de ototoxicidade usando emissões otoacústicas produtivas de disfunção. **Revista Brasileira de Otorrinolaringoscopia**,v.67,n.6,p.845-851,2001.

VERAS, H.N.H., CAMPOS, A.R., RODRIGUES, F.F.G., BOTELHO, M.A., COUTINHO, H.D.M., MENEZES, I.R.A., DA COSTA, J.G.M. Enhancement of the antibiotic activity of erythromycin by volatile compounds of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown against *Staphylococcus aureus*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, p.334-337,2011.

VERAS, H.N.H., RODRIGUES, F.F.G., BOTELHO, M.A., MENEZES, I.R.A., COUTINHO, H.D.M., COSTA, J.G.M.Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.

WAGNER, K. H. Biological relevance of terpenoids overview focusing on mono, di and tetraterpenes. **Annais of Nutrition e Metabolism**, v. 47, p.95-106, 2003.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHTW.; REUTER, B. K.; VERGNOLLE, N. NSAID- induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2, **Gastroenterology**, v.119, p. 706-714, 2000.

WALSH, J.H.; PETERSON, W.L. The treatment of helicobacter pylori infection in the management of peptic ulcer disease. **The New England Journal of Medicine**, p.984-991, 1995.

WANG, Y.C.; HUANG, T.L. Screening of anti-Helicobacter pylori herbs deriving from taiwanese folk medicinae plants. **FEMS immunology and Medical Microbiology**, v.43, p.295-300, 2005.

WANG, Y.C.; HUANG, T-. Anti helicobacter pylori activity of Plumbago zeylanica L. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, p.407-412, 2005.

WARZECHA, Z.; DEMBINSKI, A.; CERANOWICK, P.; DEMBINSKI, M.; CIESZKOWSKI, J.; KOWNACKI, P.; KONTUREK, P.C. Role of sensory nerves in gastroprotective effect of anandamine in rats. **J. Physiol Pharmacol**, v.62, n.2, p.207-217, 2011.

WEBSTER, G. L. Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 81 (1), p. 1-144, 1994.

WENQIANG, G.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, V.; YAFENG, H. Comparison of composition and antifungal activity of Artemisia argyi Levl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hidrodestilation and supercritical carbon dioxide. **Nat Prod Res**, v.20, p.992-998, 2006.

YAO, X. FORTE, J.G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. **Annurey Physiol**. v.65, p. 103, 2003.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p.1, 2001.

ZINKIEVICH, J. M.; GEORGE, S.; JHA, S.; NANDI, J.; LEVINE, R. A. Gastric acid is the key modulator in the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced ulceration in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Psysiology**, v.37, p.654-661, 2010.



# APÊNDICE

---

## APÊNDICE A: Tabelas de resultados sobre os testes antiulcerogênicos com dados dos percentuais da área ulcerada e de redução de lesão gástrica.

**Tabela:** Efeito do OEC no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto.

GRUPO	DOSE ( mg/Kg)	% DE ÁREA LESIONADA	% DE INIBIÇÃO
Salina	-	16,55 ± 2,014	-
Omeprazol	30 mg/Kg	12,50 ± 1,23	24,48%
OEC	100 mg/Kg	10,54 ± 0,76 *	36,32%
OEC	200 mg/Kg	10,46 ± 1,63 *	36,80%
OEC	400 mg/Kg	8,99 ± 0,57 **	45,68%

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para seis animais/grupo. Salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.), Omeprazol (30 mg/ Kg v.o. ) ou OEC (100, 200 e 400 mg/Kg v.o.) foram administrados por via oral 1 hora antes da administração de etanol absoluto ( 0,2 mL/ v.o.). Decorridos 30 minutos após a administração do etanol os animais foram sacrificados. \* p< 0,05 ; \*\* p< 0,01 *versus* salina, avaliados pela Análise de Variância ( ANOVA).

**Tabela:** Efeito do OEC no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado.

GRUPO	DOSE ( mg/Kg)	% DE ÁREA LESIONADA	% DE INIBIÇÃO
Salina	-	23,85 ± 1,94	-
Omeprazol	30 mg/Kg	16,18 ± 1,54**	32,16%
OEC	100 mg/Kg	16,51 ± 0,89 **	30,78%
OEC	200 mg/Kg	14,76 ± 0,86 ***	38,12%
OEC	400 mg/Kg	17,91 ± 1,54 *	24,91%

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para seis animais/grupo. Salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.), Omeprazol (30 mg/ Kg v.o. ) ou OEC (100, 200 e 400 mg/Kg v.o.) foram administrados por via oral 1 hora antes da administração de etanol acidificado ( 0,2 mL/ v.o.). Decorridos 30 minutos após a administração do etanol os animais foram sacrificados. \* p< 0,05 ; \*\* p< 0,01 e \*\*\* p < 0,001 *versus* salina, avaliados pela Análise de Variância ( ANOVA).

**Tabela:** Efeito do OEC no modelo de lesão gástrica induzida por Indometacina .

GRUPO	DOSE ( mg/Kg)	% DE ÁREA LESIONADA	% DE INIBIÇÃO
Salina	-	5,14 ± 0,14	-
Omeprazol	30 mg/Kg	2,85 ± 0,40***	55,44 %
OEC	100 mg/Kg	4,71 ± 0,18***	7,78 %
OEC	200 mg/Kg	4,71 ± 0,18***	7,78 %
OEC	400 mg/Kg	3,85 ± 0,26**	25,09 %

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para seis animais/grupo. Salina (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.), Omeprazol (30 mg/ Kg v.o. ) ou OEC (100, 200 e 400 mg/Kg v.o.) foram administrados por via oral 1 hora antes da administração de indometacina ( 10mg/kg v.o.). Decorridos 6 horas após a administração da indometacina ( 10mg/kg v.o.) os animais foram sacrificados. \* p< 0,05 ; \*\* p< 0,01 e \*\*\* p < 0,001 *versus* salina, avaliados pela Análise de Variância ( ANOVA).

**Tabela:** Efeito do teste de barreira física ao avaliar a administração intraperitoneal em relação a oral do OEC sobre as lesões induzidas por etanol acidificado em camundongos.

GRUPO	DOSE ( mg/Kg)	% DE ÁREA LESIONADA	% DE INIBIÇÃO
SALINA	-	37,89 ± 4,30	-
OEC	200 mg/Kg V.O.	23,60 ± 2,66 *	62,28%
OEC	200 mg/Kg V.I.P.	23,29 ± 3,38 *	61,46 %

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para seis animais/grupo. Salina (1% de Tween 80 em solução salina 0,9% 0,1 mL/10g, v.o.) OEC (200 mg/Kg v.o.) ou OEC ( 200 mg/Kg v.i.p.) foram administrados 1 hora ou 30 minutos antes da administração de etanol acidificado ( 0,2 mL/ animal v.o.) Decorridos 30 minutos após a administração do etanol os animais foram sacrificados. \* p<0,05 versus salina, avaliados pela Análise de Variância ( ANOVA).

**Tabela:** Efeito do pré-tratamento com L-NAME na gastroproteção promovida pelo OEC.

GRUPO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	DOSE (mg/Kg)	% ÁREA LESIONADA	% DE VARIAÇÃO DA ÁREA LESIONADA
CONTROLE NEGATIVO	v.o.	-	20,16± 2,08	-
OEC	v.o.	100	9,60 ± 0,27 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	52,29%
L- ARGININA	i.p.	600	12,87 ± 1,53	36,17%
L-NAME/L- ARGININA	i.p./i.p.	20/600	27,56 ± 4,43 <sup>b/c</sup> <sub>3 2</sub>	-36,70%
L-NAME/OEC	i.p./v.o.	20/100	15,81 ± 2,31 <sup>d</sup> <sub>1</sub>	21,57%

Os valores representam a média ± E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo). <sup>a</sup> p<0,05 versus controle negativo; <sup>b3</sup> p<0,001 versus OEC 200mg/Kg, <sup>c2</sup> p<0,01; <sup>d1</sup> p<0,05. ( ANOVA e Teste de Tukey).

**Tabela:** Efeito do pré-tratamento com Glibenclamida na gastroproteção promovida pelo OEC.

GRUPO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	DOSE (mg/Kg)	% ÁREA LESIONADA	% DE VARIAÇÃO DA ÁREA LESIONADA
CONTROLE NEGATIVO	v.o.	-	33,42 ± 0,57	-
OEC	v.o.	200	9,63 ±0,28 <sup>a</sup> <sub>4</sub>	71,18%
DIAZÓXIDO	i.p.	3	14,56± 1,26 <sup>a/b</sup> <sub>4 2</sub>	56,43%
GLIBENCLAMIDA/ DIAZÓXIDO	i.p./i.p.	5/3	34,16 ± 1,10 <sup>a/b/c</sup> <sub>4 4</sub>	2,21%
GLIBENCLAMIDA/ OEC	i.p./v.o.	5/200	13,27± 0,48 <sup>b1</sup> <sub>d4</sub>	60,29%

Os valores representam a média ± E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo). <sup>a4</sup> p<0,0001 versus controle negativo; <sup>b1</sup> p<0,05 versus OEC 200mg/Kg; <sup>b2</sup> p<0,01 versus OEC 200mg/Kg, <sup>c4</sup> p<0,0001 versus diazóxido; <sup>d4</sup> p<0,0001 versus glibenclamida/diazóxido. ( ANOVA e Teste de Tukey).

**Tabela:** Efeito do pré-tratamento com iombina na gastroproteção promovida pelo OEC

GRUPO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	DOSE (mg/Kg)	% ÁREA LESIONADA	% DE VARIAÇÃO DA ÁREA LESIONADA
CONTROLE NEGATIVO	v.o.	-	34,67 ± 0,85	-
OEC	v.o.	200	22,38 ± 2,24 <sup>a</sup> <sub>2</sub>	35,45%
CLONIDINA	v.o.	0,05	21,54 ± 1,56 <sup>a</sup> <sub>2</sub>	37,88%
IOMBINA/CLONIDINA	i.p./v.o.	2 / 0,05	22,48 ± 2,38 <sup>a</sup> <sub>2</sub>	35,17%
IOMBINA/OEC	i.p./v.o.	2 / 200	22,09 ± 3,09 <sup>a</sup> <sub>2</sub>	36,28%

Os valores representam a média ± E.P.M da percentagem de área gástrica ulcerada ( n= 6 animais por grupo). <sup>a</sup><sub>2</sub> p < 0,01 *versus* controle negativo ( ANOVA e *Teste de Tukey*).

**Tabela:** Efeito do pré-tratamento com histamina na gastroproteção promovida pelo OEC.

GRUPO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	DOSE (mg/Kg)	% ÁREA LESIONADA	% DE VARIAÇÃO DA ÁREA LESIONADA
CONTROLE NEGATIVO	v.o.	-	32,25 ± 0,78	-
OEC	v.o.	200	9,06 ± 0,53 <sup>a</sup> <sub>4</sub>	71,90%
RANITIDINA	v.o.	40	14,19 ± 2,14 <sup>a</sup> <sub>4</sub>	56%
HISTAMINA/RANITIDINA	s.c/v.o.	2/40	23,89 ± 3,69 <sup>b,c</sup> <sub>3 1</sub>	25,92%
HISTAMINA/OEC	s.c/v.o.	2/200	10,97 ± 1,18 <sup>a,d</sup> <sub>4 2</sub>	34,01%

Os valores representam a média ± E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo). <sup>a</sup><sub>4</sub> p < 0,0001 *versus* controle negativo. <sup>b</sup><sub>3</sub> p < 0,001 *versus* OEC. <sup>c</sup><sub>1</sub> p < 0,05 *versus* Ranitidina. <sup>d</sup><sub>2</sub> p < 0,01 *versus* Histamina/ranitidina (ANOVA e *Teste de Tukey* ).

**Tabela:** Efeito do pré-tratamento com capsazepina na gastroproteção promovida pelo OEC.

GRUPO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	DOSE (mg/Kg)	% ÁREA LESIONADA	% DE VARIAÇÃO DA ÁREA LESIONADA
CONTROLE NEGATIVO	v.o.	-	32,60 ± 0,58	-
OEC	v.o.	200	7,30 ± 0,08 <sup>a</sup> <sub>4</sub>	22,39%
CAPSAICINA	i.p.	5	6,57 ± 0,51 <sup>a</sup> <sub>4</sub>	79,84%
CAPSAZEPINA/CAPSAICINA	i.p./i.p.	5/5	25,35 ± 1,25 <sup>a,b,c</sup> <sub>4, 4, 4</sub>	22,23%
CAPSAZEPINA/OEC	i.p./v.o.	5/100	5,94 ± 0,42 <sup>d4</sup>	81,77%

Os valores representam a média ± E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo). <sup>a</sup><sub>4</sub> p < 0,0001 *versus* controle negativo. <sup>b4</sup> p < 0,0001 *versus* OEC; <sup>c4</sup> p < 0,0001 *versus* capsaicina; <sup>d</sup><sub>4</sub> p < 0,0001 *versus* capsazepina/capsaicina (ANOVA e *Teste de Tukey*).

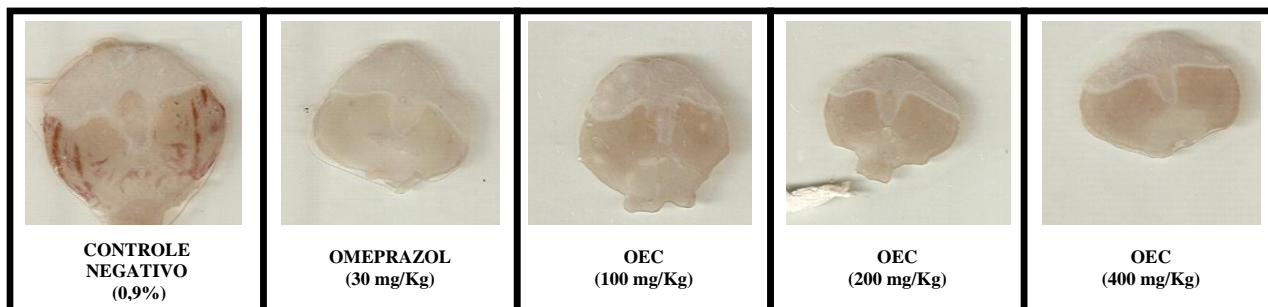
**Tabela:** Efeito do pré-tratamento com naloxona na gastroproteção promovida pelo OEC.

GRUPO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	DOSE (mg/Kg)	% ÁREA LESIONADA	% DE VARIAÇÃO DA ÁREA LESIONADA
CONTROLE NEGATIVO	v.o.	-	31,25 ± 0,78	-
OEC	v.o.	200	8,50 ± 0,26 <sup>a</sup> <sub>4</sub>	72,80%
MORFINA	S.C	5	8,24 ± 1,20 <sup>a</sup> <sub>4</sub>	73,63%
NALOXONA/MORFINA	s.c/i.p.	2/5	18,46 ± 0,62 <sup>a, b, c</sup> <sub>4, 4, 4</sub>	40,92%
NALOXONA/OEC	i.p./v.o.	2/200	23,40 ± 2,015 <sup>a3, b4, c4, d1</sup>	74,88%

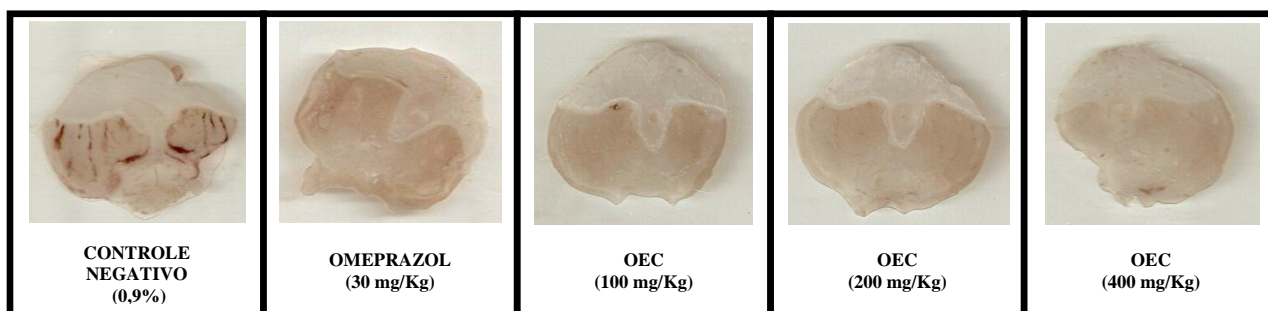
Os valores representam a média ± E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n= 6 animais por grupo). <sup>a</sup> <sub>4</sub>p < 0,0001 *versus* controle negativo. <sup>a3</sup> p < 0,001 *versus* salina; <sup>b4</sup> p < 0,0001 *versus* OEC; <sup>c4</sup> p < 0,0001 *versus* morfina; <sup>d</sup> <sub>1</sub>p < 0,01 *versus* naloxona/morfina (ANOVA e Teste de Tukey).

## APÊNDICE B: Figuras dos aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores.

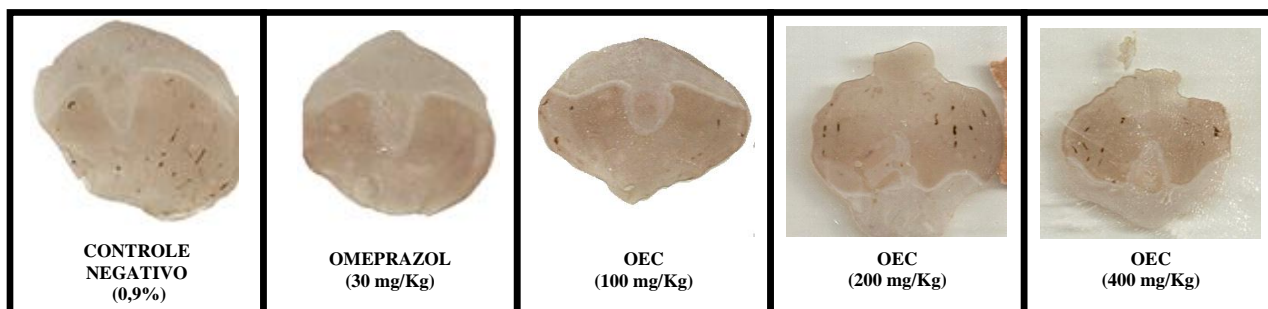
**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol <sup>abs.</sup>



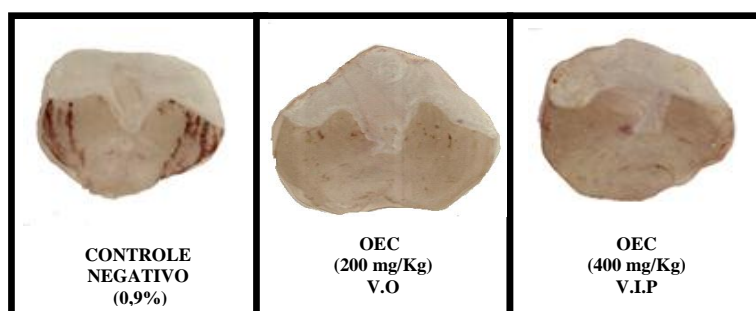
**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado.



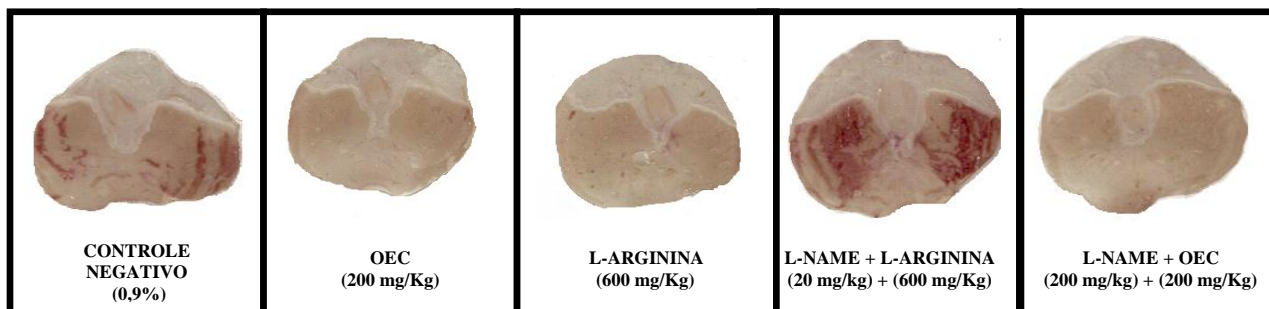
**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por indometacina.



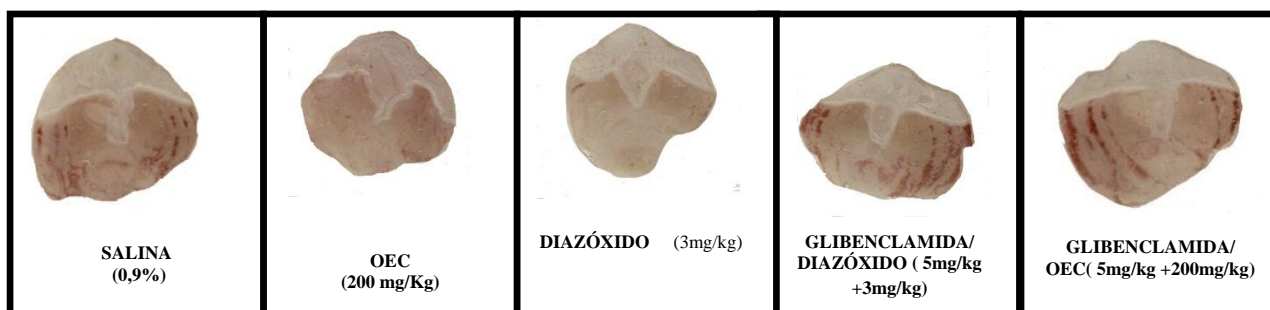
**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores no teste de barreira física.



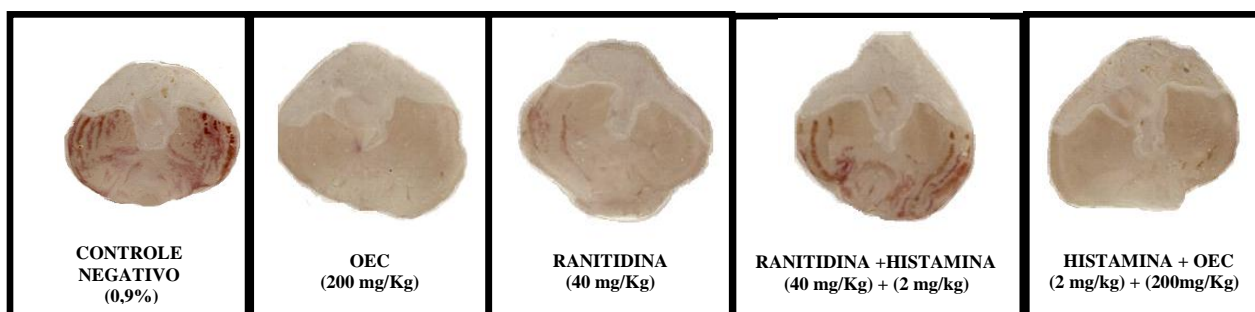
**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores no modelo de envolvimento do óxido nítrico (NO).



**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores no modelo de envolvimento dos canais de potássio.



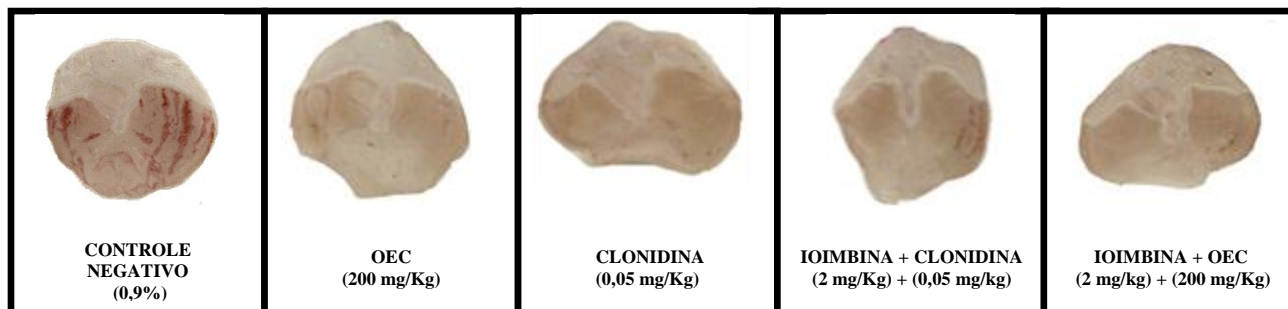
**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores no modelo de envolvimento dos receptores H<sub>2</sub>.



**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores no modelo de envolvimento dos neurônios sensíveis a capsaicina.



**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores no modelo de envolvimento dos receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ .



**Figura:** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos de roedores no modelo de envolvimento dos receptores opioides.

