UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PRPGP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E GASTROPROTETORA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Caryocar coriaceum* WITTM.

Luiz Jardelino de Lacerda Neto

CRATO – CE

2013

Luiz Jardelino de Lacerda Neto

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E GASTROPROTETORA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Caryocar coriaceum* WITTM.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como objetivo de obtenção do título de mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Co-orientadora: Profª Drª. Marta Regina Kerntopf

CRATO – CE

2013

Lacerda Neto, Luiz Jardelino de.
L131a Avaliação da atividade antibacteriana e gastroprotetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm/ Luiz Jardelino de Lacerda Neto. – Crato-CE, 2013.
105p.; il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA
Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Co-orientadora: Profª Drª. Marta Regina Kerntopf

1. Gastroproteção; 2. *Caryocar coriaceum; 3. A*ntioxidante; 4. Pequi; I. Título.

CDD: 615

Luiz Jardelino de Lacerda Neto

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E GASTROPROTETORA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Caryocar coriaceum* WITTM.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como objetivo de obtenção do título de mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2013.

Banca examinadora

_____

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

Universidade Regional do Cariri - URCA

_____

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Membro externo)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____

Profª. Drª. Marta Regina Kerntopf (Co-orientadora)

Universidade Regional do Cariri - URCA

_____

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Universidade Regional do Cariri – URCA

_____

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Suplente)

Universidade Regional do Cariri - URCA

Dedico aos meus pais, **João Pereira Leite** e **Maria do Socorro Lacerda**, aos meus irmãos**, Laerte Lacerda Leite** e **Lorraine Lacerda Leite** e em especial ao meu filho “fiote”, **Luiz Felipe da Silva Lacerda**.

Agradecimentos

À Deus, o Grande Arquiteto do Universo, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, obrigado Senhor por me dar forças quando precisei, por guiar e iluminar meus caminhos!

Aos meus pais, João Pereira Leite e Maria do Socorro Lacerda, que sempre nos incentivaram, meus irmãos e eu, nos estudos, realiando algumas vezes esforços gigantescos para nos proporcionar as melhores condições de vida e estudo. Muito obrigado.

A minha família adotiva cratence, meu primo José Rosieldo Figueiredo Silva, sua esposa Verônica Maria Figueiredo Lima e filhos.

A toda minha família, tios e primos, em especial ao meu tio José Gorete Pedroza de Lacerda, pela contribuição intelectual. Obrigado por se orgulharem dos meus estudos, essa vitória também é de vocês!

Aos meus segundos pais, Francisco Rolim Sobrinho e Barbara Fernandes Rolim, pelo apoio incondicional durante minha graduação na capital paraibana, passo fundamental e indispensável para essa conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Meneses, agradeço pela pessoa que és e tenho eterna gratidão pelos valiosos conhecimentos, dedicação, por saber elogiar e criticar do jeito e na hora certa e principalmente por ter acreditado em mim, sem ter conhecimento prévio sobre minha vida acadêmica. Obrigado por tudo!!!

A minha co-orientadora, Profª. Drª. Marta Regina Kerntopf, por ter se disponibilizado gentilmente a co-orientar este trabalho, contribuindo sempre com seus conhecimentos e grande incentivo. Obrigado!

Aos professores: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, pessoas muito importantes nesse trabalho, sou-lhes grato pela disponibilidade de sempre ajudar, pelo imenso auxílio e conhecimento transferido, pelo encorajamento e pela amizade! Muito agradecido !

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, coordenado pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa, pela catalogação da exsicata e identificação botânica da espécie em estudo.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Biosprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza e Profa. Dra Maria Arlene Pessoa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biosprospecção Molecular, em especial: prof. Dr. Álamo Feitosa Saraiva, prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Texeira, Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Júnior, Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, Profa. Dra Maria Arlene Pessoa, Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza, Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf, Profa. Dra. Imeuda Peixoto Furtado e Profa. Dra. Sirleis Rodrigues Lacerda, prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida, pelos conhecimentos transmitidos!

À Andreza Guedes Barbosa Ramos, sem a qual este trabalho teria sido bem mais árduo. Obrigado pelo apoio, carinho e atenção. Serei eternamente grato.

Aos infalíveis companheiros de bancada, Severino Denicio Gonçalves de Sousa, Thales Silva Coutinho e Valterlúcio dos Santos, por sempre estarem disponíveis na realização dos ensaios.

Ao amigo Erlânio Oliveira de Sousa, pela disponibilidade e prestatividade em momentos decisivos para a realização do trabalho. Muito obrigado.

Aos amigos do mestrado, Ana Luiza de Albuquerque Siebra, Anita Oliveira Brito Pereira, Cinara Soares Vidal, Daniele Oliveira de Souza, Diógenes de Queiroz Dias, Gerlânia Leite, Larrisa Rolim, Mário Eduardo Santos Cabral, Patrícia Figueiredo, Renata Sampaio e Sharlene Oliveira, por tornarem os momentos mais divertidos e pela amizade, pela ajuda. Obrigado.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, pelo companheirismo, experiências compartilhadas e palavras de conforto nos momentos difíceis que compartilhamos juntos;

À URCA e aos funcionários desta IES, que mantiveram o ambiente seguro e agradável.

Às secretárias Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, pela solicitude!

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de maneira significativa para a concretização desse estudo, meus sinceros agradecimentos.

Prefácio

Esta dissertação é soma de um laborioso rol de protocolos experimentais cujo planejamento foi muito bem arquitetado, com vistas na química e no estudo de eficácia e segurança de uma espécie regional e utilizada principalmente pelo povo caririense, o pequi (Caryocar coriaceum WITTM.).

A busca da comprovação experimental da ação gastroprotetora de uma planta que é de extrema importância tendo em vista que as doenças pépticas atingem cerca de 10% da população mundial, sendo uma doença ativa e que no Brasil existe um grande potencial para o mercado de fitoterápicos.

Considerada uma excelente dissertação de mestrado, que afirmativamente deverá ser utilizada como modelo (manual) para outras dissertações de mestrado e teses de doutorado neste e em outros programas de pós-graduação.

Parabéns

Marta Regina Kerntopf

Profª Drª. do PPGBM

Carinho e conhecimento: quanto mais se transmite, mais se tem.

Luiz Jardelino de Lacerda Neto

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E GASTROPROTETORA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Caryocar coriaceum* WITTM

Lacerda Neto, L.J.

Resumo

Este trabalho tem como objetivo verificar a atividade gastroprotetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar* coriaceum, já que as úlceras péptica apresentam-se como uma doença ativa que atinge cerca de 10 % da população mundial em algum momento da vida e cujo tratamento, atualmente, está baseado principalmente no controle da secreção ácida e combate a infecções por *Helicobacter pylori*, sendo o extrato hidroetanólico das folhas do *Caryocar coriaceum* (EHFCC), uma fonte de produto natural com possível potencial gastroprotetor a ser investigado, constituíndo o objetivo deste trabalho. Os polifenóis e flavonóides presentes neste extrato foram quantificados em 900,75 mg equivalentes de ácido gálico/ g de extrato e 89,68 mg equivalentes de quercetina/ g de extrato, respectivamente. O método determinação de DPPH, *in vitro*, que demonstra a capacidade de sequestro deste radical, demonstrou a atividade antioxidante do extrato, explicado pela presença de polifenóis e flavonóides. A atividade antibacteriana do EHFCC foi investigada pelo teste de difusão em sólidos, atividade esta confirmada e atribuída à presença dos flavonóides na amostra, não sendo evidenciada uma concentração inibitória mínima clinicamente significante, porém a atividade sinérgica em associação a antibióticos no teste de modulação, revelou sinergismo entre o EHFCC e benzilpenicilina frete à *Escherichia coli*. A comprovação da atividade gastroprotetora do EHFCC foi avaliada pelos métodos de indução de lesão gástrica por etanol, onde foi observado redução da área lesionada de 69,43 %, etanol acidificado (72,84%) e indometacina, todos com dose de 100 mg/Kg. Nos testes aplicados, objetivando conhecer o mecanismo de ação que promove a gastroproteção fornecida pelo EHFCC, ficou evidente o envolvimento de receptores opióides, α2-adrenérgicos, neurônios aferentes primários sensíveis a capsaicina, além da contribuição do NO e das prostaglandinas. A quantificação da produção de muco mostrou que o EHFCC influencia positivamente, aumentando assim sua produção e que a via de administração intraperitoneal levou a uma maior produção, provavelmente por tornar os compostos do extrato mais biodisponíveis quando comparados com a via oral. O teste de motilidade intestinal registrou uma diminuição na motilidade sob influência do EHFCC, resultado que indica mais uma contribuição para o seu efeito gastroprotetor. Os resultados do presente trabalho mostram o potencial biológico do EHFCC como ferramenta para o estudo da gastroproteção e no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos para o tratamento da úlcera péptica.

Palavras-chave: Gastroproteção, *Caryocar coriaceum,* antioxidante, pequi, antimicrobiana.

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND GASTROPROTECTIVE THE HYDROETHANOLIC EXTRACT LEAVES *CARYOCAR CORIACEUM* WITTM

Lacerda Neto, L. J.

Abstract

This study aims to determine the gastroprotective activity of hydroethanolic extract of the leaves of *Caryocar coriaceum* since peptic ulcers present themselves as an active disease that affects about 10% of the world population at some point in life and whose treatment currently control is based primarily on acid secretion and combating *Helicobacter pylori infections*, and the hydroethanolic extract from the leaves of *Caryocar coriaceum* (HELCC), a source of natural product with possible potential gastroprotective being investigated and is the objective of this work. The polyphenols and flavonoids present in this extract were quantified in 901.31 mg gallic acid equivalents / g of extract and 89,56 mg quercetin equivalents / g of extract, respectively. The determination of DPPH method, in vitro, demonstrating the ability of this radical scavenger, demonstrated the antioxidant activity of the extract, explained by the presence of polyphenols and flavonoids. The antibacterial activity was investigated by the HELCC diffusion test solids, this activity confirmed and attributed to the presence of flavonoids in the sample, not evidencing a minimum inhibitory concentration clinically significant, however synergistic activity in combination with antibiotics in the test modulation revealed synergism between HELCC and benzylpenicillin freight to *Escherichia coli*. The proof of the gastroprotective activity of HELCC was evaluated by the methods of inducing gastric injury by ethanol, which was observed reduction in lesion area of 69.43%, acidified ethanol (72.84%) and indomethacin, all with doses of 100 mg / kg In tests, aimed at identifying the mechanism of action that promotes gastroprotection provided by HELCC, it became apparent involvement of opioid receptors, α2-adrenergic, primary afferent neurons sensitive to capsaicin, besides the contribution of NO and prostaglandins. Quantification of mucus production showed that positively influences HELCC, thereby increasing its production and the intraperitoneal route of administration led to a higher production, probably by making the compounds of the extract were more bioavailable when compared with the oral route. The test of intestinal motility recorded a decrease in motility under the influence of HELCC, a result that indicates a further contribution to its gastroprotective effect. The results of this study show the potential biological HELCC as a tool for studying the development of gastroprotection and in herbal medicines for the treatment of peptic ulcer.

Keywords: Gastroprotection, *Caryocar coriaceum*, antioxidant, pequi, antibacterial.

Lista de figuras

Figura 1 - Regiões anatômicas do estômago. 24
Figura 2 - Esquematização das glândulas gástricas 26
Figura 3 - Fatores que influenciam o equilíbrio gástrico. 31
Figura 4 - Quadro de agentes etilógicos de úlcera péptica 32
Figura 5 – Quadro da composição do extrato das folhas de Caryocar coriaceum 37
Figura 6 - Exsicata depositada no herbário. 42
Figura 7 - Foto das placas de CCD com EHFCC, padrão de rutina e padrão de quercetina. ... 56
Figura 8 – Gráfico do efeito de EHFCC e omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. 61
Figura 9 – Gráfico do efeito de EHFCC e omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado em camundongos. 62
Figura 10 – Gráfico do efeito de EHFCC e omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina em camundongos. 64
Figura 11 – Gráfico do efeito de EHFCC administrado via oral e intraperitoneal no modelo de indução de lesão gástrica em camundongos. 65
Figura 12- Gráfico do efeito de EFHCC e omeprazol no modelo de indução de úlcera crônica por ácido acético. 66
Figura 13 - Fotografias dos cortes histológicos das lesões induzidas por ácido acético. 68
Figura 14 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com capsazepina na proteção gástrica promovida pelo EHFCC. 70
Figura 15 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com glibenclamida na gastroproteção promovida pelo EFHCC. 71
Figura 16 - Gráfico do efeito do pré-tratamento como L-NAME na gastroproteção promovida pelo EHFCC. 73
Figura 17 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com indometacina na gastroproteção promovida pelo EFHCC. 74
Figura 18 - Efeito do EHFCC e misoprostol sobre os níveis de muco no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol. 75
Figura 19 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com ioimbina na gastroproteção promovida pelo EFHCC. 77
Figura 20 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com histamina na gastroproteção promovida pelo EFHCC. 78
Figura 21 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com naloxona na gastroproteção promovida

pelo EFHCC. 79
Figura 22 - Gráfico do efeito da administração oral do EHFCC no deslocamento intestinal em camundongos. 81

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sistema de determinação de pontuação de lesão gástrica 49
Tabela 2 - Comparação dos Rf da CCD do EHFCC com os padrões de rutina e quercetina... 56
Tabela 3- Contração inibitória mínima (mg/mL) do EHFCC 58
Tabela 4 - Valores de concentração de inibição de crescimento dos antibióticos (µg/mL) frete à *S. aureus* 358 (SA358) 59
Tabela 5 - Valores de concentração de inibição de crescimento dos antibióticos (µg/mL) frente a *E. coli* 27 (EC27) 59

Lista de abreviatura, siglas e símbolos.

1L -1- interleucina 1

AA - ácido araquidônico

Ad libitum- à vontade

AINES - antiinflamatórios não esteroidais

$AlCl_3$ - cloreto de alumínio

AMP - monofosfato de adenosina

AMP_c - monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de variância, inglês)

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP- trifosfato de adenosina

BHI- *Brain Heart Infusion*

Ca^{2+}- íon cálcio

CCK2- colecistocinina 2

CE_{50-} - 50% da capacidade efetiva

CEUA- Comissão de Experimentação e Uso de Animais

CGRP- peptídeo associado ao gene de calcitonina

CIM- concentração inibitória mínima

CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência

cm^2- centímetro quadrado

COX 1- cicloxigenase-1

COX 2- cicloxigenase-2

COX 3- cicloxigenase-3

COX- cicloxigenase

CSE- cistationina gama-liase

DAG- diacilglicerol

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

E. coli- Escherichia coli

E1 – conformação inativa de bomba de prótons

E2– conformação ativa de bomba de prótons

EC27- *Escherichia coli* 27

ECE1- enzima conversora de endotelina 1

EHFCC- extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum*

ELC- células semelhantes à enterocromafins

eNOS- óxido nítrico sintetase endotelial

ERO_s- espécies reativas de oxigênio

FLONA-Floresta Nacional do Araripe-Apodi

GABA- ácido gama- aminobutírico

GC_s- guanilil ciclase solúvel

GMP_c- monofosfato cíclico de guanosina

GSH- glutationa reduzida

GSH-Px- glutationa peroxidase

GTP- guanosina trifosfato

h- hora

H,K-ATPase – Bomba de prótons

H. pylori- Helicobacter pylori

H^+ - íon hidrogênio

H2 – receptor para histamina tipo 2

H_2O_2- peróxido de hidrogênio

H_2S- ácido sulfídrico, sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico

H3- receptor para histamina tipo 3

HCl- ácido clorídrico

HIA- *Agar Heart Infusion*

HTS- *high-throughput triagem*

i.p- intraperitoneal

ICMBio- Instituto Chico Mendes de Biodiversidade

iNOS- óxido nítrico sintetase induzível

IP_3- inositol 1,4,5-trifosfato

K^+- íon potássio

KCNQ1 – Canal de potássio voltagem dependente da superfície apical de células oxínticas.

kg- quilograma

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

M- mol

M1- receptor muscarínico tipo 1

M2- receptor muscarínico tipo 2

M3- receptor muscarínico tipo 3

M4- receptor muscarínico tipo 4

mg- miligrama

MgATP – magnésio ATP

min- minuto

mL- mililitro

mm- milímetro

mM- milimolar

MT- melatonina

n- número

nm- nanômetro

nNOS- óxido nítrico sintetase neural

NO-óxido nítrico

NOS- óxido nítrico sintetase

ODC- ornitina descarboxilase

P.A- puro para análise

P2-ATPase – tipo da família enzimática

PDE5- fosfodiesterase 5

PGE2- prostaglandina-E2

PNA- peptídeo natriurético atrial

Rf – fator de retenção

rpm- rotações por minuto

S. aureus- *Staphylococus aureus*

s.c- subcutâneo

SA358- *Staphylococus aureus* 358

SNE- Sistema Nervoso Entérico

SP_s- proteínas de estresse

TFFs- fatores trefoil

TLR3- receptor semelhante a Toll tipo3

TLR4- receptor semelhante a Toll tipo4

TNF-α- fator de necrose tumoral α

TRPV-1- receptor de capsaicina tipo 1

ufc- unidade formadora de colônia

UV – ultra violeta

v.o- via oral

v/v- volume por volume

VCAM-1- molécula de adesão da célula vascular.

WITTM- Wittmack

α-alfa

β-beta

δ- delta

κ- kappa

μ - mu

μ- micro

μg- micrograma

μl- microlitro

μM- micromol

σ- sigma

Sumário

1 Introdução 22

1.1 Apresentação 22

1.2 Referencial teórico 24

1.2.1 Estômago 24

1.2.2 Fisiologia da mucosa gástrica 26

1.2.3 Regulação da secreção gástrica 27

1.2.4 Fatores envolvidos na proteção da mucosa gástrica 28

1.2.5 Doenças gástricas 31

1.2.6 Indução de lesão gástrica experimental 33

1.2.7 Uso de produtos naturais 35

1.2.8 O pequizeiro *(Caryocar coriaceum*) 36

1.3 Justificativa 37

2 Objetivos 40

2.1 Geral 40

2.2 Específicos 40

3 Materiais e métodos 42

3.1 Material botânico 42

3.2 Preparação do extrato 42

3.3 Determinações químicas 43

3.3.1 Taninos 43

3.3.2 Fenóis totais 43

3.3.3 Flavonóides 43

3.3.4 Atividade antioxidante 44

3.4 Atividade contra bactérias 45

3.4.1 Microorganismos 45

3.4.2 Antibióticos 45

3.4.3 Teste de difusão em meio sólido 45

3.4.4 Concentração Inibitória Mínima – CIM 45

3.4.5 Modulação 46

3.5 Animais utilizados 46

3.6 Indução de lesão gástrica 47
3.6.1 Por Etanol 47
3.6.2 Por etanol acidificado com ácido clorídrico (HCl) 47
3.6.3 Por Indometacina 47
3.6.4 Teste de barreira física 48
3.6.5 Úlcera gástrica induzida por ácido acético 48
3.7 Avaliação macroscópica das lesões gástricas 48
3.7.1 Método informatizado 48
3.7.2 Método de pontuação 49
3.8 Estudo do possível mecanismo envolvido na atividade gastroprotetora do EHFCC 49
3.8.1 Verificação da participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina 49
3.8.2 Teste de participação de canais de potássio ATP-dependentes 50
3.8.3 Verificação da ação do óxido nítrico 50
3.8.4 Testes de determinação do envolvimento das prostaglandinas 50
3.8.5 Determinação de muco da mucosa gástrica 51
3.8.6 Envolvimento dos receptores noradrenergicos α_2 51
3.8.7 Envolvimento dos receptores histamínicos (H_2) 52
3.8.8 Envolvimento dos receptores opióides 52
3.9 Avaliação da motilidade gastrointestinal 53
3.9.1 Trânsito intestinal 53
3.10 Análise estatística 53
4 Resultados e discussão 55
4.1 Coleta do material botânico e preparação do extrato 55
4.2 Determinações químicas 55
4.2.1 Taninos 55
4.2.2 Fenóis totais e flavonóides 55
4.2.3 Atividade antioxidante 57
4.3 Atividade antibactériana 57
4.3.1 Teste da difusão e meio sólido 57
4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima 58
4.3.3 Modulação 59
4.4 Lesão gástrica induzida por etanol 60

4.5 Lesões gástricas induzidas por etanol acidificado 62
4.6 Lesão gástrica induzida por indometacina 63
4.7 Teste de barreira física 64
4.8 Indução de úlcera crônica 66
4.9 Elucidação do mecanismo de ação 69
4.9.1 Verificação da participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina. 69
4.9.2 Participação de canais de potássio dependentes de ATP 70
4.9.3 Participação do óxido nítrico 72
4.9.4 Envolvimento das prostaglandinas 73
4.9.5 Determinação de muco 75
4.9.6 Envolvimento dos receptores noradrenergicos α_2 76
4.9.7 Envolvimento de receptores histamínicos 78
4.9.8 Envolvimento dos receptores opióides 79
4.10 Avaliação da motilidade gastrointestinal 80
5 Conclusão 84
Referências 86

1.INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Apresentação

Várias espécies de Caryocar, plantas da família Caricariaceae, conhecidas popularmente como pequi, são extensivamente utilizadas na medicina popular brasileira por sua atividade antiinflamatória e cicatrizante, já comprovadas em ensaios pré-clínicos controlados.

A grande parte do portfólio de medicamentos da indústria farmacêutica mundial está baseada em produtos naturais e nem mesmo o longo período em que essa indústria não investiu de forma maciça no desenvolvimento de novas drogas, baseadas nesses produtos - seja de origem vegetal, animal, bacteriana ou fúngica - não fez com que fosse diminuída a relevância desta linha de desenvolvimento para novos fármacos (HARVEY, 2008; NEWMAN, 2008).

Tal quadro de desinteresse da grande parte da indústria farmacêutica pelos produtos naturais se deve principalmente ao maior rigor implantado pelos órgãos responsáveis pelo registro de novas drogas bem como pela própria dificuldade de isolar, caracterizar e produzir os compostos dos produtos naturais de forma rápida e com alto rendimento, o que é conhecido como *high-throughput triagem* (HTS), sendo outro fator importante a propriedade intelectual sobre o produto natural regulado das formas mais diversas em vários países e, por fim, a preocupação com a conservação da diversidade biológica (LI e VEDERAS, 2009).

Mesmo sob essa ótica, moléculas isoladas de produtos naturais, bem como semissintéticas - que utilizam um molécula natural com modificações- ou moléculas totalmente sintéticas, mas que utilizam o grupo farmacofórico de um produto natural, respondem por cerca de 70 % das novas moléculas de drogas aprovadas pelos órgãos de registro de medicamentos nos últimos 30 anos, incluído derivados biológicos e vacinas (NEWMAN e CRAGG, 2012).

A pesquisa para produção de novos fármacos a partir de produtos naturais envolvem diversos campos do conhecimento e vários métodos de análise, desde a coleta e identificação do material, até à triagem biológica em ensaios farmacológicos, determinação do princípio ativo e mecanismo de ação pelo qual o efeito farmacológico é exercido (BALUNAS e KINGHORN, 2005). A descoberta de novos fármacos implica em grandes investimentos em pesquisas de bioprospecção, canalizando esses investimentos na busca de soluções para o tratamento de doenças que oneram o sistema de saúde. Dentre essas doenças, a problemática dos distúrbios gástricos, particularmente o tratamento da úlcera péptica, atrai a atenção da

indústria farmacêutica, sendo de grande importância a descoberta de novos compostos com atividade antiulcerogênica, sem falar nos custos relativamente baixos no desenvolvimento de modelos experimentais utilizando o sistema digestório (DE CARVALHO, 2006).

A úlcera péptica é uma doença que possui altos índices de morbimortalidade no mundo, apesar de ser observada uma relativa diminuição nestes números após mudança no paradigma do tratamento, hoje focado principalmente no combate a *Helicobacter pylori* e uso de inibidores eficientes da secreção ácida (MALFERTHEINER, CHAN e MCCOLL, 2009). Tais lesões são causadas pela perda do equilíbrio entre agentes protetores (muco e bicarbonato) e agentes lesivos (ácido e pepsina). A diminuição do muco, do bicarbonato, do fluxo sanguíneo e o aumento da acidez gástrica e da secreção de enzimas pépticas são observados comumente em indivíduos infectados por *H. pylori*, em uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroidais, álcool, fumo, presença de refluxo gástrico, isquemia e esvaziamento gástrico demorado (ABBAS, VINAY KUMAR e FAUSTO, 2005).

As complicações decorrentes da úlcera péptica causam um impacto econômico considerável nos sistemas de saúde. Nos Estados Unidos estes valores são estimados em cerca de 5,65 bilhões de dólares por ano, incluindo os gastos efetivos e perdas econômicas, como redução da capacidade laboral; já dados da Holanda revelam um gasto médio por pessoa de 12 mil euros em quadros hemorrágicos, 19 mil euros em quadros de perfusão e 26 mil euros com a associação de ambos (LAU et al., 2011).

A retomada da utilização de produtos naturais no combate das mais diversas doenças tem, demonstrado mais uma alternativa como tratamento eficaz destas, podendo esses produtos possuir uma vasta variedade de compostos capazes de agir isoladamente ou em associação, sendo eficazes em vários tratamentos. Muitos destes produtos são de origem vegetal tendo sua composição influenciada pela região onde estão inseridos.

A Floresta Nacional do Araripe-Apodi (FLONA) esta localizada no topo da Chapada do Araripe, uma mesorregião do extremo sul do estado do Ceará. A FLONA abrange os municípios de Crato, Barbalha, Jardim, Santana do Cariri e Missão Velha, com uma área de 38.262 hectares. Essa área foi criada e protegida em 1946 pelo decreto-lei nº 9226 (MENEZES, ARAÚJO e ROMERO, 2010), resultando na preservação da fauna e flora, típica e endêmica, que fornecem vários objetos de estudos, como janaguba (*Himatanthus drasticus*), fava d'anta (*Dimophandra gardneriana*), pequi (*Caryocar coriaceum* WIITM), dentre outros produtos, cuja exploração não cause impacto ambiental a esta biodiversidade (ALVES, BEZERRA e MATIAS, 2011) e proporcionem a produção de conhecimento científico capaz de valorar ainda mais a conservação, através da confirmação de atividades biológicas de produtos naturais

oriundos da referida região.

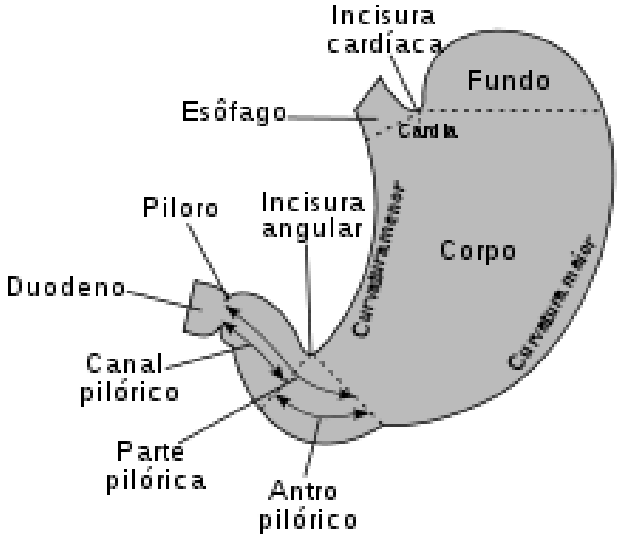
Este trabalho de mestrado representa um esforço no sentido de estudar a atividade gastroprotetora e antibacteriana das folhas de *Caryocar coriaceum* WITTM., onde a verificação destas ações é altamente encorajadora tendo em vista que podemos vislumbrar um potencial terapêutico de preparações de fitoterápicos com base nesta espécie para o tratamento coadjuvante de doenças pépticas.

1.2 Referencial teórico

1.2.1 Estômago

A alimentação é fonte crucial de nutrientes para os animais, incluindo o homem, sendo o estômago um dos principais órgãos envolvido na digestão destes alimentos. Apresenta-se como um órgão sacular com capacidade de 1200 a 1500 mL, podendo porém, sofrer distensão e acomodar um volume de até 3000 mL. O estômago é dividido em cinco regiões anatômicas : cárdia, fundo, corpo, antro e o esfíncter pilórico (figura 1), sendo seu revestimento interno idêntico ao do restante do trato gastrointestinal, apresentando mucosa, submucosa, camada muscular e serosa (ABBAS, VINAY KUMAR e FAUSTO, 2005).

Figura 1 - Regiões anatômicas do estômago.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Estômago.svg

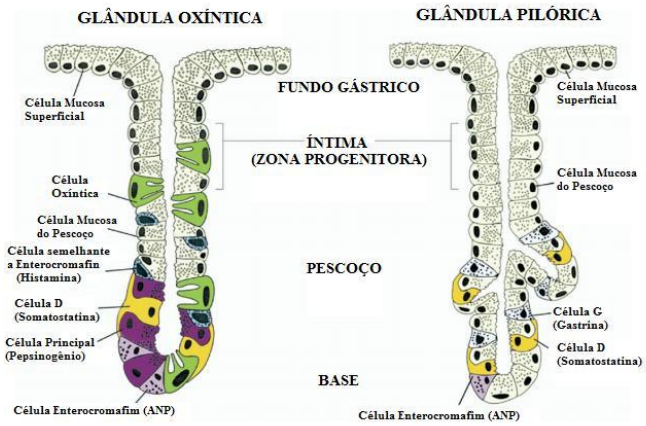
A mucosa gástrica possui dois compartimentos distintos: o foveolar superficial e glandular mais profundo, demonstrando a variação na sua composição de acordo com a região anatômica do estômago. As glândulas superficiais do estômago sofrem estimulação direta pela presença do alimento, aumentando a sua secreção, sendo que também

são ativadas pelo Sistema Nervoso Entérico (SNE). Da mesma forma, o SNE ativa glândulas mais profundas, podendo essa ativação ocorrer pela estimulação tátil, irritação química e/ou distensão da parede gástrica proporcionando um aumento nas secreções tanto de glândulas superficiais quanto profundas. A estimulação parassimpática, com liberação de acetilcolina, excita a atividade gastrointestinal incluindo uma maior liberação das secreções glandulares; já a estimulação simpática, com liberação de norepinefrina e pequenas quantidades epinefrina, inibe a atividade do trato gastrointestinal oponde-se a estimulação parassimpática, efeito esse atribuído principalmente à inibição dos neurônios do sistema nervoso entérico pela norpeinefrina (FURNESS, 2012). A regulação hormonal tem papel crucial no controle da secreção das glândulas gástricas, regulando tanto o volume como as características das secreções (SCHUBERT e PEURA, 2008).

A superfície da mucosa gástrica é recoberta por células especiais conhecidas por “células mucosas superficiais” que são responsáveis pela produção e liberação de um muco viscoso, denso e alcalino que serve de barreira protetora contra a ação da secreção ácida, sintetizada pelas glândulas oxínticas ou gástricas, as quais estão presentes no corpo e fundo do estômago (MILLS e SHIVDASANI, 2011).

As glândulas oxínticas estão dispostas como tubos verticais e contem três regiões, a apical, a intima e basal ou glandular propriamente dita, que é subdividida em pescoço e base. É na região chamada de intima que estão localizadas a progenitoras das células que compõem a glândula, porém, as células produtoras de muco migram para a região apical e as células oxínticas deslocam-se para região basal da glândula. Existem ainda nestas glândulas, células principais que secretam grande quantidade de pepsinogênio; células enterocromafins, que contêm peptídeo natriurético atrial (PNA), serotonina e adrenomedulina; células semelhantes à enterocromafins (ELC), que contém histamina; células D com somatostatina e amilina; um tipo semelhante de célula G que contêm grelina e obestatina, além da células oxínticas que liberam o ácido, fator intrínseco, que auxilia a absorção de vitamina B12 e fator de diferenciação de crescimento α (figura 2). As glândulas pilóricas também contém células D, células G, células entorocromafins (SACHS, ZENG e PRINZ, 1997; SCHUBERT e PEURA, 2008).

Figura 2 - Esquematização das glândulas gástricas



Fonte: adaptado de SCHUBERT e PEURA (2008)

1.2.2 Fisiologia da mucosa gástrica

A mucosa gástrica possui a função de produzir e secretar ácido clorídrico como também produzir os agentes de proteção com o objetivo de evitar a autodigestão da mucosa. A secreção ácida é dividida em três fases: a fase cefálica, que inicia-se com estímulos visuais, olfativos, do paladar, bem como pela própria mastigação e deglutição do alimento, estimulando a secreção ácida através de ativação do nervo vago, sendo responsável por cerca de 20% da secreção ácida; a fase gástrica responde a estímulos mecânicos como a distensão gástrica mediada por estímulos vagais, como também pela liberação de gastrina por células G (que age diretamente sobre a secreção ácida e estimulando a liberação de histamina por ELC) e a presença de aminoácidos e peptídeos na luz gástrica reforçam a secreção ácida por estimulação vagal, fazendo com que esta fase responda por 70% de toda a secreção ácida; e a fase intestinal que inicia-se com a chegada do alimento ao intestino delgado que sofre estimulação de vários polipeptídeos, inclusive a gastrina, resultando na manutenção da secreção em pequenas quantidades de suco gástrico (ABBAS, VINAY KUMAR e FAUSTO, 2005).

A proteção da mucosa contra autodigestão possui vários constituintes: o muco funcionando como barreira física e protegendo da ação do ácido; bicarbonato, produzido por células superficiais do estômago bem como do duodeno, que geram um microambiente com pH neutro; a própria barreira epitelial, uma barreia eficiente contra a difusão retrógrada dos íons hidrogênio, reforçada pela rápida regeneração destas células quando lesionadas; o fluxo sanguíneo mucoso, uma importante defesa na proteção da

integridade da mucosa, visto que fornece oxigênio, bicarbonato e nutrientes para as células epiteliais, auxiliando também na remoção de ácido que possa vir a sofrer difusão retrógrada; e a síntese de prostaglandinas, uma vez que estas atuam sobre outros componentes responsáveis pela defesa da mucosa, como o muco, o bicarbonato e o fluxo sanguíneo mucoso, além de inibirem a secreção de ácido realizada pelas células oxínticas (GUYTON e HALL, 2006).

1.2.3 Regulação da secreção gástrica

A secreção ácida está diretamente associada à bomba de prótons, uma K^+,H^+-ATPase gástica da família P2-ATPase, que é uma enzima integrante da membrana das células oxínticas, responsável por este tipo de secreção. A bomba de prótons é composta por duas subunidades, α catalítica e β com locais de n-glicolização, locais esses importantes, pois a n-glicolização juntamente com Mg^{2+}ATP (HOLZ et al., 1989) e fosforilação, permitem a mudança conformacional E1 para E2, permitindo assim a saída para os canalículos, do próton H^+ e entrada do K^+, resultando na liberação de cerca de 160 mM de H^+ (pH 0,8) (SHIN et al., 2009). O canal de potássio do tipo KCNQ1 é de fundamental importância para secreção ácida, já que disponibiliza os íons K^+ no canalículo da célula oxíntica tornando este íon disponível para uso da K^+,H^+-ATPase (SONG et al., 2009). O pantoprazol e omeprazol são inibidores da bomba de prótons, que é a etapa final da secreção ácida inibindo assim cerca de 99 por cento da secreção ácida (VINE, PHILPOTT e FORTUN, 2012).

A regulação da secreção ácida das células oxínticas é muito complexa e dinâmica, sofrendo influencias neurais (aferente e eferente), hormonal (gastrina), parácrina (histamina), mecânica (distensão) e química (café e etanol) (SCHUBERT, 2010). A regulação neural está diretamente ligada à liberação de acetilcolina, um neurotransmissor pré-ganglionar autônomo e pós-ganglionar parassimpático. Esse neurotransmissor possui receptores muscarinicos tipo 3 (M3) nas células oxínticas que ativam a secreção de ácido através do aumento da disponibilidade de cálcio intracelular e também pela inibição da liberação de somastatina via receptores muscarinicos tipo 2 e 4 (M2 e M4) nas células D (SCHUBERT, 2010). Todos esse receptores são metabotrópicos pertencentes aos receptores de proteína G acoplada, que regulam canais iônicos e íons como segundos mensageiros. Os receptores M3 aumentam a disponibilidade de cálcio (Ca^{2+}) intracelular pela mobilização de fosfatidilinositois que geram inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). As células semelhantes à enterocromafins possuem receptores M1 que funcionam analogamente aos M3, ativando fosofolipase C gerando IP_3 e DAG ocasionando assim a liberação de histamina que irá atuar nas células oxínticas aumentando a secreção ácida (TOBIN, GIGLIO e

LUNDGREN, 2009; GOODMAN e GILMAN, 2010).

Nas células superficiais produtoras de muco e bicarbonato, importantes componentes das defesas gástricas, foram evidenciados receptores do tipo M3, os quais estimulam a produção e secreção destas substâncias em resposta à acetilcolina e diminuição desta atividade frente à norepinefrina (TOBIN, GIGLIO e LUNDGREN, 2009).

A histamina, uma amina bioativa e endógena, é um importante transmissor, mediador inflamatório, estimulador neural, de respostas imunológicas e atua também no controle da secreção ácida do estômago, sendo os antagonistas de receptores histamínicos do tipos 2 (H2) uma importante ferramenta no tratamento de úlceras gástricas. Há evidências de que receptores H3 funcionam inibindo a liberação de histamina pela células semelhantes à enterocromafins em uma espécie de "*feedback*" negativo ativado pelo excesso de histamina liberada (SACHS, ZENG e PRINZ, 1997). A histamina, bem como a acetilcolina aumentam a secreção ácida pela mudança da concentração intracelular de Ca^{2+}, através da ativação da adenilato ciclase, que eleva a concentração de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) promovendo ativação da fosfoquinase A (PEREZ-ZOGHBI et al., 2008).

As ELC possuem receptores seletivos para gastrina, colecistocinina 2 (CCK2), também presentes nas células oxínticas (HAID et al., 2012). A gastrina é um hormônio produzido principalmente pelas células G da região antral do estômago, possuindo pequena produção no intestino delgado, cólon e pâncreas. A ativação destes receptores nas ELC aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular pela ativação de fosfolipase C, proporcionando a liberação de histamina, que como já relatado, irá produzir um incremento na secreção ácida da célula oxíntica. Esse mesmo aumento de Ca^{2+} intracelular ocorre na própria célula oxíntica via CCK2 presente nesta célula. A gastrina sintetizada pelas células G chega ao seu local de ação através da circulação sanguínea e funciona também como hormônio trófico (SCHUBERT e PEURA, 2008).

As células principais, responsáveis principalmente pela secreção de pepsinogênio, que tornar-se-á ativo como pepsina no pH ácido do estômago, aumentam a sua secreção pela ativação de receptores β-adrenergicos, muscarinicos (M1 e M3) e colecistocininicos (CCK1), mas não sofre influência da histamina pois não possuem receptores H2 (PEREZ-ZOGHBI et al., 2008).

1.2.4 Fatores envolvidos na proteção da mucosa gástrica

A somatostatina, produzida pelas células D, é o principal inibidor da secreção gástrica, pois inibe a liberação de histamina das ELC, da gastrina da células G e

diretamente a liberação de H^+ pelas células oxínticas. Os receptores de reconhecimento da somatostatina são receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (LINSCHEER e RAHEJA, 1978; NAKAMURA et al., 2010).

A primeira defesa contra os agentes agressores (H^+ e pepsina) é uma barreira física formada por muco, bicarbonato e fosfolipídeos surfactantes que recobrem a camada superficial. O muco é composto basicamente por água e mucina, e como o bicarbonato, é secretado pelas células superfiais formando assim a barreira protetora. Prostaglandinas, agentes colinérgicos, gastrina e secretina estimulam a secreção de muco. Já a secreção de bicarbonato pode ser estimulada por prostaglandinas, L-glutamato, L-aspartato, L-leucina, inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5) e ativação de receptores semelhantes a Toll tipo 3 e 4 (TLR3 e TRL4) (DEFONESKA e KAUNITZ, 2010).

As prostaglandinas podem ser produzidas a partir do ácido araquidônico (AA) pela ação das cicloxigenases (COX), que apresentam três isoformas: COX1 constitutiva, COX2 induzível e COX3 uma variante da COX1 (DEY, LEJEUNE e CHADEE, 2009). Os prostanoides possuem oito receptores, entre tipos e subtipos. Para as prostaglandias E2 (PGE2), existem os subtipos EP1, EP2, EP3 e EP4 (NARUMIYA, 2009). A PGE2 produzida pelas células mucosas atua na proteção gástrica em vários locais e ligando-se a diferentes subtipos de receptores: no estômago ocorre inibição da contração através do envolvimento de receptores EP1; a estimulação da secreção duodenal de bicarbonato ocorre através de receptores EP3 e EP4; a inibição da contração do intestino delgado por EP4; estimulação da secreção de muco no estômago (EP3 e EP4); e sub-regulação da secreção de citocinas no cólon (EP4) e aumentando também o fluxo sanguíneo (TAKAHASHI, TAKEUCHI e OKABE, 1999).

O fluxo sanguíneo é fundamental na defesa citoprotetora da mucosa gástrica por disponibilizar mais bicarbonato e proteger a mucosa da retrodifusão dos íons H^+. O óxido nítrico (NO), que produzido pela ação da enzima oxido nítrico sintetase (NOS), atua como vasodilatador local com aumento do fluxo sanguíneo. A NOS possui três isoformas que produzem NO a partir da L-arginina, convertendo-a em L-citrulina; duas isoformas são constitutivas, a endotelial (eNOS) e a neural (nNOS), e uma forma induzível (iNOS). O NO atravessa facilmente membranas plasmáticas difundindo-se rapidamente para células vizinhas à célula que o produziu, tendo a capacidade de ligar-se ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP para GMPc, aumentando, por conseguinte, a concentração de GMPc intracelular. Assim, esse segundo mensageiro liga-se aos domínios específicos de moléculas efetoras, incluindo canais iônicos, proteínas quinases, e

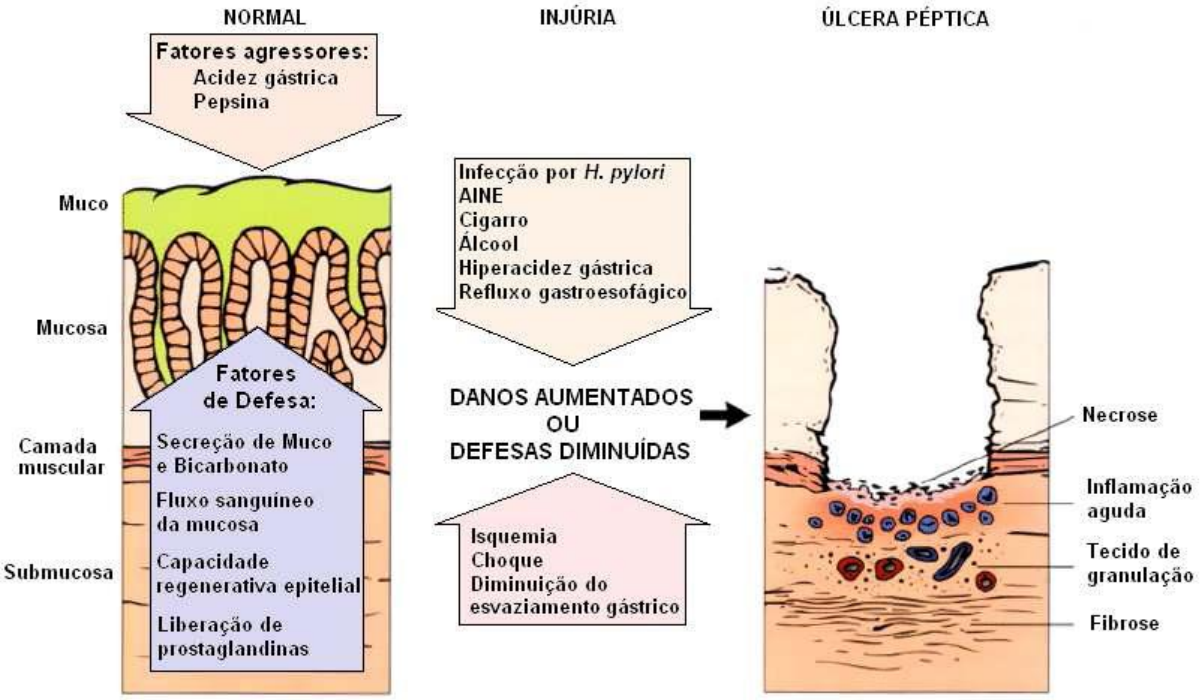
fosfodiesterases, promovendo respostas celulares. Os neurônios do sistema nervoso entérico e células endoteliais vasculares expressam de forma basal as suas respectivas isoformas constitutivas da NOS, e a forma induzível também pode ser expressa por estes tipos celulares como também por macrófagos e neutrófilos. Uma relevante diferença entre as isoformas constitutivas e induzível, é que esta última é uma enzima cálcio independente, propiciando a esta a capacidade de produzir grande quantidade de NO, que faz com que este passe a ter efeito pró-ulcerogênico (NISHIO et al., 2006).

Radicais livres nada mais são do que espécies químicas com elétrons desemparelhados que lhes conferem alta reatividade. As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são radicais livres que contem oxigênio ou espécies químicas contendo oxigênio e formam facilmente radicais livres, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Tais espécies são resultados do metabolismo celular natural sendo capazes de induzir dano e provavelmente morte celular (STOHS, 2011). Antioxidantes são moléculas capazes de evitar ou diminuir o dano oxidativo causado por radicais livres. Os flavonóides e outros polifenóis, presentes em alguns produtos naturais, são substâncias que podem propiciar vários benefícios à saúde e possuem comprovadamente, *in vitro*, ação antioxidante ou pró-antioxidante, ação essa comprovada *in vivo* em alguns locais como estômago, intestino delgado e grosso (HALLIWELL, 2011).

1.2.5 Doenças gástricas

As lesões gástricas, proveniente de doenças gástricas, ocorrem por um desequilíbrio gerado pelo aumento dos agentes agressores (ácido e pepsina) ou diminuição dos agentes protetores (muco, bicarbonato e fluxo sanguíneo) (figura 3). Vários fatores ou agentes são capazes de contribuir para o desequilíbrio, seja aumentando os agentes agressores, diminuindo os protetores ou realizando ambas as funções, como por exemplo, infecção por *H. pylori*, uso de álcool, fumo, antiinflamatórios não esteroides, dimunuição do fluxo sanguíneo, choque, isquemia, refluxo esofágico, hiperacidez gástrica e diminuição da velocidade de esvaziamento gástrico, além do estresse e fatores psicossociais, embora estes últimos não possam ser considerados capazes de gerar lesão gástrica sozinhos (ABBAS, VINAY KUMAR e FAUSTO, 2005).

Figura 3 - Fatores que influenciam o equilíbrio gástrico.



Fonte: adaptado de ABBAS, VINAY KUMAR e FAUSTO (2005)

As doenças gástricas, principalmente a úlcera péptica, se desenvolvem em cerca de 10% da população em algum período da vida. A gastrite erroneamente, de forma exacerbada, é determinada por qualquer queixa de dor abdominal alta, podendo também ser ignorada ou não diagnosticada, uma vez que pacientes crônicos são assintomáticos. A gastrite é uma inflamação da mucosa gástrica e por tanto é diagnosticada histologicamente. A forma aguda é caracterizada pela presença de neutrófilos tendo como principais desencadeadores os AINES, o consumo excessivo de álcool, fumo, quimioterapia, uremia, infecções bactérianas

ou virais, estresse intenso (traumas, queimaduras), isquemia, choque, ingestão de ácidos ou bases fortes e trauma mecânico, sendo esta inflamação transitória. Já a forma crônica, histologicamente confirmada pela presença de linfócitos e/ou plasmócitos, pode resultar na atrofia da mucosa e até metaplasia intestinal. Os principais agentes associados são: infecção por *H. pylori*, auto-imunidade associada a anemia perniciosa, tóxica (álcool e fumo), pós cirúrgica, mecânicas ou motoras e doenças granulomatosas (doença de Crohn) .

As úlceras pépticas são mais comumente encontradas no estômago e no duodeno, mas podem ser encontradas em qualquer região do trato gastrointestinal. São lesões na mucosa produzidas pela ação da secreção ácido péptica, que se estendem até camada muscular, podendo atingir a submucosa ou camadas mais profundas (MALFERTHEINER, CHAN e MCCOLL, 2009).

As lesões gástricas tem etiologia complexa e multifatorial (figura 4), sendo que a infecção por *H. pylori* e o uso de antiinflamatórios não esteroidais, isolados ou associados, são os agentes mais comuns ligados à incidência de úlcera gástrica.

Figura 4 - Quadro de agentes etilógicos de úlcera péptica

Agentes etiológicos da úlcera gástrica	
Infecção por *H. pylori*	Mastocitose sitêmica
Drogas (outras que não AINES)	Radiação
AINES	Infecções virais (citomegalovirus e herpes simples)
Hipersecreção de ácido (síndrome de Zollinger-Ellison)	Colonização do estômago por *H. heilmanii*
Por Anastomose após a ressecção subtotal tumores	Doença sistêmica grave
Doença de Crohn	Úlcera Cameron
Úlcera idiopática verdadeira	

Apesar de terapias mais eficientes, como o uso de inibidores da bomba de prótons e o combate à infecção por *H. pylori*, a úlcera péptica gástrica ou doença péptica gástrica ainda apresenta-se como um agravo de saúde com forte impacto econômico para os sistemas de saúde e da diminuição da qualidade de vida dos indivíduos afetados. (SUNG, KUIPERS e EL-SERAG, 2009; LAU et al., 2011)

1.2.6 Indução de lesão gástrica experimental

Os modelos experimentais de indução de lesão gástrica em animais são fundamentais para pesquisa e desenvolvimento de drogas eficazes no combate a essas lesões. Considerando que a etiologia das úlcerações é multifatorial, as lesões experimentais podem ser induzidas por vários agentes, que utilizam diversos mecanismos lesivos (SAMONINA et al., 2004).

As lesões induzidas experimentalmente em camundongos possuem o mesmo mecanismo para o desenvolvimento das lesões em seres humanos, ou seja, provocando um desequilíbrio entre os agentes agressores e os agentes responsáveis pela proteção da mucosa (MAITY et al., 2003).

1.2.6.1 Indução por etanol

O etanol é capaz de induzir lesões experimentais para estudo por possuir ação necrotizante direta e causar alteração na microcirculação da mucosa, por isquemia e produção de radicais livres, além de liberar endotelina, promover a desgranulação de mastócitos, inibir a produção de prostaglandinas e diminuir a produção de muco (RUJJANAWATE et al., 2005). A inibição da síntese das prostaglandinas pelo etanol,pode ser explicada pela ativação da via das lipoxigenases, que irão aumentar os níveis de leucotrieno C4 e B4, diminuindo assim os produtos formados pela ciclooxigenases (MAITY et al., 2003; GOEL, TAVARES e BENNETT, 2012; PESKAR et al., 2012).

1.2.6.2 Indução por etanol acidificado

A indução de lesões gástricas por etanol acidificado (solução de 0,3M de HCl em etanol 60%) tem capacidade ulcerogênica amplamente reconhecida e é utilizado em vários estudos para induzir danos na mucosa gástrica, causando hiperemia localizada e hemorragia. O etanol e o HCl agem sinergicamente provocando úlcera, por meio da potencialização dos efeitos do etanol provocado pelo HCl (ADEYEMI, YEMITAN e TAIWO, 2006).

1.2.6.3 Indução por antiinflamatórios não esteroidais

Os AINEs, como a indometacina, são utilizados como indutores de lesão gástrica principalmente por inibirem a cicloxigenases (COX) e impedirem assim a síntese de prostaglandinas, principalmente a PGE2 (BORER e SIMON, 2005; FENDRICK, PAN e JOHNSON, 2008). Porém, os AINEs são capazes de ocasionar lesão gástrica por ação tópica, pois seus grupos carboxílicos aumentam a sua hidrosolubilidade e lhes confere propriedades detergentes facilitando a interação com fosfolipídeos. Essa interação pode desativar a fosforilização oxidativa e inibiação da cadeia de transporte de elétrons, que irá resultar em níveis tóxicos de Ca^{+2}, diminuição dos níveis de ATP, além de favorecer a produção de radicais livres. Com isso, tanto estes radicais como a citocromo C4, liberado pela desativação da fosforilização oxidativa, induzem a apoptose. Além disso, os AINEs atuam modificando o caráter hidrofóbico da barreira protetora pela associação com os fosfolipídeos que a compõem e podem também agir diretamente na membrana plasmática das células superficiais aumentando, a permeabilidade da membrana e alterando a hidrofobicidade, a fluidez, espessura, rigidez e formação de poros (MUSUMBA, PRITCHARD e PIRMOHAMED, 2009).

De forma sistêmica a inibição das prostaglandinas não é o único mecanismo que contribui para indução de lesão gástrica, existindo fatores independentes da produção de prostaglandinas como: inibição do óxido nítrico, sulfito de hidrogênio (H_2S) e poliaminas. A diminuição da síntese de prostaglandinas provoca um aumento desses outros fatores de defesa: NO, H_2S, interleucina 1β (IL-1β), peptideo associado ao gene de calcitonina (CGRP), melatonina (MT), proteínas de estresse (SPs) e fatores trefoil (TFFs) (XUE et al., 2010), com o objetivo de compensar tal diminuição. Porém, os AINEs inibem a NOS constitutiva pela ativação da enzima conversora de endotelina 1 (ECE1), impedindo a formação de NO diminuindo o fluxo sanguíneo, além de inibir a ornitina descarboxilase (ODC) diminuindo assim a concentração de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) que são essenciais para o crescimento e proliferação celular, sendo cruciais para as várias fases da restauração em resposta à lesão gastrintestinal por agentes irritantes, tais como AINEs. Níveis elevados de poliaminas conduzem a rápida proliferação, enquanto que níveis baixos induzem apoptose. Ocorre também a redução da expressão genética de cistationina gama-liase (CSE) bloqueando a síntese de H_2S, que atua ativando parcialmente canais de potássio ATP dependente e auxilia na angiogênese (MIZUI e DOTEUCHI, 1983; SCHWEIZER et al., 1997; SLOMIANY e SLOMIANY, 2005).

Os AINEs induzem a apoptose por vários mecanismos, tanto caspases

dependentes como independentes, pela liberação e produção de diversos médiadores como fator de necrose tumoral α (TNF- α), caspase 8, caspase 9, citocromo c, fator indutor de apoptose, fator nuclear kappa B, sistema proteossoma ubiquitina, entre outros (MUSUMBA, PRITCHARD e PIRMOHAMED, 2009).

1.2.6.4 Indução por ácido acético

A indução de úlceras crônicas é realizada com a aplicação de ácido acético na subserosa do estômago dos animais e estas lesões assemelham-se muito com as úlceras em seres humanos, sendo este modelo amplamente utilizado para estudo de novas drogas que se propõem a diminuir a reincidência de úlcerações ou melhorar sua cicatrização. O dano tecidual provocado pelo ácido acético promove a formação de úlceras profundas devido à necrose ácida gerada pela ação desse agente; outros estudos sugerem que o ácido acético possa gerar embolia nos vasos sanguíneos da submucosa, provocando assim, isquemia persistente da mucosa, superior e inferior, podendo também penetrar nos vasos causando coagulação e lesando células endoteliais (OKABE e AMAGASE, 2005; VASCONCELOS et al., 2008; OKABE, AMAGASE e TAKEUCHI, 2010).

1.2.7 Uso de produtos naturais

A biodiversidade é uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas e o uso de produtos naturais bioativos surgem como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo que, a maioria dos fármacos em uso clínico, ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química a partir de produtos naturais (BARREIRO e DA SILVA BOLZANI, 2009). O uso de produtos naturais, com finalidades curativas, é exercido desde os tempos mais remotos por populações de todo mundo e contra as mais diversas enfermidades, sendo as principais indicações fitoterápicas, de conhecimento popular e fácil acesso (DOS SANTOS et al., 2009).

O homem, inserido na modernidade, está exposto no seu dia-a-dia a inumeráveis quantidades de substâncias químicas sintéticas ou de origem natural, muitos desses compostos essencias para o seu conforto e segurança (VARANDA, 2009) e dentro desta perspectiva, a participação dos produtos naturais é, sem dúvida, muito importante no que tange ao desenvolvimento de protótipos básicos para geração de novos medicamentos sintéticos, sendo verdade que, muitos constituintes de origem natural ou seus derivados semi-sintéticos constituem uma parcela apreciável dos novos fármacos recém-introduzidos no mercado (WILSON e DANISHEFSKY, 2006).

O consumo atual de medicamentos fitoterápicos decorre basicamente do fato de que representam formas de terapia mais econômicas que aquelas oferecidas pela indústria farmacêutica e a medicina alopática, ganhando destaque em países em desenvolvimento, como o Brasil, que ocupa posição privilegiada devido à riqueza da sua biodiversidade, estimulando pesquisas por novos produtos com maior atividade farmacológica, menor toxicidade e mais biocompatíveis (CASTILHO, MURATA e PARDI, 2007).

Portanto, a química de produtos naturais e a química medicinal são ferramentas indispensáveis para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Muitos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico atualmente, derivam de produtos naturais, seja por isolamento, semi-síntese ou por síntese total, esta última objetivando um grupo farmacofórico de algum produto natural. Um exemplo recente e rentável de tal técnica de desenvolvimento é o cloridrato de sildenafil, obtido a partir de cafeína e zaprinaste pela técnica de bioisosterísmo (BARREIRO e DA SILVA BOLZANI, 2009).

1.2.8 O pequizeiro (*Caryocar coriaceum*)

A Chapada do Araripe, classificada como Mesorregião, esta localizada no Semi-Árido do Nordeste brasileiro, possui altitude variando entre 700 e 900 metros, compreende 103 municípios, sendo 25 municípios no estado do Ceará, 18 municípios no estado de Pernambuco e 60 municípios no estado do Piauí. Possui uma área total de 76.654,3 km^2 e população estimada em 1.806.529 milhão de habitantes (NACIONAL, 2011). A Floresta Nacional do Araripe-Apodi (FLONA) está localizada no topo da Chapada do Araripe, abrangendo os municípios de Crato, Barbalha, Jardim, Santana do Cariri e Missão Velha, com uma área de 38.262 hectares. Essa área foi criada e protegida em 1946 pelo decreto-lei nº 9226 (MENEZES, ARAÚJO e ROMERO, 2010), resultando na preservação da fauna e flora, típica e endêmica. O pequi (*Caryocar coriaceum* WIITM) ocorre nessa região e sua exploração tem sido almejada sem que cause impacto ambiental a esta biodiversidade (ALVES, BEZERRA e MATIAS, 2011).

O *Caryocar coriaceum* WITTM. é uma das 15 espécies da família Carycaraceae que ocorrem no Brasil, das 25 existentes no mundo. É típica do cerrado, frondosa, podendo alcançar mais de 10 metros de altura, perene, floração entre os de setembro e outubro e frutificação de novembro a março. O fruto chamado de pequi que é colhido de forma extrativa, complementando a renda familiar dos seus catadores, e vendido de forma in natura ou o óleo, obtido da polpa. Ocorre nos estados do Ceará, Pernambuco, Piauí, Goiás,

Bahia e em partes do Maranhão e Tocantins (OLIVEIRA et al., 2010; RAMOS e SOUZA, 2011; DE SOUSA et al., 2012).

O óleo da polpa do pequi demonstra atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana, agindo sinergicamente com aminoglicosideos (SARAIVA et al., 2008; SARAIVA et al., 2010; SARAIVA et al., 2011). As folhas do pequizeiro em decocto são utilizadas popularmente para tratamento de gripes, resfriados, bronquites e controle de tumores (AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007; DA CONCEIÇÃO et al., 2012). O extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* (EHFCC) em outros estudos apresentou atividade antibacteriana em associação a aminoglicosideos e atividade anti-inflamatória tópica (ARARUNA, 2011).

O perfil fitoquímico do EHFCC é caracterizado pela presença de compostos fenólicos, flavonóides e taninos concernentes, não sendo evidenciada a presença de alcalóides. Por intermédio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), alguns compostos foram identificados (Figura 5), tendo a rutina com percentual de 6.81% como composto majoritário (ARARUNA, 2011).

Figura 5 – Quadro da composição do extrato das folhas de Caryocar coriaceum

Composto	**mg/g**	**%**
Ácido gálico	19,0 ± 0,15	1,90
Ácido clorogênico	31,4 ± 0,26	3,14
Ácido caféico	18,7 ± 1,02	1,87
Rutina	68,1 ± 0,04	6,81
Quercetina	26,9 ± 0,17	2,69

Fonte: adaptado de ARARUNA (2011)

1.3 Justificativa

Observada a grande incidência e prevalência de doenças ácido-pépticas na região, seguindo uma tendência mundial, temos este quadro como um dos pontos qualificadores do estudo. Além disso, será produzido um maior conhecimento sobre a flora nativa, aplicação terapêutica, promovendo a valorização das espécies vegetais locais, resultando em uma facilitação da conservação da diversidade biológica da Chapada do Araripe, o que irá gerar informações e dados inéditos sobre as atividades biológicas testadas frente ao EHFCC.

O produto natural complexo pode tornar-se um medicamento fitoterápico, definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como medicamento

obtido exclusivamente a partir de matéria-prima vegetal e com comprovação de sua eficácia, conhecimento dos riscos potenciais do seu uso, de forma similar ao registro de todos os medicamentos, exigindo ainda reprodutibilidade e constância deste medicamento. O registro pode ser realizado com derivado de droga vegetal, extrato, tintura, óleo, entre outros, não sendo objeto de registro, a planta ou partes dela (BRASIL, 2004). Os fitoterápicos respondem por 5 e 4 % do faturamento do mercado farmacêutico mundial e no Brasil, respectivamente (CARVALHO et al., 2007). Existem na ANVISA 512 medicamentos fitoterápicos com registro, sendo 432 simples e 80 compostos, associação de dois ou mais vegetais (CARVALHO et al., 2008). Portanto existe assim a possibilidade de aprofundamento do estudo da gastroproteção promovida pelo EHFCC, objetivando a produção e comercialização de um fitoterápico produzido a partir das folhas de *Caryocar coriaceum* WITTM., o pequizeiro.

A comunidade local também será beneficiada, principalmente as famílias que vivem da coleta de frutos do pequizeiro, agregando valor à espécie e criando a possibilidade de mais fonte de renda e emprego para tais famílias.

2.OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a atividade antibacteriana e gastroprotetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm.

2.2 Específicos

- Determinar a presença de taninos e a concentração de fenóis totais e flavonóides no extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* WITTM (EHFCC);
- Verificar a presença de rutina e quercetina no EHFCC pelo método de cromatografia em camada delgada.
- Avaliar a capacidade antioxidante do EHFCC *in vitro*;
- Verificar a ação do EHFCC isolado e em associação a amoxicilina, ciprofloxacino, cefalexina, oxacilina, claritromicina e benzilpenicilina frente à cepas de bactérias multirresistentes (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*);
- Determinar a atividade gastroprotetora do EHFCC em modelos de lesão gástrica induzidas por etanol, etanol/ácido clorídrico, indometacina e ácido acético;
- Determinar o possível mecanismo de ação da gastroproteção promovida pelo EHFCC, verificando a participação do óxido nitrico, das prostaglendinas, dos canais de potássio ATP-dependentes e envolvimento dos receptores da capsaisina (TRPV-1), opióides, histamínicos e α_2 noradrenérgicos no modelo induzido por etanol;
- Registrar a influência do EHFCC na secreção de muco gástrico por vias de administração distintas;
- Medir a influência do EHFCC sobre o trânsito intestinal de camundongos.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3 Materiais e métodos

3.1 Material botânico

As folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm foram coletadas de indivíduos desta espécie, localizados na Chapada do Araripe no bioma Cerrado, região do Cariri, sul do Ceará. Para realização da coleta foi solicitada e obtida autorização junto ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio), órgão responsável pela FLONA-Araripe-Apodi, sob número 28853-1. O material foi coletado no mês de outubro de 2011, sob as coordenadas: longitude oeste 39°29’ 46,7”, latitude sul 7° 14’ 53,7” e altitude de 944 metros em relação ao nível do mar. A coleta resultou em amostras para identificação e preparação de exsicata, depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima sob o número 6673 (figura 6).

Figura 6 - Exsicata depositada no herbário.

3.2 Preparação do extrato

As folhas do pequi foram postas ao sol para secar por um período de 48h entre intervalos de sol forte. Em seguida pesadas, separadas e trituradas para posteriormente, em um recipiente de vidro transparente, serem embebidas em etanol P.A. 500mL acrescido 500mL de água destilada, por um período de 72h.

O extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* (EHFCC) foi

filtrado para reter a parte sólida, destilado em evaporador rotativo (27 a 35 rpm; 45 °C) para retirada do etanol.

Depois de retirado o solvente, submeteu-se o extrato ao banho-maria, para evaporação do excedente etanólico e transcorridas 24 horas este foi congelado, para finalmente submetê-lo à ação do liofilizador.

3.3 Determinações químicas

3.3.1 Taninos

A presença de taninos no EHFCC foi realizada baseando-se na capacidade de precipitação dos alcalóides pelos taninos. Uma solução do EFHCC (10 mg/mL) foi adicionada a uma solução de cafeína 2%. A formação de precipitado branco indica a presença de taninos na amostra (OKUDA, MORI e SHIOTA, 1982; MEKHFI et al., 2006).

3.3.2 Fenóis totais

A quantidade de fenóis totais, realizada em triplicata, foi determinada adicionando-se 200 µL da solução de EHFCC (300, 100, 50 e 25 µg/mL em etanol 80%) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteau* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 µL de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico/ grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300, 100, 75, 25 e 10 µg/mL).

3.3.3 Flavonóides

Foram preparadas soluções do extrato (300, 200, 100 e 50 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio ($AlCl_3$) com contração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata,

resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL) diluída em etanol 80%.

3.3.3.1 Identificação de rutina e quercetina

Foi aplicada em uma placa de vidro uma suspensão de sílica-gel G, em seguida deixadas secar ao ar à temperatura ambiente e, posteriormente, ativadas a 120 ° C em estufa durante 30 minutos. As amostras foram aplicadas com auxílio de capilares, para desenvolvimento do cromatograma em camada delgada (CCD), a placa foi colocada em uma cuba de vidro que continha solvente (eluente). Depois de completa saturação com a fase móvel a placa foi colocada na cuba parar o desenvolvimento da CCD, o solvente ascende pela placa por capilaridade até que tenha percorrido uma distância de cerca de 6 cm do ponto de aplicação da amostra, numa placa de 8 cm.

A placa é removida da cuba e marcada no local em que o solvente atingiu seu ápice. Após a evaporação e secagem ao ar do solvente na placa, a mesma foi observada sob luz UV (GENNARO, 2000). O sistema solvente utilizado foi n-butanol- acetato de etila – água (10:10:4) (SHARMA et al., 2012).

O cálculo do valor de fator de retenção (Rf) é feito com a seguinte fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distância percorrida pelo soluto da frente de solvente}}{\text{Distância percorrida pelo solvente}}$$

Forma utilizados soluções de rutina e quercetina (1 mg/mL) para sevirem como padrão de comparação com o extrato.

3.3.4 Atividade antioxidante

Foram preparadas soluções com diferentes concentrações do EHFCC (250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL) em triplicata. Em um tubo foram misturados 100 µL da solução do extrato e 3,9 mL de solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,06 mM e homogenizado com agitador de tubos, procedimento realizado em ambiente escuro. Para o branco, a amostra foi substituída por 100 µL de metanol. As leituras foram realizadas utilizando um filtro de comprimento de onda de 520 nm e repetidas a cada minuto até que foi observada a estabilização da leitura.

A curva padrão foi determinada realizando leituras no mesmo comprimento

de onda (515 nm), porém com soluções de DPPH em diferentes concentrações (10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, 50 μM e 60 μM), sendo o branco determinado por metanol (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; RUFINO et al., 2007)

3.4 Atividade contra bactérias

3.4.1 Microorganismos

Os experimentos foram realizados com as linhagens padrões bacterianas de *Staphylococus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e multirresistentes como *S. aureus* 358 (SA358) e *E. coli* 27 (EC27), todas obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os estoques de culturas foram mantidos em *Agar Heart Infusion* (HIA) e armazenado em refrigerador.

3.4.2 Antibióticos

Para avaliar a atividade moduladora da ação antibiótica do EHFCC foram utilizados antibióticos de diversas classes (amoxicilina, ciprofloxacino, cefalexina, oxacilina, claritromicina e benzilpenicilina).

3.4.3 Teste de difusão em meio sólido

A técnica de difusão em meio sólido, que utiliza poços em ágar, foi realizada para rastrear a atividade antibacteriana. Para isso, 1 ml da suspensão de bacteriana (cerca de 10^5 ufc/ml) foi uniformemente espalhado placas de Petri estéreis de *agar Muller-Hinton* e 50 μl de EHFCC (10mg/mL) depositados nos poços de ágar com 6 mm de diâmetro. O sistema foi incubado a 37 ° C durante 24 horas. Foi considerada atividade antibacteriana positiva quando observada zona de inibição de crescimento com diâmetro ≥ a 10 mm (COUTINHO et al., 2008).

3.4.4 Concentração Inibitória Mínima – CIM

A concentração inibitória mínima (CIM μg/mL) foi determinada em caldo *Brain Heart Infusion (*BHI 10%) pelo método de microdiluição, usando uma suspensão de 10^5 UFC/mL e uma concentração do EHFCC 1024 μg/mL diluída sequencialmente pelo título 1:2 (JAVADPOUR et al., 1996). A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum

crescimento foi observado. Para a avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8 para EC27 e SA358. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C utilizando para a leitura das cepas bacterianas o corante resarzurina. A manutenção da coloração azul indica o não crescimento bacteriano; já o surgimento de coloração vermelha evidencia o crescimento bacteriano. Os teste foi realizado em triplicata.

3.4.5 Modulação

Para avaliar a atividade moduladora da ação de antibióticos os testes foram realizados em triplicata. Cada poço da placa de microdiluição continha EHFCC em concentração subinibitória de forma constante e os antibióticos em concentrações decrescentes, partindo de 2500 μg/mL, diluídas sequencialmente 1:2 até 2,4 μg/mL, sendo misturadas em caldo BHI 10%, este preparado com água destilada estéril. Em cada poço foi adicionado 100 μL de caldo BHI 10% como 128 μg/mL do EHFCC e inóculo bacteriano (10^5 UFC/mL). No primeiro poço adicionou-se 100 μL de uma solução do antibiótico com 5000 μg/mL procedendo a diluição sequencial com título 1:2 nos poços seguintes. As placas foram incubadas a 37°C e lidas depois de 24h, com revelação pela resarzurina como descrito na determinação do CIM. O teste foi realizado em triplicata.

3.5 Animais utilizados

Foram utilizados para os testes, camundongos *Swiss (Mus musculos)* de ambos os sexos, com peso entre 20 e 30 gramas e ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos com peso entre 190 e 260 gramas, para realização do teste de úlcera crônica, todos oriundos da unidade de contenção de animais da Universidade Regional do Cariri (URCA). Os mesmos foram conduzidos para a sala de experimentação dois dias antes dos testes e mantidos em ciclo claro e escuro de 12 horas e com água e ração *ad libitum*, mesmas condições observadas na unidade de contenção. No dia anterior aos ensaios, os animais serão identificados e a ração retirada 15 horas antes da experimentação, sendo a pesagem dos animais, a primeira etapa de cada teste.

O trabalho realizou-se de acordo com as normas de Bioética reconhecidas pela lei: 11.794/08, a qual regulamenta o uso de animais para procedimentos científicos e foi autorizado pelo Comitê de Experimentação e Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri CEUA/URCA, sob o número de protocolo 01/2011;

3.6 Indução de lesão gástrica

3.6.1 Por Etanol

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=6) controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com omeprazol 30mg/Kg v.o.) e os grupos *triagem* (pré-tratados com diferentes doses do EHFCC, 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução das lesões por etanol (0,2 mL/animal, via oral) (ROBERT et al., 1979). Depois de 30 minutos os animais foram sacrificados por decapitação, os estômagos removidos e abertos pela curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e preparados para avaliação e quantificação das lesões gástricas por meio informatizado, descrito no item 3.7.1.

3.6.2 Por etanol acidificado com ácido clorídrico (HCl)

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=6): controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com omeprazol 30mg/Kg) e os grupos *triagem* (pré-tratados com diferentes doses do EHFCC, 50, 100 e 200 mg/Kg). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução das lesões por etanol acidificado (0,2mL da solução 0,3M de HCl em etanol 60%/animal, v.o.). Depois de 1 hora os animais foram sacrificados por decapitação, os estômagos removidos e abertos pela curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e preparados para avaliação e quantificação das lesões gástricas por meio informatizado, descrito no item 3.7.1.

3.6.3 Por Indometacina

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=6): controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com omeprazol 30mg/Kg) e os grupos *triagem* (pré-tratados com diferentes doses do EHFCC, 50, 100 e 200 mg/Kg). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução das lesões por administração subcutânea de indometacina (10mg/Kg), transcorridas 3 horas da administração do agente lesivo foram repetidos os pré-tratamentos. Depois de 6 horas da administração da indometacina, os animais foram sacrificados por decapitação, os estômagos removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e preparados para avaliação e quantificação das lesões gástricas pelo método de pontuação.

3.6.4 Teste de barreira física

Os camundongos foram divididos em 3 grupos (n=6) e pré-tratados com salina 0,9% (0,1 mL/10g), EHFCC (100 mg/Kg v.o.) e EHFCC (100 mg/Kg, i.p.). Depois de 30 minutos da administração do EHFCC i.p. ou 1 hora da administração da salina e do EHFCC v.o., foi administrado etanol 96% (0,2 mL/animal).

Decorridos 30 minutos após a administração do etanol os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e abertos pela curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e preparados para avaliação e quantificação das lesões gástricas por meio informatizado, descrito no item 3.7.1.

3.6.5 Úlcera gástrica induzida por ácido acético

Foram utilizados 3 grupos de animais (n = 6). Os ratos foram pesados e restringidos de ração sólida por 24 horas. Após este período, os animais foram anestesiados (xilazina - 6 mg/kg e ketamina - 60 mg/kg, i.p.) sendo realizada a laparotomia abdominal na região epigástrica. Após a exposição do estômago, foi injetado na camada subserosa da parede externa do órgão, 50 μL da solução de ácido acético 30% (face anterior) e 50 μL de solução salina 0,9% (face posterior) do estômago. O local da injeção foi pressionado delicadamente por 30 segundos para que não houvesse extravasamento do material injetado. Em seguida, o estômago foi lavado cuidadosamente com solução salina 0,9% e a parede abdominal suturada (OKABE e AMAGASE, 2005). Após a recuperação da anestesia, os animais foram devidamente identificados e transferidos para gaiolas, e alimentados normalmente. Dois dias após a cirurgia inicia-se o tratamento que deverá ser realizado uma vez ao dia durante 14 dias. Os três grupos foram tratados por via oral respectivamente com o EHFCC, solução salina 0,9% e omeprazol 30 mg/Kg. No 15º dia todos os grupos serão sacrificados (pentobarbital sódico, 140 mg/kg, i.p), a parede abdominal exposta, os estômagos retirados, fotografados, determinadas as áreas das lesões gástricas (Software ImageJ), sendo em sguida, processados para análise histomorfométrica.

3.7 Avaliação macroscópica das lesões gástricas

3.7.1 Método informatizado

Depois de lavados, os estômagos retirados foram comprimidos entre duas lâminas, escaneados e digitaliazados, com posterior análise por planimetria computadorizada

através de *software* (ImageJ). Sendo a área lesionada expressa em percentagem em relação à área total da mucosa gástrica.

3.7.2 Método de pontuação

A pontuação foi determinada realizando-se uma quantificação das lesões gástricas que geraram um valor de acordo com a tabela abaixo (ZINKIEVICH et al., 2010):

Tabela 1 - Sistema de determinação de pontuação de lesão gástrica

Pontos	Tipo de lesão
0	Ausente
1	Leves edemas
2	Edema e hemorragia
3	1 -2 Úlceras pontuais
4	1-2 Úlceras extensas
5	Várias úlceras pontuais
6	Úlceras extensas visível em toda mucosa

3.8 Estudo do possível mecanismo envolvido na atividade gastroprotetora do EHFCC

3.8.1 Verificação da participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=8 animais) pré-tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), EHFCC (100 mg/kg; v.o.) 1h antes ou capsaicina (5 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes de receberem etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

Foi administrado aos animais dos demais grupos capsazepina (5 mg/kg; i.p.), a fim de investigar a participação dos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina, 30 min antes do EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou capsaicina (5 mg/kg; i.p.). Após 30 min. da administração da capsaicina e 1 h após a administração do EHFCC os animais receberam etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.) (MATSUDA, LI e YOSHIKAWA, 1999).

Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol, e a área de lesão gástrica glandular determinada pelo método descrito anteriormente no item 3.7.1.

3.8.2 Teste de participação de canais de potássio ATP-dependentes

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=8 animais) e pré-tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), EHFCC (100 mg/kg; v.o.) 1 hora antes ou diazóxido (3 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes de receberem etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

A participação de canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor do EHFCC foi evidenciado pela administração prévia de glibenclamida (5 mg/kg; i.p.), bloqueador seletivo de canais de K^+-ATP-dependente, 30 minutos antes da administração do EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou diazóxido (3 mg/kg; i.p.). Após 30 minutos da administração de diazóxido e 1 h após a administração do EHFCC os animais receberam etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.)(RAHGOZAR et al., 2001).

Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados e a área de lesão gástrica determinada como descrito anteriormente em 3.7.1.

3.8.3 Verificação da ação do óxido nítrico

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=8 animais) e pré-tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), EHFCC (100 mg/kg; v.o.) 1 hora antes ou L-arginina (600 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes de receberem etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

A determinação do papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EHFCC foi evidenciado pela administração prévia de L-NAME (20 mg/kg; i.p.), um inibidor inespecífico das enzimas óxido nítrico sintetase, 30 minutos antes da administração do EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou L-arginina (600 mg/kg; i.p.). Após 30 minutos da administração da L-arginina e 1 h após a administração do EHFCC os animais receberam etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.) (MATSUDA, LI e YOSHIKAWA, 1999).

Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados e a área de lesão gástrica determinada como descrito anteriormente em 3.7.1

3.8.4 Testes de determinação do envolvimento das prostaglandinas

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=8 animais) e pré-tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou misoprostol (0,016 mg/kg; v.o.) 1 hora antes de receberem etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

O envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EHFCC foi

evidenciado pela administração prévia de indometacina (10 mg/kg; v.o.), inibidor das COX, 2 h antes da administração do EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou misoprostol (0,016 mg/kg; v.o.). Após 1 h da administração do EHFCC ou misoprostol os animais receberam etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados e a área de lesão gástrica determinada como descrito anteriormente em 3.7.1.

3.8.5 Determinação de muco da mucosa gástrica

Os camundongos foram divididos em 4 grupos pré-tratados com salina 0,9% (0,1 mL/10g), EHFCC (100 mg/Kg v.o.), misoprostol (0,016 mg/Kg v.o.) e EHFCC (100 mg/Kg, i.p.). Depois de 30 minutos da administração do EHFCC i.p. ou 1 hora da administração da salina, do misoprostol e do EHFCC v.o., foi administrado etanol 96% (0,2 mL/animal).

Decorridos 30 minutos após a administração do etanol os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e abertos pela curvatura maior, lavados cuidadosamente com solução salina 0,9%. A mucosa gástrica foi retirada, pesada e incubada em 10 ml de solução de *Alcian blue* 0,1%, onde permaneceu corando por 2 horas. O excesso de *Alcian blue* foi removido com sacarose 0,25 mol/L (duas vezes lavadas sucessivamente, a primeira por 15 min e a segunda durante 45 min). O corante complexado com o muco da parede glandular foi extraído com 5 ml de cloreto de magnésio (0,5 mol/L), agitando-se intermitentemente, cada segmento, por 1 minuto a cada 30 min durante 2h. Foram misturados 3 ml da solução sobrenadante azul obtida com 3 ml de éter etílico e agitou-se vigorosamente até a formação de uma emulsão. Centrifugou-se a 3600 rpm durante 10 min para separar a fase aquosa, descartando-se o resíduo. A concentração de *Alcian blue* nas amostras, foi determinada por leitura espectrofotométrica a 598 nm.

A concentração de *Alcian blue* ligado ao muco foi determinada por interpolação na curva padrão do corante e expressa em μg de *Alcian blue*/ml/g de tecido.

3.8.6 Envolvimento dos receptores noradrenergicos α_2

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=8 animais) e pré-tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou clonidina (0,05 mg/kg; v.o.) 1 hora antes de receberem etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

A participação dos receptores $\alpha_2$noradrenérgicos no efeito gastroprotetor do EHFCC foi evidenciado pela administração prévia de ioimbina (2 mg/kg; i.p.) 20 minutos antes da administração do EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou clonidina (0,05 mg/kg; v.o.). Após 1h da administração do EHFCC ou clonidina os animais receberam etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados e a área de lesão gástrica determinada como descrito anteriormente em 3.7.1.

3.8.7 Envolvimento dos receptores histamínicos (H_2)

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=8 animais) e pré-tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), EHFCC (100 mg/kg; v.o.) 1 h antes ou ranitidina (40 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes de receberem etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

A participação dos receptores histamínicos H_2 no efeito gastroprotetor do EHFCC foi evidenciado pela administração prévia de histamina (2 mg/kg; s.c.) 30 minutos antes da administração do EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou ranitidina (40 mg/kg; v.o.). Após 30 minutos da administração de ranitidina e 1 h após a administração do EHFCC os animais receberam etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados e a área de lesão gástrica determinada como descrito anteriormente em 3.7.1.

3.8.8 Envolvimento dos receptores opióides

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n=8 animais) e pré-tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), EHFCC (100 mg/kg; v.o.) 1 h antes ou morfina (5 mg/kg; s.c.) 30 minutos antes de receberem etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

A participação dos receptores opióides no efeito gastroprotetor do EHFCC foi evidenciado pela administração prévia de naloxana (2 mg/kg; i.p.) 15 minutos antes da administração do EHFCC (100 mg/kg; v.o.) ou morfina (5 mg/kg; s.c.). Após 30 minutos da administração de morfina e 1 h após a administração do EHFCC os animais receberam etanol 96% (0,2 mL/animal; v.o.).

Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados e a área de lesão gástrica determinada como

descrito anteriormente em 3.7.1.

3.9 Avaliação da motilidade gastrointestinal

3.9.1 Trânsito intestinal

Os camundongos foram divididos em 3 grupos (n=6) tratados com EHFCC 100 mg/Kg, solução salina 0,9% (0,1mL/10g), atropina (0,01g/Kg) e 1h depois administrado um marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05% em carboxicelulose 1,5%). O sacrifício dos animais foi realizado 30 minutos após a administração do marcador, realizando-se a retirada do intestino delgado e medindo o comprimento total do mesmo e a distância percorrida pelo marcador, determinando assim uma porcentagem de motilidade do marcador.

3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos em valores de média e ± erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância de uma via (ANOVA). Quando o valor de *F* for significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Newman-Keuls. As análises foram realizadas usando *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 Resultados e discussão

4.1 Coleta do material botânico e preparação do extrato

Foi obtido 2975g de folhas secas de *Caryocar coriaceum* WITTM., que posteriormente foram submetidas à extração com água e etanol (1:1, v/v), essa mistura foi filtrada para eliminação dos resíduos sólidos e o filtrado, concentrado em rotaevaporador, seguindo-se o processo de liofilização. Ao final, obteve-se 493g de EHFCC, gerando um rendimento de 16,57 %.

4.2 Determinações químicas

4.2.1 Taninos

O precipitado branco formado pela adição da solução do extrato à solução de cafeína 2% confirma a presença de taninos na composição do EHFCC.

Os taninos apresentam várias atividades biológicas e farmacológicas como, combate a diarreias, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais e processos inflamatórios de forma geral (DUFRESNE e FARNWORTH, 2001).

4.2.2 Fenóis totais e flavonóides

Com a determinação da curva de calibração, realizada com a leitura da absorbância das diversas concentrações de ácido gálico, foi obtida a seguinte equação: $y = 0,0076x + 0,1354$ e $R^2 = 0,9979$, a qual pode ser aplicada para a determinação dos fenóis totais em equivalentes mg de ácido gálico/ g de extrato.

A curva de calibração para determinação dos flavonóides foi obtida após a leitura das diversas soluções de quercetina com concentração determinada, gerando a seguinte equação: $y = 0,0349x + 0,2073$ e $R^2 = 0,9884$, aplicadas para determinação dos flavonóides como mg equivalente de quercetina/ g de extrato.

O extrato das folhas de *Caryocar coriaceum* WITTM. possui altos teores de polifenóis (901,31 mg/g) e flavonóides (89,68 mg/g) (tabela 2) que podem ser responsáveis pelo efeito antioxidante do extrato.

A determinação de fenóis totais ou compostos fenólicos é a determinação de flavonóides, tocoferóis e ácidos fenólicos juntos, que são antioxidantes naturais; outros são os

carotenóides, ácido ascórbico e compostos de nitrogênio (alcalóides, derivados de clorofila, aminoácidos e aminas). Os flavonóides possuem várias atividades biológicas como antioxidante, anti-ulcerogênicos, antibacterianos, antivirais, antagonistas GABA, hepatoprotetores e antifúngicos (VERMA e PRATAP, 2010).

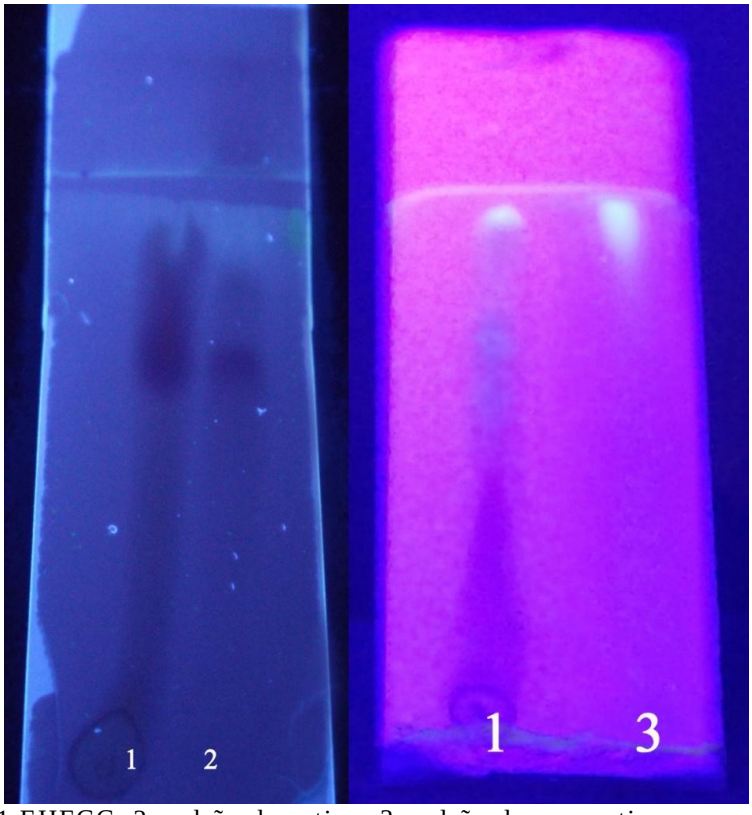
4.2.2.1 Identificação de rutina e quercetina

A revelação das placas pela luz UV mostrou um ponto com fluorescência intensa no extrato com correspondência de Rf e coloração ao padrão de quercetina, já o padrão de rutina mostrou valor do Rf semelhante a um ponto do EHFCC (tabela 2 e figura 7), confirmando a existência de rutina e quercetina na composição do extrato.

Tabela 2 - Comparação dos Rf da CCD do EHFCC com os padrões de rutina e quercetina.

Número da amostra	Amostra	Rf	Coloração
1	EHFCC	0,65	Marron
		0,93	Amarelo
2	Padrão de rutina	0,65	Marron
3	Padrão de quercetina	0,94	Amarelo

Figura 7 - Foto das placas de CCD com EHFCC, padrão de rutina e padrão de quercetina.



1 EHFCC; 2 padrão de rutina; 3 padrão de quercetina

Este resultado é reforçado pelos dados de ARARUNA (2011) que comprovaram por cromatografia liquida de alta eficiência a presença de rutina, quercetina, ácido clorogênico, ácido caféico e ácido gálico.

4.2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi mensurada com o método do DPPH e o resultado expresso em um valor de CE_{50} 9,7 µg/mL.

Os radicais livres são capazes de causar vários danos às células, danificando proteínas e material genético – ácido desoxirribonucleíco (ADN) – causando assim prejuízo celular e apoptose. Agentes antioxidantes são responsáveis pela defesa celular contra a ação dos radicais livres. O DPPH é um radical livre estável, que em solução metanólica apresenta sua forma oxidada, produzindo coloração e pode ser mensurada a uma absorbância de 515 nm (MARXEN et al., 2007). Esse radical quando em contato com substâncias doadoras de hidrogênio, passa a apresentar-se na sua forma reduzida, que é menos reativa, fazendo com que ocorra perda da coloração da solução contendo DPPH e consequente redução da absorbância (MOLYNEUX, 2004). O EHFCC apresentou a capacidade se sequestrar o radical livre DPPH, confirmando seu potencial antioxidante, que pode ser explicado pela sua composição em rutina (LA CASA et al., 2000), ácido clorogênico (SATO et al., 2011) e quercetina (KLEEMANN et al., 2011) com atividade antioxidante já comprovada. Segundo VELIOGLU et al. (1998) a ação antioxidante de compostos fenólicos no combate aos radicais livres é atribuída ao número e posições de hidroxilas doadoras de hidrogênio, ou a outros grupos doadores de hidrogênio (-NH e SH) (MUSTAFA et al., 2010). Neste sentido, os flavonoides, que pertencem à classe fenólica, podem atuar sequestrando radicais e/ou no processo de quelação (POURMORAD, HOSSEINIMEHR e SHAHABIMAJD, 2009). Dentre as ações biológicas destaca-se a atividade anti-ulcerogênica promovida pela ação antioxidante, que combate os radicais livres capazes de causar vários danos celulares, como, por exemplo, o NO produzido em processos inflamatórios, produzido pela iNOS.

4.3 Atividade antibacteriana

4.3.1 Teste da difusão e meio sólido

O teste de difusão em meio sólido é uma triagem para seleção de produtos naturais ou outras substâncias como agente antibacteriano, sendo considerada como atividade

antibacteriana, resultados de testes com halos de inibição de crescimento ≥ 10 mm (COUTINHO et al., 2008). Para o EHFCC os resultados foram ≥ 10 mm com todas as linhagens de bactérias testadas. A atividade antibacteriana observada no teste pode ser explicada pela composição do extrato, rico em flavonóides. Essa atividade antibacteriana supracitada é relacionada justamente aos compostos presentes no extrato, uma vez que os taninos promovem ação antimicrobiana (MONTEIRO et al., 2005). As infecções microbianas nos vegetais podem ocasionar o aumento da produção de metabólitos secundários como mecanismo de defesa, diversos metabólitos, como taninos, flavonóides entre outros já tiveram atividades antimicrobianas comprovadas (SINGH et al., 2008), neste sentido, os flavonoides apresentam um potencial terapêutico para utilização no tratamento de infecções bacterianas em seres humanos (DIXON, DEY e LAMB, 1983).

4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima revelaram um valor do CIM ≥ 1024 μg/mL (tabela 4) para todas as bactérias testadas, reforçado os dados demonstrados por ARARUNA (2011) que indicam não haver uma atividade antimicrobiana clinicamente relevante, de forma isolada.

Tabela 3- Contração inibitória mínima (mg/mL) do EHFCC

Bactéria (linhagem)	**MIC1**
*Staphylococus aureus (*ATCC 25923)	≥ 1024
*Escherichia coli (*ATCC 10536)	≥ 1024
*Pseudomonas aeruginosa (*ATCC 15442)	≥ 1024
S. aureus 358 (SA358)	≥ 1024
E. coli 27 (EC27)	≥ 1024

Atualmente várias pesquisas objetivam evidenciar substâncias ou extratos capazes de superar ou diminuir a resistência microbiana aos antibióticos, gerando informações valiosas e muitos produtos naturais mostraram-se eficientes nesse aspecto (HEMAISWARYA, KRUTHIVENTI e DOBLE, 2008; DEMAIN, 2009; HEMAISWARYA e DOBLE, 2009; RODRIGUES, COSTA e COUTINHO, 2009; SIBANDA e OKOH, 2010; JOUNG et al., 2012). A pesquisa por moduladores de resistência de origem natural representam uma nova e importante dimensão na problemática da resistência microbiana (SIBANDA e OKOH, 2010).

4.3.3 Modulação

O teste de modulação objetiva verificar a influência da concentração subinibitória do EHFCC sobre a ação de diversas concentrações dos antibióticos frente às cepas bacterianas multirresistentes. Para tanto, a concentração subinibitória, determinado por CIM/8, apresentou a concentração de 128 µg/mL a ser usada nos ensaios de modulação da resistência bacteriana. Os resultados demonstraram que somente a benzilpenicilina apresentou sinergismo na modulação da frete a *E. coli* 27, com redução de 2500 para 625 µg/mL modificando o fenótipo bacteriano de resistente para sensível, como pode ser visto nas tabelas 5 e 6.

Tabela 4 - Valores de concentração de inibição de crescimento dos antibióticos (µg/mL) frete à *S. aureus* 358 (SA358)

Antibiotico	Controle µg/mL*	Associação µg/mL**
Amoxicilina	2500	2500
Claritromicina	2,4	2,4
Ciprofloxacino	2,4	2,4
Benzilpenicilina	1250	1250
Cefalexina	9,7	9,7
Oxacilina	39	39

* concentração do antibiótico; ** concentração do antibiótico em associação com a concentração subinibitória do EHFCC.

Tabela 5 - Valores de concentração de inibição de crescimento dos antibióticos (µg/mL) frente a *E. coli* 27 (EC27)

Antibiotico	Controle µg/mL*	Associação µg/mL**
Amoxicilina	156	156
Claritromicina	2,4	2,4
Ciprofloxacino	2,4	2,4
Benzilpenicilina	2500	625
Cefalexina	156	156
Oxacilina	1250	1250

* concentração do antibiótico; ** concentração do antibiótico em associação com a concentração subinibitória do EHFCC.

A combinação de drogas, como por exemplo β-lactâmicos com inibidores de β-lactamase, tem se tornado uma estratégia fundamental para superar os mecanismos de resistência aos antibióticos (HEMAISWARYA, KRUTHIVENTI e DOBLE, 2008). A

associação de antibióticos com produtos naturais tem-se mostrado como opção importante no combate à resistência, já que os produtos naturais podem agir sinergicamente com os antibióticos, dificultando assim, o desenvolvimento de resistência (COUTINHO et al., 2008; SARAIVA et al., 2011). Várias pesquisas que isolaram e identificaram estruturas de flavonóides, revelaram atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana (SINGH et al., 2008; CUSHNIE e LAMB, 2011; MANIMOZHI, SANKARANARAYANAN e SAMPATHKUMAR, 2012). O EHFCC, provavelmente por possuir na sua composição polifenóis e flavonóides, demonstrou um efeito modulador significativo em associação com a benzilpenicilina frente a *E. coli* 27. Este efeito pode ser explicado, em parte, pela alteração da permeabilidade da membrana celular, causado pela presença dos metabólitos secundários, que permitiria uma maior disponibilidade do antibiótico no seu local de ação. Outras possibilidades para a explicação deste efeito podem ser a ação dos flavonoides como inibidores de β-lactamase (BOUSSOUALIM, MEZIANE-CHERIF e BAGHIANI, 2011), a inibição de bombas de efluxo, inibição de expressão gênica e alteração do sítio de ação.

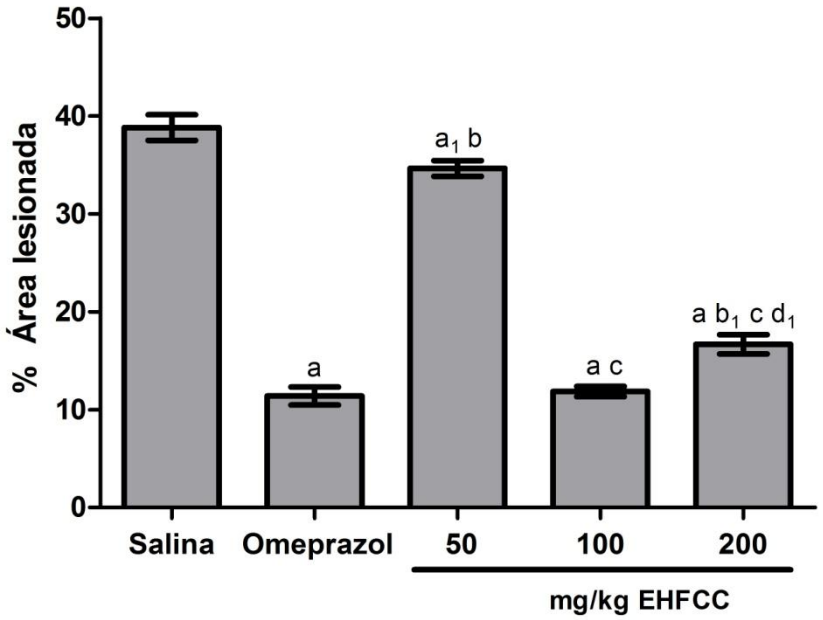
Além disso, diversos trabalhos demonstraram a sinergia entre os flavonóides ativos, bem como entre os flavonóides e quimioterápicos existentes (CUSHNIE e LAMB, 2005). O modo de ação das substâncias isoladas a partir de produtos naturais é significativamente diferente do modo de ação do produto natural, diferindo também do modo de ação da associação entre produto natural e quimioterápico. Essa divergência pode ser explicada pelo fato dos vários componentes do EHFCC, agirem em alvos diferentes e/ou interagindo entre si, resultando assim em um efeito sinérgico (WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009; ALLEN et al., 2010).

4.4 Lesão gástrica induzida por etanol

A indução de úlcera por etanol 96% produz as lesões por alterar a microcirculação da mucosa, isquemia e produção de radicais livres, além de liberar endotelina, promover a desgranulação de mastócitos, inibir a produção de prostaglandinas e diminuir a produção de muco. Os estômagos dos animais do grupo que recebeu apenas salina apresentaram a maior porcentagem de área lesionada devido ação do etanol administrado, com média de 38,83 ± 1,31. O grupo que recebeu omeprazol (30mg/Kg), medicamento utilizado como referência, apresentou média 11,39 ± 0,91 com significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo salina. Os grupos que receberam 50, 100 e 200 mg/Kg de EHFCC apresentaram respectivamente as médias 34,65 ± 0,79, 11,87± 0,53 e 16,68 ± 0,97, . Todos os grupos apresentaram significância em relação ao controle salina, onde as doses de 100 e 200

mg/Kg de EHFCC com significância de p<0,001 e a dose de 50 mg/Kg um p< 0,01 como pode ser observado na tabela do anexo e figura 8.

Figura 8 – Gráfico do efeito de EHFCC e omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (50, 100 e 200 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol 96% (0,2 mL/animal v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. $^{a1}p<0,o05$; $^{a}p<0,001$ *versus* salina; $^{b1}p<0,005$; $^{b}p<0,001$ *versus* omeprazol; $^{c}p<0,001$ *versus* 50; $^{d1}p<0,005$ *versus* 100 (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

A utilização de plantas medicinais para tratamento de doenças gástricas é prática comum entre diversas populações, sendo estas plantas consideradas uma ótima fonte para o desenvolvimento de novos fármacos ou novos medicamentos. Várias classes de substâncias já tiveram sua atividade comprovada no combate a doenças gástricas, como polifenóis, flavonóides, taninos, xantonas, alcalóides e saponinas (MATSUDA, LI e YOSHIKAWA, 1999; ZAYACHKIVSKA et al., 2005; DEKANSKI et al., 2009; DE-FARIA et al., 2011; AWAAD, EL-MELIGY e SOLIMAN, 2012; DE JESUS et al., 2012).

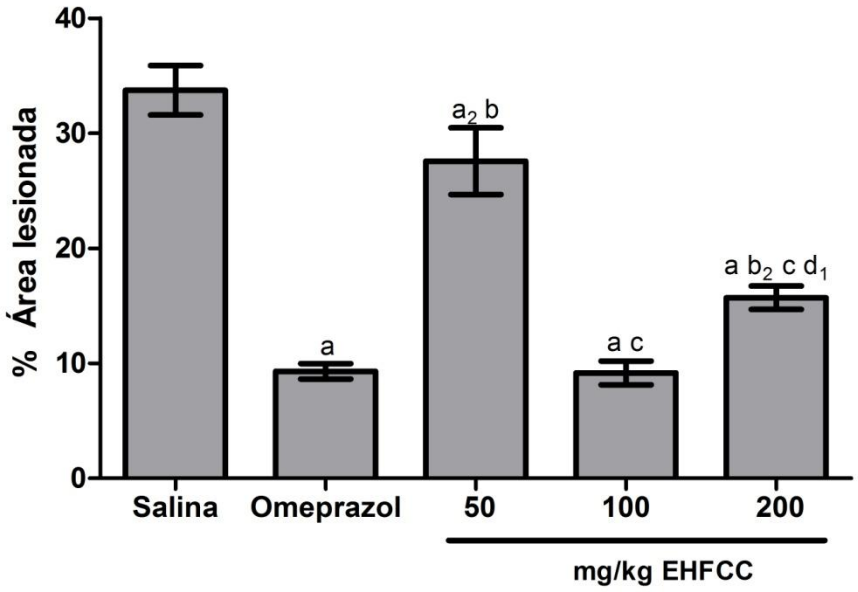
O EHFCC possui na sua composição polifenóis, flavonóides e taninos (ARARUNA, 2011) que podem atuar no mecanismo de gastroproteção induzido pelos modelos experimentais. Os resultados do teste de indução de lesão por etanol comprovaram a atividade gastroprotetora desse extrato, revelando a dose de 100 mg/Kg como a mais eficiente em relação a redução da porcentagem de área lesionada, com valor de 69,43 %, semelhante

estatisticamente a redução obtida pelo omeprazol (70,67 %), o fármaco de referência utilizado nesse ensaio.

4.5 Lesões gástricas induzidas por etanol acidificado

A indução por etanol acidificado utiliza o mesmo mecanismo de lesão apresentado pela indução por etanol absoluto, porém, com o aditivo da ação do HCl, um dos agentes agressores endógenos da mucosa gástrica. Os estômagos dos animais do grupo que recebeu apenas salina apresentaram a maior porcentagem de área lesionada devido à ação do etanol administrado, com média de 33,73 ± 2,14. O grupo que recebeu omeprazol (30mg/Kg), medicamento utilizado como referência, apresentou média 9,29 ± 0,66 com significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo salina. Os grupos que receberam 50, 100 e 200 mg/Kg de EHFCC apresentaram respectivamente as médias 27,58 ± 2,90, 9,16 ± 1,03 e 15,70 ± 1,01. Os grupos que receberam 100 e 200 mg/Kg de EHFCC apresentaram significância de $p<0,001$ e o grupo que recebeu 50 mg/Kg de EHFCC, uma significância de $p< 0,05$ em comparação com o grupo salina como pode ser obervado na figura 9.

Figura 9 – Gráfico do efeito de EHFCC e omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado em camundongos.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (50, 100 e 200 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol 96% (0,2 mL/animal v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. $^{a2}p<0,05$; $^{a}p<0,001$ *versus* salina; $^{b2}p<0,05$; $^{b}p<0,001$ *versus* omeprazol; $^{c}p<0,001$ *versus* 50; $^{d1}p<0,005$ *versus* 100 (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

Assim como no modelo anterior, a dose de 100mg/Kg de EHFCC apresentou a maior eficiência na redução da porcentagem da área lesionada. A lesão provocada por este modelo está diretamente relacionada à produção endógena de compostos sulfidrílicos e aumento de peróxidos. Compostos como cisteína, glutationa reduzida (GSH) e cisteamina promovem citoproteção contra este tipo de indução (MIZUI, SHIMONO e DOTEUCHI, 1987). Portanto a atividade antioxidante do EFHCC explica, em parte, a gastroproteção promovida pelo mesmo, e como já relatado os compostos majoritários, rutina, ácido clorogênico e quercetina, possuem ação antioxidante.

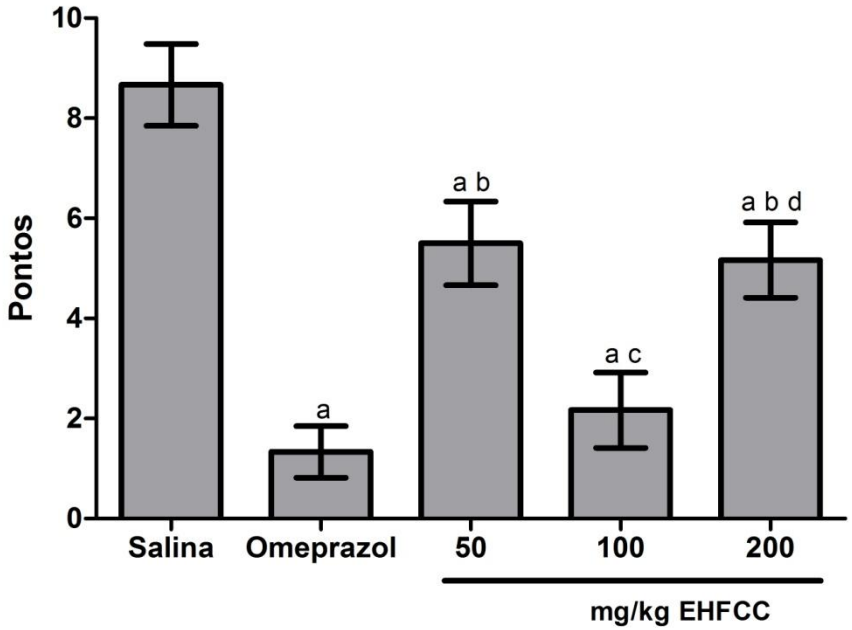
4.6 Lesão gástrica induzida por indometacina

Os dados dos testes de indução de lesão gástrica por indometacina são expressos em valores de média ± erro padrão da média da pontuação registrada na análise e são observados na figura10.

Os estômagos dos animais do grupo que recebeu apenas salina apresentaram a maior pontuação, devido ação da indometacina inibindo a ação das cicloxigenases, com média de 8,66 ± 0,33. O grupo que recebeu omeprazol (30mg/Kg), medicamento utilizado como referência, apresentou média 1,33 ± 0,21 com significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo salina.

Os grupos que receberam 50, 100 e 200 mg/Kg de EHFCC apresentaram respectivamente as médias 5,50 ± 0,34, 2,16 ± 0,30 e 5,16 ± 0,30. Os grupo que receberam 100 e 200 mg/Kg de EHFCC apresentaram uma significância de $p<0,001$ e o grupo que recebeu 50 mg/Kg de EHFCC, uma significância de $p< 0,05$ em comparação com o grupo salina.

Figura 10 – Gráfico do efeito de EHFCC e omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina em camundongos.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da pontuação média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (50, 100 e 200 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de indometacina (10 mg/Kg s.c.), três horas após a administração da indometacina os pré-tratamentos foram repetidos. Os animais foram sacrificados 6 horas após a administração da indometacinal. [a]p<0,001 *versus* salina; [b]p<0,001 *versus* omeprazol; [c]p<0,001 *versus* 50; [d]p<0,001 *versus* 100 (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

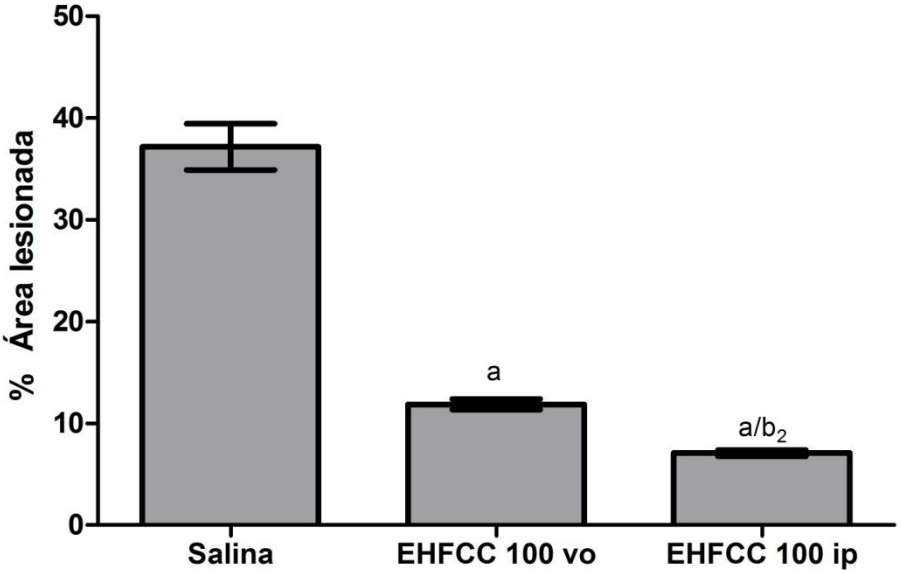
A dose de 100mg/Kg de EHFCC novamente apresentou-se como a dose mais eficiente em relação à gastroproteção, agora, frente à indução por indometacina, um AINE, podendo ser feita a associação com o principal mecanismo envolvido na toxicidade gástrica dos AINES, o bloqueio da síntese de prostaglandinas pela inibição das COX. A produção de muco, o fluxo sanguíneo, a reparação celular e a imunidade da mucosa são alguns dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica mediados ou influenciados pela síntese de prostaglandinas (MUSUMBA, PRITCHARD e PIRMOHAMED, 2009).

4.7 Teste de barreira física

O teste de barreira permite evidenciar a possível contribuição de uma proteção física (mecânica) promovida pelos compostos presente no EHFCC. Os estômagos dos animais do grupo que recebeu apenas salina apresentaram a maior porcentagem de área lesionada devido ação do etanol administrado, com média de 37,13 ± 2,26. O grupo que

recebeu EHFCC via oral (100mg/Kg), apresentou média 11,39 ± 0,91 com significância de p < 0,001 em relação ao grupo salina, mesma significância observado no grupo que recebeu a mesma dose do extrato, porém, por via intra peritoneal (7,07 ± 0,28) assim como observados na figura 11.

Figura 11 – Gráfico do efeito de EHFCC administrado via oral e intraperitoneal no modelo de indução de lesão gástrica em camundongos.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (100 mg/kg) foram administrados via oral (v.o.) e EHFCC (100 mg/kg) por via intraperitoneal, 1 hora ou 30 minutos, respectivamente, antes da administração de etanol 96% (0,2 mL/animal v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. a = $p<0,001$ *versus* salina e $b_2 = p < 0,01$ vs EHFCC v.o.(ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

Os grupos que receberam o EHFCC, tanto oral como intraperitonealmente, demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo salina, permitindo concluir que a contribuição na proteção gástrica promovida por formação de uma barreira física não é considerável. A diferença estatística entre os grupos EHFCC, oral e intraperitoneal, este último com valores de média menor e $p <0,01$, quando comparado com o primeiro, evidenciou uma maior proteção, devido a um aumento da disponibilidade do extrato pela administração intraperitoneal, reforçando ainda mais a hipótese de atividade sistêmica, confirmando uma pequena participação da ação tópica na proteção da mucosa gástrica (ROWLAND, 1972; GIBALDI e PERRIER, 1975).

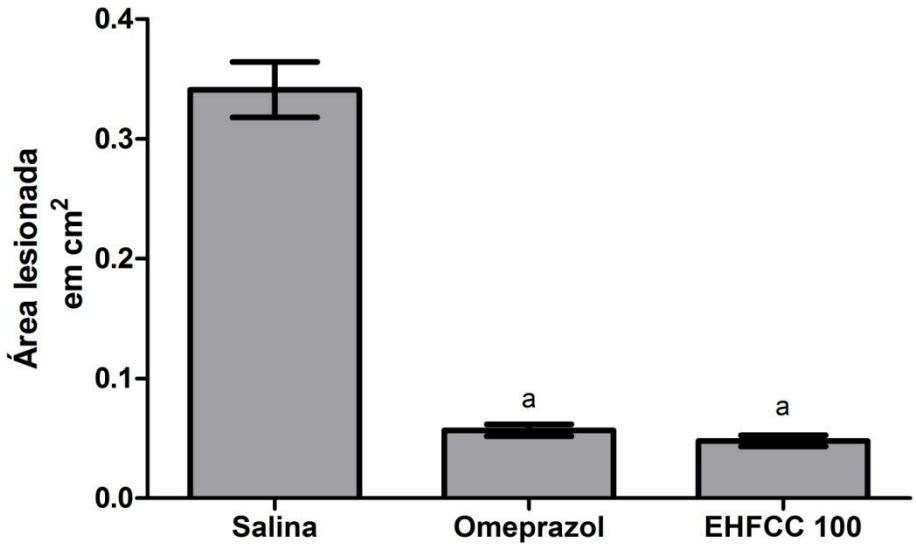
Analisando os dados dos três modelos utilizados como *triagem* e o teste de barreira física, fica evidente que a dose mais efetiva, entre as testadas, foi a dose de 100

mg/kg, sendo esta eleita para os demais ensaios. Essa escolha foi baseada no fato desta ser a dose de menor concentração e maior ação efetiva.

4.8 Indução de úlcera crônica

O modelo de úlceração crônica por indução de ácido acético e é frequentemente utilizado para elucidar o mecanismo de cicatrização da úlcera e os que mais se aproxima da patogenia humana (OKABE, AMAGASE e TAKEUCHI, 2010). Após 14 dias de tratamento o grupo salina apresentou os maiores valores de média de área úlcerada em cm^2, 0,341 ± 0,023, o grupo omeprazol e o grupo EHFCC apresentaram respectivamente, 0,056 ± 0,005 e 0,047 ± 0,004, como pode ser visto na figura 12.

Figura 12- Gráfico do efeito de EFHCC e omeprazol no modelo de indução de úlcera crônica por ácido acético.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área úlcerada média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (100 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, diariamente, durante 14 dias, 2 dias após a laparotomia pra indução da úlcera crônica. Os animais foram sacrificados no 15º dia após o início dos tratamentos. a = $p<0,001$ *versus* salina (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

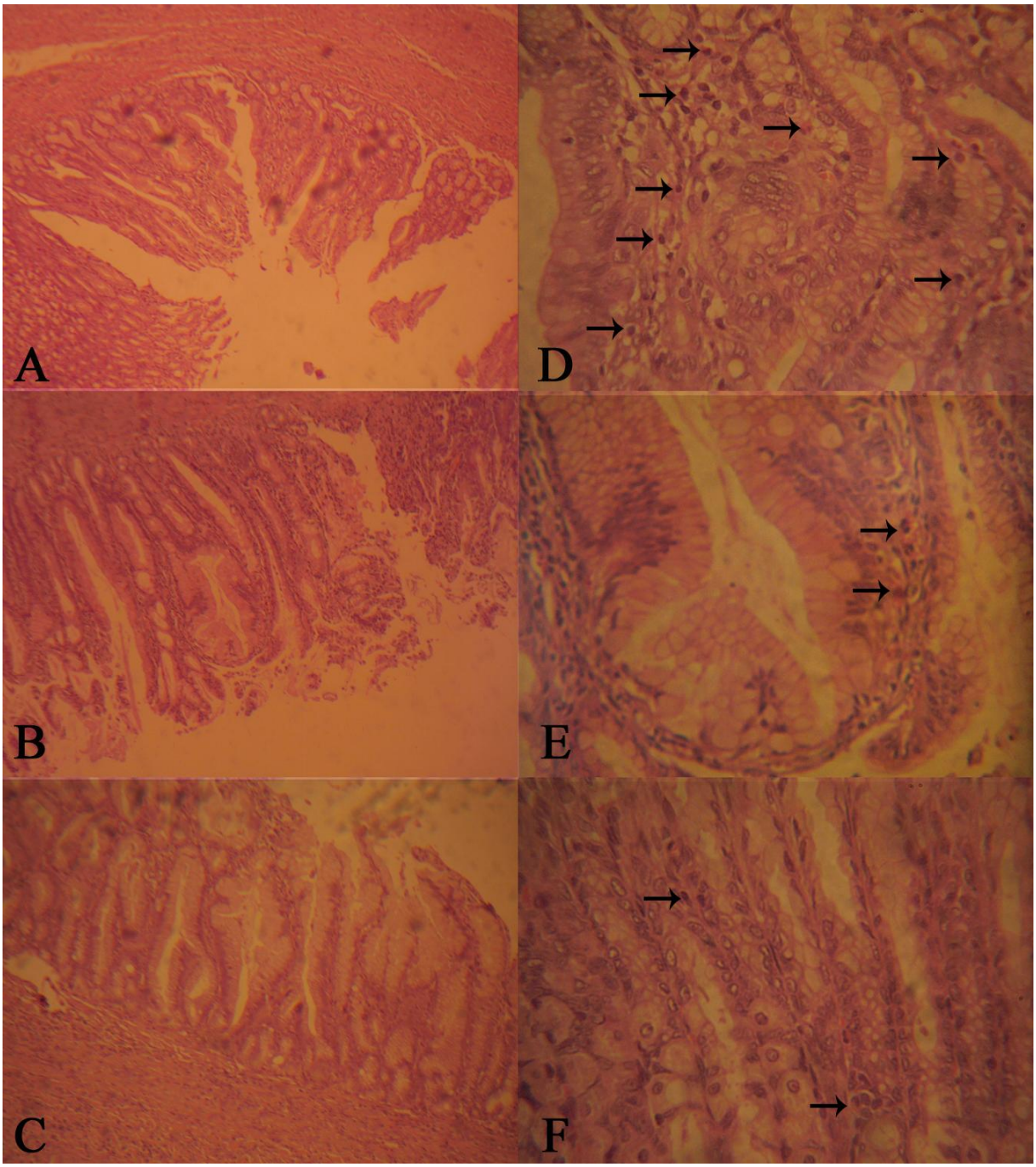
Foi possível observar a ação cicatrizante do EHFCC sobre as úlceras crônicas produzidas por ácido acético. Segundo YAMAMOTO, OKADA e OKABE (1984), os inibidores da bomba de prótons, como omeprazol, promovem a cicatrização de úlceras gástricas induzidas por ácido acético. A cura da úlcera gástrica compreende inflamação,

proliferação celular, regeneração epitelial, a reconstrução da glândula, formação de tecido de granulação, neovascularização (formação de novos vasos sanguíneos), interações entre as várias células e a matriz e remodelação dos tecidos, o que resulta na formação de cicatrizes. Todos estes eventos são controlados pelas citocinas, fatores de crescimento e hormônios gastrointestinais, incluindo a gastrina, CCK, e peptídeos orexígenos como grelina, orexina-A e obestatina, bem como prostaglandinas geradas pela COX2. Além de células da mucosa, as células progenitoras são potencialmente importantes para a cicatrização da úlcera, contribuindo para a regeneração dos componentes do tecido epitelial e conjuntivo, e neovascularização (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012).

O EHFCC agiu de forma similar ao omeprazol, atuando provavelmente pelo poder de cicatrização dos taninos, assim como demonstrado no trabalho de DE JESUS et al. (2012). Outra contribuição pode ser ocasionada pelos flavonoides que podem ao ativar hormônios e fatores de crescimento responsáveis pela proliferação de células epiteliais, migração, a re-epitelização e regeneração das glândulas gástricas durante a cicatrização da úlcera gástrica (LIU, ZHU e HUANG, 2012).

Esse estudo conseguiu verificar que o tratamento com EHFCC tem eficiência semelhante ao tratamento realizado com o inibidor da bomba de prótons, o omeprazol. Esses resultados foram confirmados pelos achados histológicos, havendo atividade fibroblástica menor nos grupos EHFCC (figura 13 F) e omeprazol (figura 13 E) em comparação com o grupo tratado com salina (figura 13 D), que também apresentou intensa presença de polimorfonucleares, indicados pelas setas.

Figura 13 - Fotografias dos cortes histológicos das lesões induzidas por ácido acético.



A, B e **C**: fotografisa da lâmina mostrando a lesão com aumento de 100x. **D** grupo salina. **E** grupo omeprazol. **F** grupo EHFCC 400x. As setas indicam a presença de fibroblastos e polimorfonucleares.

Com os resultados obtidos por meio dos métodos supralistados, fica confirmada a atividade gastroprotetora do EHFCC, com redução da área lesionada em todos os modelos testados. A comprovação dessa atividade biológica pode ser atribuída à presença de polifenóis, flavonóides e taninos na composição do EHFCC. A rutina, uma flavona natural e composto majoritário, com atividade antiinflamatória e propriedades vasoativas (GARCÍA-

LAFUENTE et al., 2009; THEOHARIDES, 2010), pode ser a principal responsável pela ação gastroprotetora, já que a mesma demonstra essa atividade com dose de 200 mg/Kg e quando testada de forma isolada, resulta em diminuição da área lesada por indução com etanol 50% (v/v), reduzindo os níveis de lipoperoxidação e aumentado a atividade da enzima antioxidante glutationa peroxidase (GSH-Px) (LA CASA et al., 2000). O ácido clorogênico possui atividade antioxidante (SATO et al., 2011), anti-obesidade (CHO et al., 2010) e gastroprotetora, diminuindo a área lesionada nos modelos induzidos por etanol acidificado e AINEs. Esta proteção pode ser explicada por meio da inibição da migração leucocitária, aumento da atividade do sistema enzimático antioxidante e bloqueio da produção de TNF-α e leucotrieno B4 (SHIMOYAMA et al., 2012). A quercetina, um polifenol, apresenta atividade antioxidante e antiinflamatória atua inibindo a mobilização leucocitária por interferir na expressão de VCAM-1 e selectina E (KLEEMANN et al., 2011) diminuindo o número de leucócitos presentes na área lesionada o que contribui provavelmente para o efeito gastroprotetor do extrato, suprimindo a ação inflamatória.

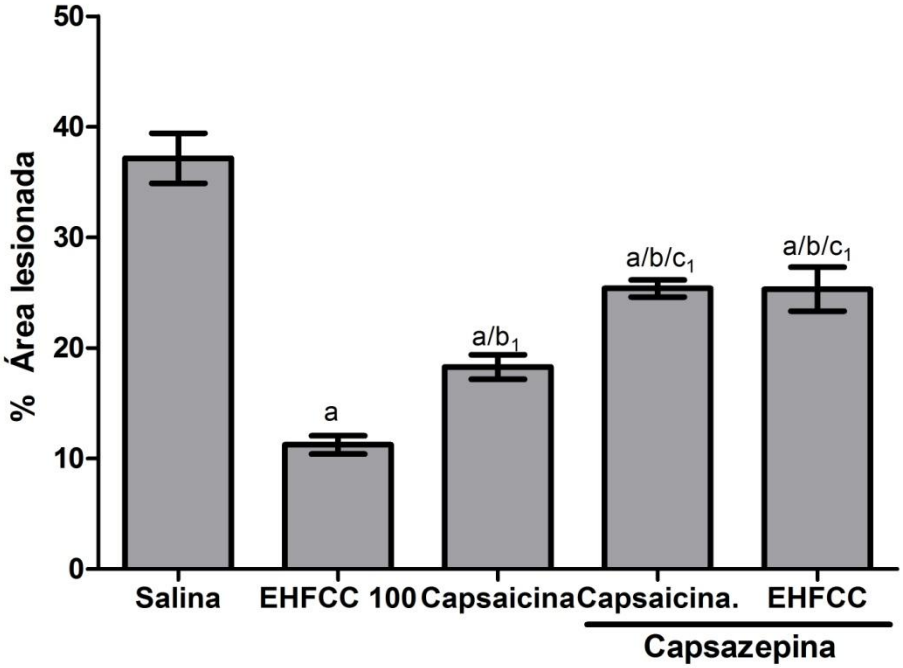
4.9 Elucidação do mecanismo de ação

4.9.1 Verificação da participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina.

Os neurônios aferentes primários sensíveis a capsaicina exercem atividades no sistema gástrico por regularem a secreção de bicarbonato das células superficiais da mucosa gástrica funcionando como agente protetor da mucosa gástrica, pois estimula a liberação de bicarbonado, um importante agente protetor (MORAIS et al., 2010). O grupo que recebeu tratamento com salina foi o que apresentou maior índice percentual de área lesionada, confirmando assim a capacidade de indução de lesão gástrica promovida pelo etanol 96%, com valor de 37,16 ± 2,26. Os grupos tratados como EHFCC (100 mg/Kg, v.o.) e capsaicina (5mg/Kg, i.p.) demonstraram respectivamente, 11,24 ± 1,09 e 18,27 ± 0,76 como valores de média da porcentagem de área lesionada.

A elucidação do envolvimento dos receptores TRPV1 sensíveis a capsaicina foi evidenciado realizando um pré-tratamento com capsazepina (5 mg/Kg, i.p.) antes da aplicação de capsaicina e EHFCC, que resultaram em valores de média de 25,38 ± 0,76 e 25,32 ± 1,98, respectivamente, como pode ser observado na figura 14.

Figura 14 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com capsazepina na proteção gástrica promovida pelo EHFCC.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área úlcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [b1] p< 0,01 *versus* grupo EHFCC. [c1] p< 0,01 *versus* grupo capsaicina.

A capsaicina é capaz de aumentar a secreção de bicarbonato e pode também, no trato gastrointestinal, regular as contrações e esvaziamento gástrico, sendo assim considerada um agente protetor contra lesões gástricas produzidas por etanol, AINEs e ácido clorídrico (ERICSON et al., 2009). A utilização de um antagonista específico dos receptores vanilóides, a capsazepina, inibe esta rota, diminuindo assim a atividade gastroprotetora dependente deste mecanismo, fato observado no resultado do grupo tratado com capsazepina e capsaicina, com o aumento da área lesionada quando comparado com o grupo que recebeu apenas capsaicina. Assim, foi possível determinar o envolvimento dos receptores aferentes primários sensíveis a capsaicina, pois o grupo tratado com capsazepina e EHFCC não mostrou diferença estatística do grupo que recebeu capsazepina e capsaicina. Desta forma, os compostos presentes no EHFCC apresentam ação por esta via mecanística que pode ser explicada pelo envolvimento dos receptores vanilóides na produção de NO por ativação da eNOS presente nos neurônios aferentes contribuindo ainda mais para o efeito gastroprotetor.

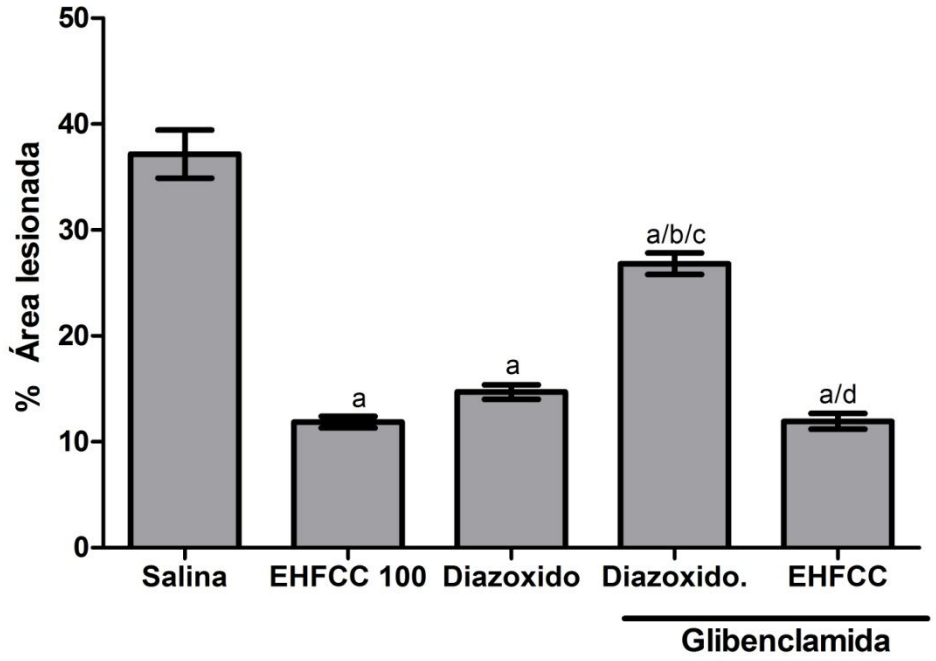
4.9.2 Participação de canais de potássio dependentes de ATP

Os canais de K^+ possuem papel importante na secreção gástrica

principalmente por regularem o fluxo deste íon, que é substrato da bomba de prótons responsável pela secreção do íon H^+. Neste modelo o grupo salina foi o que apresentou maior índice percentual de área lesionada, confirmando assim a capacidade de indução de lesão gástrica promovida pelo etanol 96%, com valor de 37,16 ± 2,26. Os grupos tratados como EHFCC (100 mg/Kg, v.o.) e diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) demonstraram respectivamente, 11,87 ± 0,53 e 14,70 ± 0,67 como valores de média da porcentagem de área lesionada.

A participação de canais de potássio ATP-dependentes foi evidenciada realizando-se um pré-tratamento com glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.), bloqueador destes canais, antes da aplicação de diazóxido e EHFCC, que resultaram em valores de média de 26,82 ± 1,01 e 11,93 ± 0,74, respectivamente, como pode ser observado na figura 15.

Figura 15 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com glibenclamida na gastroproteção promovida pelo EFHCC.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área úlcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo diazóxido. [d] p< 0,001 *versus* grupo glibenclamida/diazóxido.

Os canais de K^+ ATP dependente são um complexo formado por duas proteínas diferentes, que intermedeiam a condutância de K^+ sendo inibido fisiologicamemte por ATP. Esta inibição resulta na hiperpolarização celular por aumentar a concentração de K^+ intracelular. O canal também pode ser modulado por ácidos graxos, pH, NO, redução dos níveis de SH, entre outros (GROVER e GARLID, 2000).

O aumento da concentração de K^+ intracelular ativa canais de K^+ voltagem

dependentes, como o KCNQ1, que irá disponibilizar estes íons na luz canalículo tornado-os disponíveis para utilização pela bomba de prótons, que realiza a troca de K^+ extracelular por H^+ intracelular, aumentando assim a secreção de ácido (SONG et al., 2009; SCHUBERT, 2010).

O bloqueio destes canais diminui localmente os níveis de CGRP, um agente protetor liberado a partir de neurônios aferentes da mucosa, e possivelmente diminuem o fluxo sanguíneo (PESKAR, EHRLICH e PESKAR, 2002), controle esse também realizado por canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} (MEDEIROS et al., 2009). Os canais KNCQ1, canais de K^+ voltagem dependente, são fundamentais para o fornecimento de K^+ na luz do canalículo glandular tanto no estado de repouso, quanto na secreção de ácido, função praticamente exclusiva deste tipo de canal, não sendo substituído de forma eficaz por nenhum outro tipo de canal de K^+(JESPERSEN, GRUNNET e OLESEN, 2005; SONG et al., 2009).

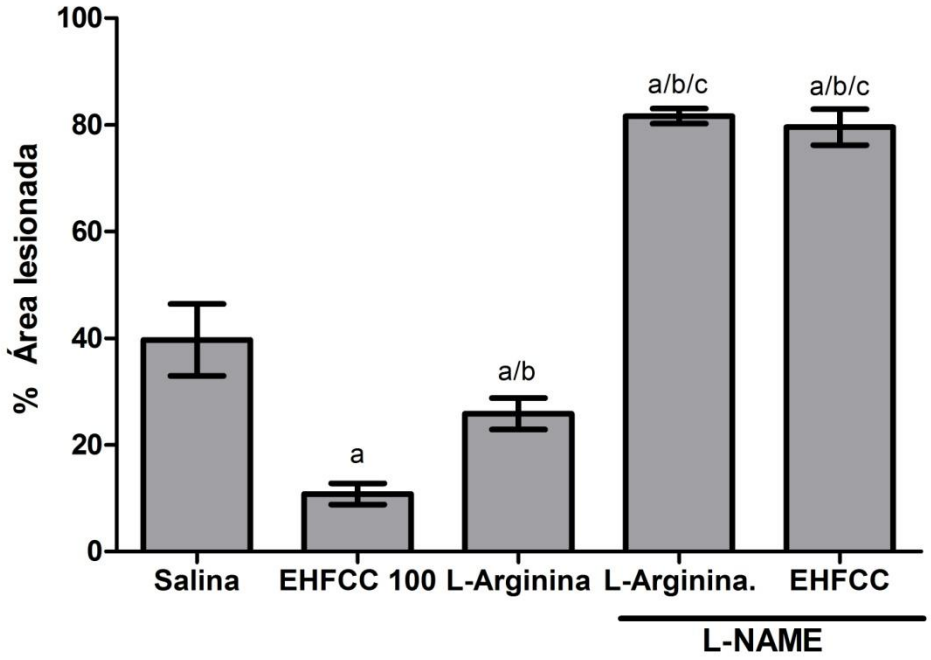
Os canais de K^+ dependentes de ATP quando, bloqueados pela glibenclamida, observou-se a reversão do efeito da proteção promovida pelo diazóxido, um ativador destes canais, porém não foi capaz de alterar o efeito gastroprotetor promovido pelo EHFCC, demonstrado assim o não envolvimento de canais de K^+ dependentes de ATP como mecanismo de ação do extrato.

4.9.3 Participação do óxido nítrico

O NO produzido pelas NOS constitutivas a partir de L-arginina, tem papel fundamental no tônus vascular local, agindo como vasodilatador e com isso promovendo proteção da mucosa gástrica, pois aumenta a disponibilidade de bicarbonato oriundo da circulação, por ser responsável pelo controle do fluxo sanguíneo gástrico e microcirculação (UNEYAMA et al., 2009; MORAIS et al., 2010). Neste modelo de mecanismo, o grupo que recebeu tratamento com salina apresentou maior índice percentual de área lesionada, confirmando assim a capacidade de indução de lesão gástrica promovida pelo etanol 96%, com valor de 36,69 ± 2,37. Os grupos tratados com o EHFCC (100 mg/Kg, v.o.) e L-arginina (600 mg/Kg, i.p.) demonstraram respectivamente, 10,80 ± 0,71 e 25,85 ± 1,19 com valores de média da porcentagem de área lesionada.

O participação do NO foi evidenciada realizando um pré-tratamento com L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) antes da aplicação de L-arginina e EHFCC, que resultou em valores de média de 81,63 ± 0,57 e 79,56 ± 1,38, respectivamente, como pode ser observado na figura 16.

Figura 16 - Gráfico do efeito do pré-tratamento como L-NAME na gastroproteção promovida pelo EHFCC.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área úlcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo L-arginina.

Drogas que promovem a síntese de NO, como L-arginina, causam proteção gástrica, ao contrário de drogas que inibem a sua síntese, exacerbando as lesões gástricas produzidas pelo etanol. Nesse estudo foi possível verificar que a gastroproteção promovida tanto pela L-arginina como pelo EHFCC foi revertida pelo pré-tratamento com L-NAME (inibidor não seletivo de NOS), indicando, assim, a participação fundamental da síntese de NO no mecanismo gastroprotetor.

A ação antioxidante da rutina, ácido clorogênico e quercetina, pode contribuir para atividade gastroprotetora do EHFCC na indução de úlceras gástricas influenciadas pela administração de L-NAME.

O NO, produzido pelas isoformas constitutivas da NOS, atua como agentes de promoção da gastroproteção por aumentar o fluxo sanguíneo (BERG et al., 2004), bicarbonato e secreção de muco (BROWN, HANSON e WHITTLE, 1992; LEFER e LEFER, 1999).

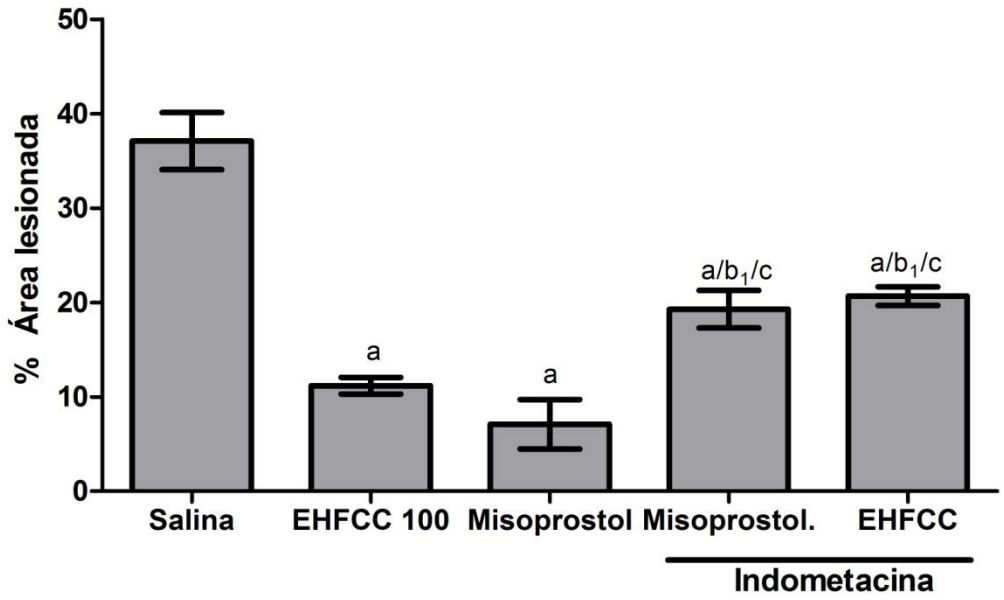
4.9.4 Envolvimento das prostaglandinas

A capacidade das prostaglandinas em estimular a produção de muco e

bicarbonato, bem como diminuir a secreção de ácido, influencia diretamente na cicatrização da úlcera (SCHMASSMANN et al., 2009). Neste ensaio, o grupo que recebeu tratamento com salina foi que o apresentou maior índice percentual de área lesionada, confirmando assim a capacidade de indução de lesão gástrica promovida pelo etanol 96%, com valor de 36,69 ± 2,37. Os grupos tratados como EHFCC (100 mg/Kg, v.o.) e misoprostol (0,016 mg/Kg, v.o.), um análogo sintético da PGE2, demonstraram respectivamente, 11,87 ± 0,53 e 7,09 ± 2,61 como valores de média da porcentagem de área lesionada.

Para o entendimento desta via de ação foi evidenciada realizando um pré-tratamento com indometacina (10 mg/Kg, v.o.), inibidor não específico das COX, antes da aplicação de misoprostol e EHFCC, que resultaram em valores de média de 19,28 ± 1,98 e 20,67 ± 0,99, respectivamente, como pode ser observado na figura 17.

Figura 17 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com indometacina na gastroproteção promovida pelo EFHCC.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área úlcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b1] p< 0,01 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo misoprostol.

A inibição não especifica das COX pelos AINEs, como a indometacina, resulta no bloqueio da síntese de prostaglandinas, de NO, de poliaminas e H_2S, agentes que promovem a proteção da mucosa gástrica, e aumenta a liberação de mediadores pró-inflamatórios, a aderência leucocitária, a produção de EROs e fatores ativadores de apoptose (MUSUMBA, PRITCHARD e PIRMOHAMED, 2009). O misoprostol é um análogo sintético de prostaglandinas, promovendo ação gastroprotetora por aumentar a secreção de muco e

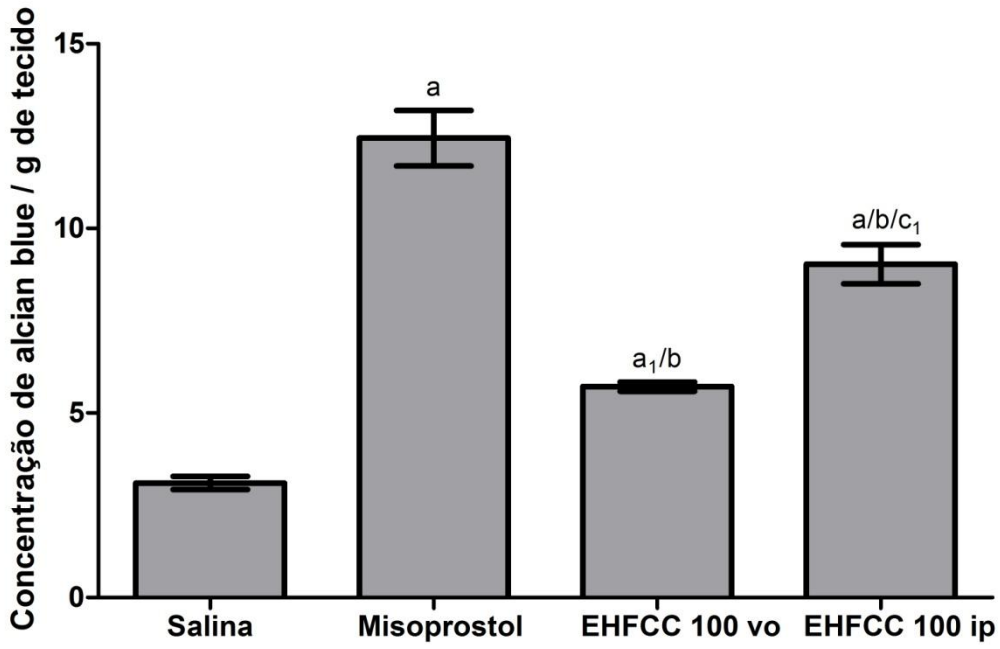
bicarbonato nas células superficiais através de receptores EP3, os mesmos presentes na células oxínticas, porém aclopados a uma proteína G inibitória, que irá diminuir a concentração de AMPc, resultando na diminuição da secreção de ácido. O pré-tratamento com indometacina nos grupos misoprostol e EHFCC, reverteu o seus efeitos protetores indicando o envolvimento das prostaglandinas no mecanismo utilizado pelo EHFCC, em convergência com o resultado obtido por DE S. LIRA et al. (2009).

4.9.5 Determinação de muco

Os resultados foram obtidos pela interpolação da média da leitura das absorbâncias na curva de calibração obtida com diferentes concentrações de *Alcian blue*. Os animais que receberam misotrostol apresentaram aumento significativo na produção de muco ($p < 0,001$) com 12,44 µg de *alcian blue*/g de tecido em comparação ao grupo salina com 3,10 µg de *alcian blue*/g de tecido.

Os grupos do EHFCC, tanto v.o. quanto i.p., também aumentaram a produção de muco, com 5,71 e 9,03 µg de *alcian blue*/g de tecido e $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo salina, como pode ser visualizado na figura 18.

Figura 18 - Efeito do EHFCC e misoprostol sobre os níveis de muco no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol.



Os resultados são expressos como média de µg de *alcian blue*/g de tecido para 6 animais/grupo. [a] $p < 0,001$ *versus* grupo salina. [a1] $p < 0,01$ *versus* grupo salina. [b] $p < 0,001$ *versus* grupo misoprostol. [c1] $p < 0,01$ *versus* grupo EHFCC 100 vo.

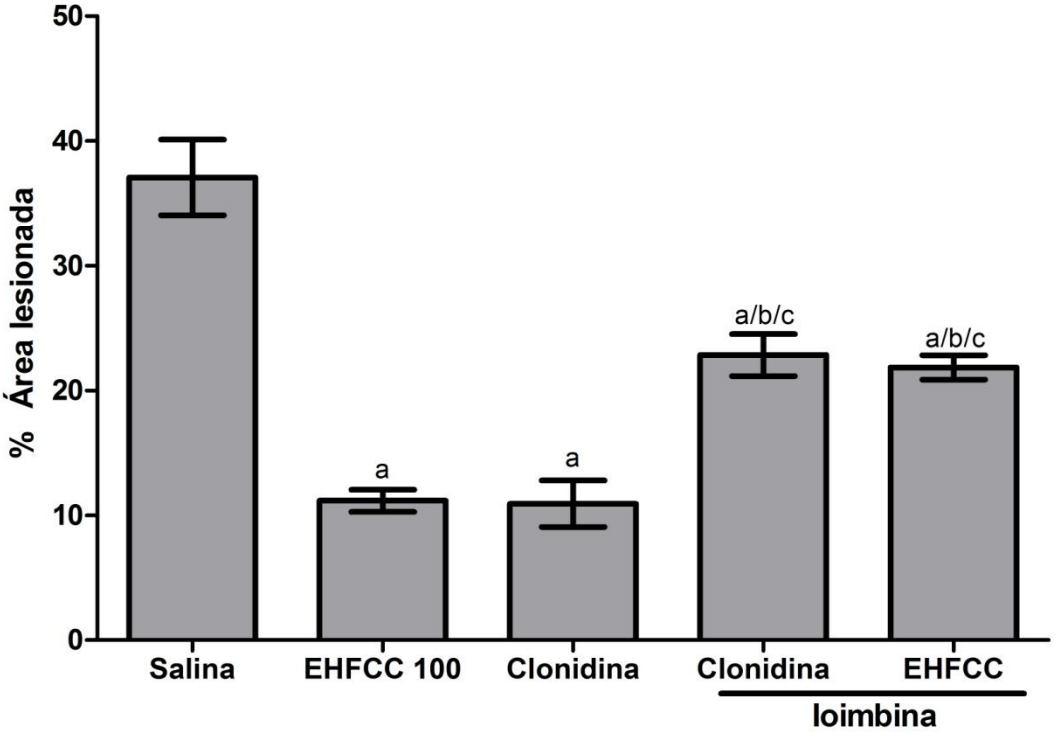
A produção e liberação de muco é diretamente influenciada pelas prostaglandinas, em especial a PGE2 e, indiretamente pelo NO através do aumento da microcirculação gástrica e dos compostos sufidrilas (PAJDO et al., 2011). O misoprostol evidencia uma maior produção e liberação de muco, explicada pelo envolvimento de receptores EP3 nas células gástricas superficiais responsáveis pela produção de muco (TAKAHASHI, TAKEUCHI e OKABE, 1999). Foi observado que o EHFCC, tanto oral quanto intraperitonealmente, produziu aumento estatisticamente significante na produção de muco, comprovando assim a participação dos receptores EP3 no mecanismo de ação do extrato. A administração intraperitoneal resultou em uma maior produção e liberação de muco devido a maior biodisponibilidade proporcionada por esta via em comparação a via oral.

A secreção aumentada do muco nos grupos tratados com EHFCC pode ter sido influenciada por ação do NO, como sugerido por BROWN, HANSON e WHITTLE (1992).

4.9.6 Envolvimento dos receptores noradrenergicos α_2

A presença dos receptores noradrenérgicos α2 presente no sistema nervoso entérico atua em várias funções, como: a determinação dos padrões de movimento do trato gastrointestinal; controlando a secreção de ácido gástrico; regular o movimento do fluido através do epitélio de revestimento, alterando o fluxo sanguíneo local, entre outras. O grupo que recebeu tratamento com salina foi o que apresentou maior índice percentual de área lesionada, confirmando assim a capacidade de indução de lesão gástrica promovida pelo etanol 96%, com valor de 37,16 ± 2,26. Os grupos tratados como EHFCC (100 mg/Kg, v.o.) e clonidina (0,05 mg/Kg, v.o.) demonstraram respectivamente, 10,80 ± 0,79 e 10,93 ± 1,86 como valores de média da porcentagem de área lesionada. A participação dos receptores α_2 noradrenérgicos foi evidenciada realizando um pré-tratamento com ioimbina (2 mg/Kg, i.p.), antes da aplicação de clonidina e EHFCC, que resultou em valores de média de 22,84 ± 1,67 e 21,84 ± 0,98, respectivamente, como pode ser observado na figura 19.

Figura 19 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com ioimbina na gastroproteção promovida pelo EFHCC.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área úlcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo clonidina.

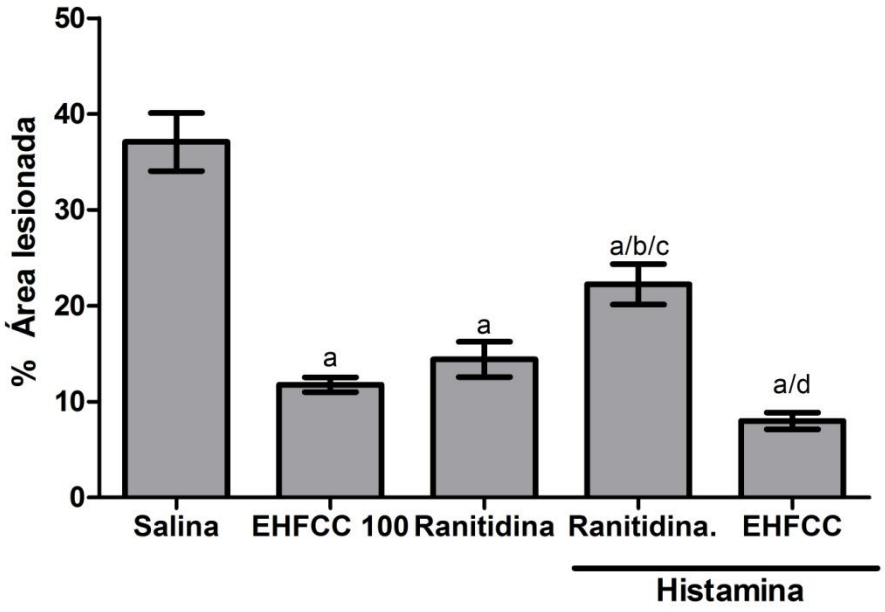
A clonidina em pequenas doses inibe a secreção ácida estimulada pelo nervo vago ou por pentagastrina, e tal inibição é resultado da ação da clonidina em receptores α_2-noradrenérgicos periféricos e centrais. A ioimbina, um antagonista noradrenérgico, estimula a secreção de ácido, e reverte a ação gastroprotetora da clonidina e do EHFCC possibilitando verificar a participação de receptores α_2-adrenérgicos no mecanismo de gastroproteção desenvolvido pelo EHFCC.

Diversos materiais vegetais apresentam interação com receptores α_2-adrenérgicos (SALEEMA et al., 2002). HERRERA e MARHUENDA (1993), relatam o narigin, uma flavonona, como um agonista de receptores α_2-adrenérgicos pós-sinápticos. A quercetina, presente no EHFCC, também atua ativando receptores α_2-adrenérgicos (KAUR, SINGH e CHOPRA, 2005; KAUR, CHOPRA e SINGH, 2007), explicando o envolvimento destes receptores no mecanismo de ação da atividade gastroprotetora do EHFCC.

4.9.7 Envolvimento de receptores histamínicos

A histamina é um dos estimulante mais poderoso conhecido da secreção gástrica que está presente na mucosa gástrica. Neste sentido foi investigado o envolvimento da via histamínica, o grupo que recebeu tratamento com salina apresentou maior índice percentual de área lesionada, confirmando assim a capacidade de indução de lesão gástrica promovida pelo etanol 96%, com valor de 36,80 ± 2,20. Os grupos tratados como EHFCC (100 mg/Kg, v.o.) e ranitidina (40 mg/Kg, i.p.) demonstraram respectivamente, 11,24 ± 0,83 e 14,41 ± 1,84 como valores de média da porcentagem de área lesionada. A participação dos receptores histamínicos foi evidenciada realizando-se um pré-tratamento com histamina (2 mg/Kg, s.c.) antes da aplicação de ranitidina e EHFCC, que resultaram em valores de média de 22,24 ± 2,10 e 7,98 ± 0,86, respectivamente, como pode ser observado na figura 20.

Figura 20 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com histamina na gastroproteção promovida pelo EFHCC.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área úlcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo ranitidina. [d] p< 0,001 *versus* o grupo histamina/ranitidina.

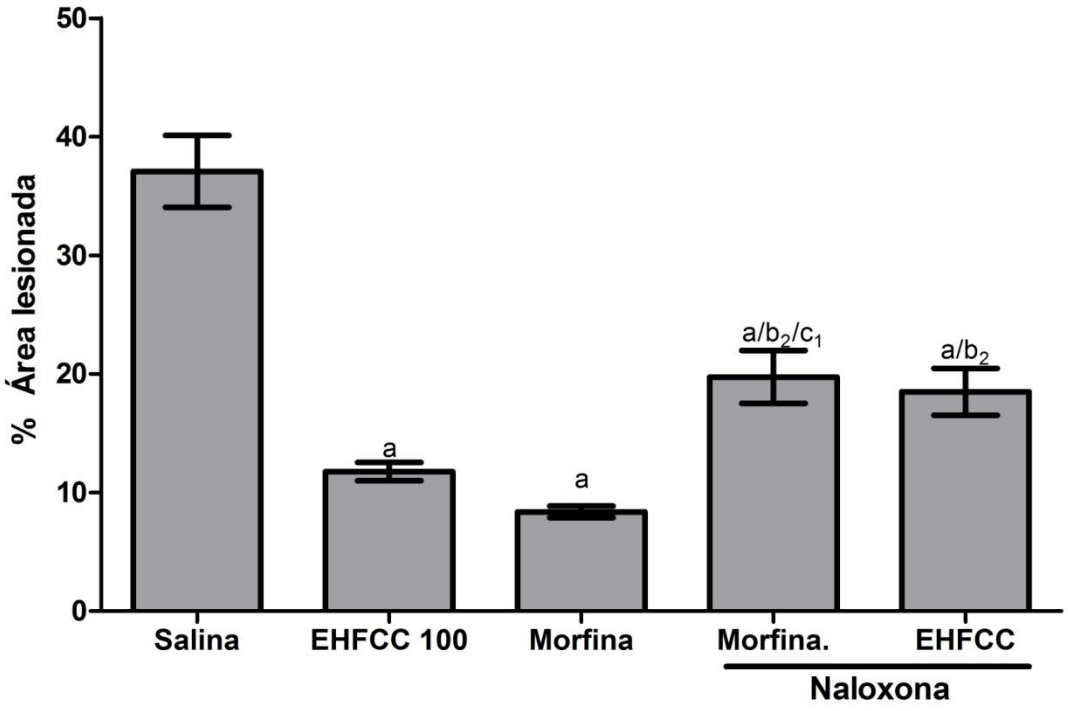
A ranitidina é um antagonista de receptores histamínicos, promovendo gastroproteção por diminuir a ação da histamina, endogenamente liberada pela ECL (KWIECIEN et al., 2001). A histamina atua sobre estes receptores nas células oxínticas, resultando em uma maior conversão de AMP em AMPc, promovendo assim aumento na secreção de ácido (PEREZ-ZOGHBI et al., 2008). Todavia, foi constatado para que o EHFCC

exerça ação gastroprotetora, não há o envolvimento de receptores histamínicos, pois seu efeito não foi revertido pela histamina como pode ser evidenciado com a ranitidina.

4.9.8 Envolvimento dos receptores opióides

Opióides e opiáceos podem afetar uma variedade de funções gastrointestinais, incluindo secreção, motilidade e transporte de eletrólitos e fluidos pela ativação das três principais classes de receptores opioides (ORs), κOR, σOR e δOR. Para investigar a ação desta via um grupo recebeu tratamento com salina e apresentou maior índice percentual de área lesionada, confirmando assim a capacidade de indução de lesão gástrica promovida pelo etanol 96%, com valor de 37,09 ± 3,03. Os grupos tratados como EHFCC (100 mg/Kg, v.o.) e morfina (5 mg/Kg, s.c.) demonstraram respectivamente, 11,77 ± 0,77 e 8,36 ± 0,47 como valores de média da porcentagem de área lesionada. A participação dos receptores opióides foi evidenciada realizando um pré-tratamento com naloxona (2 mg/Kg, i.p.), antes da aplicação de morfina ou EHFCC, que resultaram em valores de média de 19,74 ± 2,23 e 18,49 ± 1,97, respectivamente, como pode ser observado na figura 21.

Figura 21 - Gráfico do efeito do pré-tratamento com naloxona na gastroproteção promovida pelo EFHCC.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área úlcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b2] p< 0,05 *versus* grupo EHFCC. [c1] p< 0,01 *versus* grupo morfina.

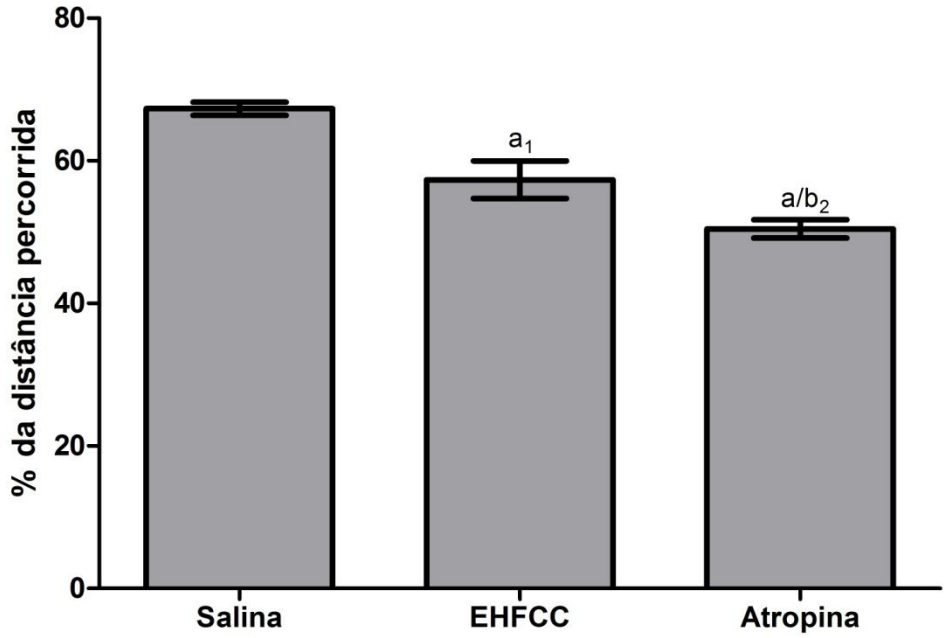
Os opióides endógenos promovem gastroproteção principalmente através da ativação de receptores μ e δ, tanto central como perifericamente (GYIRES et al., 2000; GYIRES, NÉMETH e ZÁDORI, 2012). Assim agentes que possam agir nestes receptores podem promover gastroproteção (STERNINI et al., 2004). A morfina é um agonista opióide e no teste promoveu a redução da área lesionada confirmando assim a influencia de receptores μ e δ na promoção do efeito gastroprotetor. A naloxona é uma antagonista não seletivo, bloqueando os subtipos μ – mu, δ – delta, σ – sigma e κ – kappa, revertendo o efeito de proteção gástrica promovido pela morfina (RODRIGUES E SILVA et al., 2012) e pelo EHFCC, essa reversão evidencia a participação dos receptores opióides no mecanismo utilizado pelo extrato para desenvolver a gastroproteção.

A presença de receptores opiódes do tipo μ, em células superficias da mucosa gástrica, indica o envolvimento direto destes receptores na produção e secreção de muco (ZOGHBI et al., 2006), confirmando assim a participação destes receptores no mecanismo gastroprotetor do EHFCC. A ativação de tais receptores também inibe a inflamação gastrointestinal provavelmente por regular a produção de TNF-α, resultando em menor infiltração de células inflamatórias (SACCANI et al., 2012).

4.10 Avaliação da motilidade gastrointestinal

O ensaio do trânsito intestinal em camundongos é essencial para entender a influência do tratamento com produto natural sobre a motilidade digestiva. Neste ensaio os resultados, expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador, mostraram que a atropina (50,43 %) reduz a motilidade intestinal em relação ao controle (67, 31 %) e que o EHFCC também reduz a motilidade (57,33 %), como pode ser visto na figura 22.

Figura 22 - Gráfico do efeito da administração oral do EHFCC no deslocamento intestinal em camundongos.



Os resultados são expressos como média ± erro padrão médio da porcentagem da distancia percorrida pelo marcador para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [a1] p< 0,01 *versus* grupo salina. [b2] p< 0,05 *versus* grupo EHFCC.

A redução provocada pelo EHFCC pode indicar um provável efeito anticolinérgico e consequentemente de inibição da secreção ácida, já que a acetilcolina interagindo como receptores muscarínicos do subtipo M_3 controlam fisiologicamente os movimentos peristálticos. Movimentos esses que foram diminuídos pela ação da atropina um antagonista muscarínico dos receptores M_3 (BROADLEY e KELLY, 2001; CARVALHO et al., 2012). Ainda sendo possível afirmar que o efeito anticolinérgico na verdade seja um efeito adrenérgico pela ativação de receptores α2-adrenérgicos que também atuam no controle fisiológico da regulação das funções gastro intestinais, a ativação de tais receptores inibem a secreção ácida, como confirmado no teste de envolvimento de receptores α2-adrenérgicos, a motilidade gástrica e o transito intestinal. A ativação destes receptores pré-sinápticos no nervo vago inibe a liberação de acetilcolina promovendo estas respostas e diminuindo o dano à mucosa (FÜLÖP et al., 2005).

Os estudos de SHOBA e THOMAS (2001) e LONGANGA OTSHUDI, VERCRUYSSE e FORIERS (2000) demonstram que taninos e flavonóides, apresentam ação antidiarréica, diminuindo a motilidade do trato intestinal. Estas classes de compostos também são encontradas no extrato em estudo e podem explicar a diminuição da motilidade.

Os testes para determinação do mecanismo da ação antiulcerogênica do EHFCC demonstraram o envolvimento de diferentes vias como: o envolvimento de receptores aferentes primários sensíveis a capsaícina, receptores opióides, receptores α2-adrenérgicos, síntese de NO e estimulação da secreção de muco mediado por prostaglandinas. O envolvimento de todas essas vias pode ser explicado pela complexidade na composição do produto natural e pelo fato das inter-relações entre as vias como observada pela influência do NO.

Com todos estes dados fica evidenciada a atividade gastroprotetora do EHFCC, demonstrando sua eficiência e seu provável mecanismo de ação, este estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas colaborando para a produção de um novo medicamento fitoterápico no tratamento de úlceras pépticas.

5 CONCLUSÃO

5 Conclusão

Foi possível determinar a presença de taninos, a concentração de fenóis totais e flavonóides e confirmar a rutina e quercetina na composição do EHFCC além de determinar sua capacidade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH, atividade esta atribuída aos seus constituintes taninos, rutina, ácido clorogênico e quercetina.

O teste de difusão de sólidos indicou atividade antibacteriana do extrato. O ensaio de microdiluição não demonstrou uma atividade antimicrobiana clinicamente relevante, porém, para a atividade modulatória da resistência bacteriana foi observada ação sinérgica do extrato em associação com a benzilpenicilina frente a *E. coli* 27.

O mecanismo da ação antiulcerogênica do EHFCC demonstrou o envolvimento de diferentes vias como: o envolvimento de receptores aferentes primários sensíveis a capsaícina, receptores opióides, receptores α2-adrenérgicos, síntese de NO e estimulação da secreção de muco mediado por prostaglandinas. O envolvimento de todas essas vias pode ser explicado pela complexidade na composição do produto natural e pelo fato das inter-relações entre as vias como observada pela influência do NO.

Com todos estes dados fica evidenciada a atividade gastroprotetora do EHFCC, demonstrando sua eficiência e seu provável mecanismo de ação, este estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas colaborando para a produção de um novo medicamento fitoterápico no tratamento de úlceras pépticas.

O ensaio de *alcian blue* mostrou que o tratamento pelo EHFCC foi capaz de estimular a produção de muco independente de via de administração. Neste modelo a via intraperitoneal foi mais eficaz nesse aumento.

O trânsito intestinal foi influenciado pela ação do EHFCC reduzindo a capacidade de motilidade. Este efeito pode ser atribuído à ação anticolinérgica e/ou a ativação de receptores α2-adrenérgicos do plexo mesentérico.

REFERÊNCIAS

Referências

ABBAS, A. K.; VINAY KUMAR, M.; FAUSTO, N. **ROBBINS & COTRAN-PATOLOGIA: BASES PATOLOGICAS DAS DOENÇAS**. Elsevier Brazil, 2005. ISBN 8535213910.

ADEYEMI, O. O.; YEMITAN, O. K.; TAIWO, A. E. Neurosedative and muscle-relaxant activities of ethyl acetate extract of *Baphia nitida* AFZEL. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 106, n. 3, p. 312-316, 2006.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 17, p. 114-140, 2007.

ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology,** v. 8, n. 4, p. 251-259, 2010.

ALVES, C. C. E.; BEZERRA, L. M. A.; MATIAS, A. C. D. C. A importância da conservação/ preservação ambiental da Floreta Nacional do Araipe para região do Cariri - Ceará/Brasil. **Revista Geográfica de América Central,** v. 2, n. 47E, 2011.

ARARUNA, M. K. A. **PERFIL QUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS in vivo e in vitro DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÃO METANÓLICA DAS FOLHAS DE Caryocar coriaceum WITTM. (PEQUIZEIRO)**. 2011. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, Universidade Regional do Cariri URCA, Crato - CE.

AWAAD, A.; EL-MELIGY, R.; SOLIMAN, G. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2012.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences,** v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARREIRO, E. J.; DA SILVA BOLZANI, V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova,** v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BERG, A.; REDEEN, S.; ERICSON, A.; SJÖSTRAND, S. E. Nitric oxide-an endogenous inhibitor os gastric acid secretion in isolated human gastric glans. **BMC Gastroenterology**, p. 4-16, 2004.

BORER, J. S.; SIMON, L. S. Cardiovascular and gastrointestinal effects of COX-2 inhibitors and NSAIDs: achieving a balance. **Arthritis Research & Therapy**, p. s14-s22, 2005.

BOUSSOUALIM, N.; MEZIANE-CHERIF, D.; BAGHIANI, A. Kinetic study of different flavonoids as inhibitors of beta-lactamase enzyme. **African Journal of Biochemistry Research,** v. 5, n. 10, p. 321-327, 2011.

BRASIL. ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 48 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília.2004

BROADLEY, K. J.; KELLY, D. R. Muscarinic receptor agonists and antagonists. **Molecules,** v. 6, n. 3, p. 142-193, 2001.

BROWN, J. F.; HANSON, P. J.; WHITTLE, B. J. R. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. **European Journal of Pharmacology,** v. 223, n. 1, p. 103-104, 1992.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia,** v. 18, n. 2, p. 314-9, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D.; BARATELLI, T.; SHUQAIR NSMSAQ, N. E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia,** v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.

CARVALHO, J. E.; MONTEIRO, K. M.; DIAS, I. M. G.; GIBRIM, N. F.; JACOBUCCI, H. B. Efeito de fermentado (utilizado como alimento funcional) sobre: a citoproteção gástrica, atividade anti-secretória ea motilidade intestinal em animais. **International Journal of Nutrology,** v. 5, n. 1, p. 35-41, 2012.

CASTILHO, A. R.; MURATA, R. M.; PARDI, V. Produtos Naturais em Odontologia. **Revista Saúde-UnG,** v. 1, n. 1, p. 11-19, 2007.

CHO, A. S.; JEON, S. M.; KIM, M. J.; YEO, J.; SEO, K. I.; CHOI, M. S.; LEE, M. K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology,** v. 48, n. 3, p. 937-943, 2010.

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

CUSHNIE, T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DA CONCEIÇÃO, G. M.; RUGGIERI, A. C.; ARAÚJO, M. F. V.; DA CONCEIÇÃO, T. T. M. M.; DA CONCEIÇÃO, M. A. M. M. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena,** v. 7, n. 12, 2012.

DE-FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A.; LUIZ-FERREIRA, A.; DUNDER, R. J.; TAKAYAMA, C.; SILVA, M. S.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H. Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011.

DE CARVALHO, J. E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. 2006.

DE JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. A.; LIMA, G. R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BATISTA, L. M. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 13, n. 3, p. 3203-3228, 2012.

DE S. LIRA, S. R.; RAO, V. S.; CARVALHO, A. C. S.; GUEDES, M. M.; DE MORAIS, T. C.; DE SOUZA, A. L.; TREVISAN, M. T. S.; LIMA, A. F.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism. **Inflammopharmacology,** v. 17, n. 4, p. 221-228, 2009.

DE SOUSA, F. C.; DE MELO SILVA, L. M.; PIANCÓ DE SOUSA, E.; VASCONCELOS DE OLIVEIRA LIMA, A. K.; FEITOSA DE FIGUEIREDO, R. M. PARÂMETROS FÍSICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DA POLPA DE PEQUI. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável,** v. 7, n. 1, 2012.

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

DEKANSKI, D.; JANIĆIJEVIĆ-HUDOMAL, S.; TADIĆ, V.; MARKOVIĆ, G.; ARSIĆ, I.; MITROVIĆ, D. M. Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. **Journal of the Serbian Chemical Society,** v. 74, n. 4, p. 367-377, 2009.

DEMAIN, A. L. Antibiotics: Natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews,** v. 29, n. 6, p. 821-842, 2009.

DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology,** v. 149, n. 6, p. 611-623, 2009.

DIXON, R.; DEY, P.; LAMB, C. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology,** v. 55, p. 1-136, 1983.

DOS SANTOS, E. B.; SLUSARZ, P. A. A.; JUNIOR, V. A. K.; SCHWARTZ, J. P. Eficácia antimicrobiana de produtos naturais frente a microrganismos causadores da endocardite bacteriana. **Ciências Biológicas e da Saúde,** v. 13, n. 3/4, 2009.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **The Journal of Nutritional Biochemistry,** v. 12, n. 7, p. 404-421, 2001.

ERICSON, A.; NUR, E. M.; PETERSSON, F.; KECHAGIAS, S. The effects of capsaicin on gastrin secretion in isolated human antral glands: before and after ingestion of red chilli. **Digestive Diseases and Sciences,** v. 54, n. 3, p. 491-498, 2009.

FENDRICK, A. M.; PAN, D. E.; JOHNSON, G. E. OTC analgesics and drug interactions: clinical implications. **Osteopathic medicine and primary care,** v. 2, n. 1, p. 1-7, 2008.

FÜLÖP, K.; ZÁDORI, Z.; RÓNAI, A. Z.; GYIRES, K. Characterisation of α_2-adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying, gastric motility and gastric mucosal defence. **European Journal of Pharmacology,** v. 528, n. 1, p. 150-157, 2005.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology,** v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research,** v. 58, n. 9, p. 537-552, 2009.

GENNARO, A. R. **Remington: The science and practice of pharmacy**. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2000.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. Route of administration and drug disposition. **Drug Metabolism Reviews,** v. 3, n. 1, p. 185-199, 1975.

GOEL, R.; TAVARES, I.; BENNETT, A. Effect of ethanol on eicosanoid synthesis by human gastric and colonic mucosal pieces. **British Journal of Pharmacology,** v. 99, n. 2, p. 289-292, 2012.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As Bases farmacológicas da Terapêutica, 11 edição**. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 2010.

GROVER, G. J.; GARLID, K. D. ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology,** v. 32, n. 4, p. 677-695, 2000.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Elsevier Brazil, 2006. ISBN 8535216413.

GYIRES, K.; MÜLLNER, K.; FÜRST, S.; RÓNAI, A. Z. Alpha-2 adrenergic and opioid receptor-mediated gastroprotection. **Journal of Physiology-Paris,** v. 94, n. 2, p. 117-121, 2000.

GYIRES, K.; NÉMETH, J.; ZÁDORI, Z. Gastric Mucosal Protection and Central Nervous System. **Current Pharmaceutical Design**, 2012.

HAID, D. C.; JORDAN-BIEGGER, C.; WIDMAYER, P.; BREER, H. Receptors responsive to protein breakdown products in G-cells and D-cells of mouse, swine and human. **Frontiers in Physiology,** v. 3, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants–< i> quo vadis</i>? **Trends in Pharmacological Sciences,** v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today,** v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine,** v. 16, n. 11, p. 997-1005, 2009.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine,** v. 15, n. 8, p. 639-652,

2008.

HERRERA, M.; MARHUENDA, E. Effect of naringin and naringenin on contractions induced by noradrenaline in rat vas deferens—I. Evidence for postsynaptic alpha-2 adrenergic receptor. **General Pharmacology: The Vascular System,** v. 24, n. 3, p. 739-742, 1993.

HOLZ, R.; BITTNER, M. A.; PEPPERS, S. C.; SENTER, R. A.; EBERHARD, D. MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. **Journal of Biological Chemistry,** v. 264, n. 10, p. 5412-5419, 1989.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C. J.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

JESPERSEN, T.; GRUNNET, M.; OLESEN, S. P. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. **Physiology,** v. 20, n. 6, p. 408-416, 2005.

JOUNG, D. K.; KIM, Y. H.; YANG, D.; SO, G. W.; LEE, K. H.; KWON, D. Y.; CHOI, J. G.; AN, B. K.; HA, D. S.; SHIN, D. W. Antibacterial and synergistic effects of Kochia scoparia extracts against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **African Journal of Microbiology Research,** v. 6, n. 10, p. 2449-2454, 2012.

KAUR, R.; CHOPRA, K.; SINGH, D. Role of α2 receptors in quercetin-induced behavioral despair in mice. **Journal of Medicinal Food,** v. 10, n. 1, p. 165-168, 2007.

KAUR, R.; SINGH, D.; CHOPRA, K. Participation of α 2 Receptors in the Antinociceptive Activity of Quercetin. **Journal of Medicinal Food,** v. 8, n. 4, p. 529-532, 2005.

KLEEMANN, R.; VERSCHUREN, L.; MORRISON, M.; ZADELAAR, S.; VAN ERK, M. J.; WIELINGA, P. Y.; KOOISTRA, T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. **Atherosclerosis,** v. 218, n. 1, p. 44-52, 2011.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.; KONTUREK, S.; PAWLIK, M.; PAJDO, R.; DROZDOWICZ, D.; PTAK, A.; HAHN, E. Effect of central and peripheral actions of histamine and its metabolite N-alpha methyl histamine on gastric secretion and acute gastric lesions. **Journal of Physiology and Pharmacology,** v. 52, n. 4, p. 625-638, 2001.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTıN CALERO, M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 71, n. 1, p. 45-53, 2000.

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.

LEFER, A. M.; LEFER, D. J. II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,** v. 276, n. 3, p. G572-G575, 1999.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science,** v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LINSCHEER, W. G.; RAHEJA, K. L. Effects of somatostatin on gastric acid secretion and on lipid and carbohydrate metabolism in the rat. **British Journal of Pharmacology,** v. 64, n. 2, p. 311-4, Oct 1978.

LIU, K.; ZHU, Y.; HUANG, X. Effect of *Pongamia pinnata* root flavonoids on the quality of ulcer healing and expression of EGF and TGF-alpha in the rat model of gastric ulcer induced by acetic acid. **Chinese Journal of Applied Physiology,** v. 28, n. 5, p. 435, 2012.

LONGANGA OTSHUDI, A.; VERCRUYSSE, A.; FORIERS, A. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). **Journal of Ethnopharmacology,** v. 71, n. 3, p. 411-423, 2000.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer–recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 253, n. 1, p. 329-338, 2003.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet,** v. 374, n. 9699, p. 1449-1461, 2009.

MANIMOZHI, D.; SANKARANARAYANAN, S.; SAMPATHKUMAR, G. Evaluating the antibacterial activity of Flavonoids extracted from Ficus benghalensis. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Research,** v. 3, n. 1, 2012.

MARXEN, K.; VANSELOW, K. H.; LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U. P. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. **Sensors,** v. 7, n. 10, p. 2080-2095, 2007.

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

MEDEIROS, J. V. R.; BEZERRA, V. H.; GOMES, A. S.; BARBOSA, A. L. R.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SOARES, P. M. G.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. L. P. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 330, n. 3, p. 764-770, 2009.

MEKHFI, H.; ELHAOUARI, M.; BNOUHAM, M.; AZIZ, M.; ZIYYAT, A.; LEGSSYER, A. Effects of extracts and tannins from Arbutus unedo leaves on rat platelet aggregation. **Phytotherapy Research,** v. 20, n. 2, p. 135-139, 2006.

MENEZES, M. O. T.; ARAÚJO, F. S.; ROMERO, R. E. O sistema de conservação biológica do estado do Ceará: Diagnóstico e Recomendações. **REDE-Revista eletrônica do PRODEMA,** v. 5, n. 2, 2010.

MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A. Gastric epithelial stem cells. **Gastroenterology,** v. 140, n. 2, p. 412-424, 2011.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology,** v. 33, n. 5, p. 939-945, 1983.

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. **Japanese Journal of Pharmacology,** v. 44, n. 1, p. 43, 1987.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology,** v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTEIRO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P.; DE LARAUJO, E.; DE AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova,** v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

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.

MUSTAFA, R.; HAMID, A. A.; MOHAMED, S.; BAKAR, F. A. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. **Journal of Food Science,** v. 75, n. 1, p. C28-C35, 2010.

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

NACIONAL, M. D. I. **MINISTERIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL - Programa de Sustentabilidade de Espaços Sub-regionais - PROMESO**. Site do MINISTERIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL 2011.Disponível em: < http://www.integracao.gov.br/programas/programasregionais/araripe/abrangencia.asp# >.

NAKAMURA, E.; HASUMURA, M.; SAN GABRIEL, A.; UNEYAMA, H.; TORII, K. M1714 Functional Role of Calcium-Sensing Receptor on Somatostatin Release From Rat Gastric Mucosa. **Gastroenterology,** v. 138, n. 5, p. S-404-S-404, 2010.

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

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products,** v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012/03/23 2012.

NISHIO, H.; HAYASHI, Y.; TERASHIMA, S.; TAKEUCHI, K. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. **Life Sciences,** v. 79, n. 16, p. 1523-1530, 2006.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological and Pharmaceutical Bulletin,** v. 28, n. 8, p. 1321-1341, 2005.

OKABE, S.; AMAGASE, K.; TAKEUCHI, K. Acetic acid ulcer model–state of the art in 2010. **Gastroenterologia Polska,** v. 17, n. 3, p. 165-168, 2010.

OKUDA, T.; MORI, K.; SHIOTA, M. Effects of the interaction of tannins with coexisting substances. III. Formation and solubilization of precipitates with alkaloids]. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan,** v. 102, n. 9, p. 854, 1982.

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; MAIA, A. H. N.; ALVES, R. E.; MATOS, N. M. S.; SAMPAIO, F. G. M.; LOPES, M. M. T. Características químicas e físico-químicas de pequis da Chapada do Araripe, Ceará. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 32, 2010.

PAJDO, R.; BRZOZOWSKI, T.; SZLACHCIC, A.; C KONTUREK, P.; PTAK-BELOWSKA, A.; DROZDOWICZ, D.; TARGOSZ, A.; J KONTUREK, S.; W PAWLIK, W. Lipoxins, the novel mediators of gastroprotection and gastric adaptation to ulcerogenic action of aspirin. **Current Pharmaceutical Design,** v. 17, n. 16, p. 1541-1551, 2011.

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; MAYORA, A.; RUIZ, M. C.; MICHELANGELI, F. Heterogeneity of acid secretion induced by carbachol and histamine along the gastric gland axis and its relationship to [Ca2+] i. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,** v. 295, n. 4, p. G671-G681, 2008.

PESKAR, B.; HOPPE, U.; LANGE, K.; PESKAR, B. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on rat gastric mucosal leukotriene C4 and prostanoid release: relation to ethanol-induced injury. **British Journal of Pharmacology,** v. 93, n. 4, p. 937-943, 2012.

PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B. A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 301, n. 3, p. 969-974, 2002.

POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR, S.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology,** v. 5, n. 11, 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, K. M. C.; SOUZA, V. A. B. Physical and chemical-nutritional characteristics of pequi fruits (Caryocar coriaceum WITTM.) in natural populations of the mid-north region of Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 33, n. 2, p. 500-508, 2011.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology,** v. 77, n. 3, p. 433, 1979.

RODRIGUES E SILVA, A. A.; MARQUES BEZERRA, M.; VASCONCELOS CHAVES, H.; DE PAULO TEIXEIRA PINTO, V.; DE SOUZA FRANCO, E.; MAGALHÃES VIEIRA, Â.; BARBOSA ARAÚJO, E.; CUNHA RIOS, L.; RESENDE LEITE, A. C.; DE SOUSA MAIA, M. B. Protective effect of Chresta martii extract on ethanol-induced gastropathy depends on alpha-2 adrenoceptors pathways but not on nitric oxide, prostaglandins or opioids. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 142, n. 1, p. 206-212, 2012.

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,** v. 16, n. 11, p. 1052-1055, 2009.

ROWLAND, M. Influence of route of administration on drug availability. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 61, n. 1, p. 70-74, 1972.

RUFINO, M.; ALVES, R.; BRITO, E.; MORAIS, S.; SAMPAIO, C.; JIMEZES-PEREZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical 2007.Disponível em: < www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf >.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; AMORNLERDPISON, D.; POJANAGAROON, S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 102, n. 1, p. 120-122, 2005.

SACCANI, F.; ANSELMI, L.; JARAMILLO, I.; BERTONI, S.; BAROCELLI, E.; STERNINI, C. Protective role of μ opioid receptor activation in intestinal inflammation induced by mesenteric ischemia/reperfusion in mice. **Journal of Neuroscience Research**, 2012.

SACHS, G.; ZENG, N.; PRINZ, C. Physiology of isolated gastric endocrine cells. **Annual Review of Physiology,** v. 59, n. 1, p. 243-256, 1997.

SALEEMA, A.; ENGSTRÖMB, M.; WURSTERB, S.; SAVOLAB, J. M.; PIHLAJAA, K. Interaction of Folk Medicinal Plant Extracts with Human α2-Adrenoceptor Subtypes. **Zeitschrift für Naturforschung,** v. 57c, p. 332 - 338, 2002.

SAMONINA, G.; KOPYLOVA, G.; LUKJANZEVA, G.; ZHUYKOVA, S.; SMIRNOVA, E.; GERMAN, S.; GUSEVA, A. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology,** v. 11, n. 1, p. 1-6, 2004.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International,** v. 8,

n. 3, p. 121-137, 2002.

SARAIVA, R.; LEITE, G.; OLIVEIRA, R.; ARARUNA, M.; MENEZES, K.; PEREIRA, C.; COSTA, J.; CAMPOS, A.; MENEZES, I. Topical anti-inflammatory activity of Caryocar coriaceum Wittm.(Caryocaraceae) pulp fruit and seed oils. 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008. Porto de Galinhas. Brazilian Chemical Society.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. A.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CASMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. Topical anti-inflammatoryeffectof Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, 2010.

SARAIVA, R. A.; MATIAS, E. F. F.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SOUZA, H. H. F.; FERNANDES, C. N.; ROCHA, J. B. T.; MENEZES, I. R. A. Synergistic action between Caryocar coriaceum Wittm. fixed oil with aminoglycosides in vitro. **European Journal of Lipid Science and Technology,** v. 113, n. 8, p. 967 - 972, 2011.

SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 403, n. 1, p. 136-138, 2011.

SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B. M.; STETTLER, C.; NETZER, P.; STROFF, T.; FLOGERZI, B.; HALTER, F. Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. **British Journal of Pharmacology,** v. 123, n. 5, p. 795-804, 2009.

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, n. 7, p. 1842-1860, 2008.

SCHWEIZER, A.; VALDENAIRE, O.; NELBÖCK, P.; DEUSCHLE, U.; EDWARDS, J. B. D. M.; STUMPF, J.; LÖFFLER, B. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. **Biochemical Journal,** v. 328, n. Pt 3, p. 871, 1997.

SHARMA, V.; TIWARI, M.; CHAUHAN, N.; NEMA, R. Phytochemical investigation on the ethanolic extract on the leaves of Zizyphus xylopyrus (Retz.) Willd. **International Journal of Agronomy and Plant Production,** v. 3, n. 1, p. 26-37, 2012.

SHIMOYAMA, A. T.; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; DE OLIVEIRA E SILVA, A. M.; DE MELO, I. L. P.; MANCINI-FILHO, J.; FARSKY, S. H. P. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1-10, 2012.

SHIN, J. M.; MUNSON, K.; VAGIN, O.; SACHS, G. The gastric HK-ATPase: structure, function, and inhibition. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology,** v. 457, n. 3, p. 609-622, 2009.

SHOBA, F. G.; THOMAS, M. Study of antidiarrhoeal activity of four medicinal plants in castor-oil induced diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 76, n. 1, p. 73-76, 2001.

SIBANDA, T.; OKOH, A. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. **African Journal of Biotechnology,** v. 6, n. 25, 2010.

SINGH, M.; GOVINDARAJAN, R.; RAWAT, A. K. S.; KHARE, P. B. Antimicrobial flavonoid rutin from Pteris vittata L. against pathogenic gastrointestinal microflora. **American Fern Journal,** v. 98, n. 2, p. 98-103, 2008.

SLOMIANY, B. L.; SLOMIANY, A. Endothelin-1-dependent up-regulation of leptin production in gastric mucosal injury by indomethacin. **Inflammopharmacology,** v. 13, n. 5, p. 455-466, 2005.

SONG, P.; GROOS, S.; RIEDERER, B.; FENG, Z.; KRABBENHÖFT, A.; SMOLKA, A.; SEIDLER, U. KCNQ1 is the luminal K+ recycling channel during stimulation of gastric acid secretion. **The Journal of physiology,** v. 587, n. 15, p. 3955-3965, 2009.

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

STOHS, S. J. The role of free radicals in toxicity and disease. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology,** v. 6, n. 3-4, p. 205-228, 2011.

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.

TAKAHASHI, S.; TAKEUCHI, K.; OKABE, S. EP_4 receptor mediation of prostaglandin E_2-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. **Biochemical Pharmacology,** v. 58, n. 12, p. 1997-2002, 1999.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A. Molecular Mechanisms of Epithelial Regeneration and Neovascularization During Healing of Gastric and Esophageal Ulcers. **Current Medicinal Chemistry,** v. 19, n. 1, p. 16-27, 2012.

THEOHARIDES, T. C. **Anti-inflammatory compositions for treating brain inflammation**: Google Patents 2010

TOBIN, G.; GIGLIO, D.; LUNDGREN, O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. **Journal of Physiology and Pharmacology,** v. 60, n. 1, p. 3-21, 2009.

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.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 27, n. 1, p. 1-7, 2009.

VASCONCELOS, P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R.; PELLIZZON, C. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 115, n. 2, p. 293-301, 2008.

VELIOGLU, Y.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VERMA, A. K.; PRATAP, R. The biological potential of flavones. **Natural Product Reports,** v. 27, n. 11, p. 1571-1593, 2010.

VINE, L.; PHILPOTT, R.; FORTUN, P. Proton pump inhibitors: how to withdraw treatment. **Prescriber,** v. 23, n. 18, p. 12-16, 2012.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine,** v. 16, n. 2, p. 97-110, 2009.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. **The Journal of Organic Chemistry,** v. 71, n. 22, p. 8329-8351, 2006.

XUE, L.; AIHARA, E.; PODOLSKY, D. K.; WANG, T. C.; MONTROSE, M. H. In vivo action of trefoil factor 2 (TFF2) to speed gastric repair is independent of cyclooxygenase. **Gut,** v. 59, n. 9, p. 1184-1191, 2010.

YAMAMOTO, O.; OKADA, Y.; OKABE, S. Effects of a proton pump inhibitor, omeprazole, on gastric secretion and gastric and duodenal ulcers or erosions in rats. **Digestive Diseases and Sciences,** v. 29, n. 5, p. 394-401, 1984.

ZAYACHKIVSKA, O.; KONTUREK, S.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **Journal of Physiology and Pharmacology,** v. 56, n. Suppl 1, p. 219-231, 2005.

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 Physiology,** v. 37, p. 654-661, 2010.

ZOGHBI, S.; TROMPETTE, A.; CLAUSTRE, J.; EL HOMSI, M.; GARZÓN, J.; JOURDAN, G.; SCOAZEC, J. Y.; PLAISANCIÉ, P. β-Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a μ-opioid pathway. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,** v. 290, n. 6, p. G1105-G1113, 2006.

APÊNDICE

Apêndice A – Tabelas dos resultados dos testes farmacológicos

Tabela – Efeito do EHFCC e do omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg	% área lesionada	% de inibição
Salina	-	38,83 ± 1,31	-
Omeprazol	30	11,39 ± 0,91	70,67
EFHCC	50	34,65 ± 0,79**	10,76
EFHCC	100	11,87± 0,53***	69,43
EFHCC	200	16,68 ± 0,97***	57,04

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (50, 100 e 200 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol 96% (0,2 mL/animal v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. **p<0,01; ***p<0,001 *versus* salina (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

Tabela - Efeito do EHFCC e do omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg	% área lesionada	% de inibição
Salina	-	33,73 ± 2,14	-
Omeprazol	30	9,29 ± 0,66 ***	72,45
EFHCC	50	27,58 ± 2,90*	18,23
EFHCC	100	9,16 ± 1,03***	72,84
EFHCC	200	15,70 ± 1,01***	53,45

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (50, 100 e 200 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol 96% (0,2 mL/animal v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. *p<0,05; ***p<0,001 *versus* salina (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

Tabela - Efeito do EHFCC e do omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina em camundongos.

Grupo	Dose em mg/Kg	Pontuação
Salina	-	8,66 ± 0,33
Omeprazol	30	1,33 ± 0,21 ***
EHFCC	50	5,50 ± 0,34 ***
EHFCC	100	2,16 ± 0,30 ***
EHFCC	200	5,16 ± 0,30 ***

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da pontuação média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (50, 100 e 200 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de indometacina (10 mg/Kg s.c.), três horas após a administração da indometacina os pré-tratamentos foram repetidos. Os animais foram sacrificados 6 horas após a administração da indometacinal. ***p<0,001 *versus* salina (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

Tabela – Efeito do EHFCC administrado via oral e intraperitoneal no modelo de indução de lesão gástrica em camundongos.

Grupo	Via de administração	Dose mg/Kg	% área de Lesionada	% de Inibição
Salina	v.o.	-	37,16 ± 2,26	-
EFHCC	v.o.	100	11,87 ± 0,53***	68,05
EFHCC	i.p.	100	7,07 ± 0,28***	80,97

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (100 mg/kg) foram administrados via oral (v.o.) e EHFCC (100 mg/kg) por via intraperitoneal, 1 hora ou 30 minutos, respectivamente, antes da administração de etanol 96% (0,2 mL/animal v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. *** p<0,001 *versus* salina (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

Tabela - Efeito do EFHCC e omeprazol no modelo de indução de úlcera crônica por ácido acético.

Grupo	Dose em mg/Kg	Área ulcerada em cm^2	% de inibição
Salina	-	0,341 ± 0,023	-
Omeprazol	30	0,056 ± 0,005***	83,57
EHFCC	100	0,047 ± 0,004***	86,21

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área ulcerada média para 6 animais/grupo. Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg) , EHFCC (100 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, diariamente, durante 14 dias, 2 dias após a laparotomia pra indução da úlcera crônica. Os animais foram sacrificados no 15º dia após o início dos tratamentos. ***p<0,001 *versus* salina (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls, como teste post hoc).

Tabela - Efeito do pré-tratamento com capsazepina na proteção gástrica promovida pelo EHFCC.

Grupo	Via de administração	Dose em mg/Kg	% área lesionada	% de variação da área lesada
Salina	v.o.	-	37,16 ± 2,26	-
EHFCC	v.o.	100	11,24 ± 0,83[a]	- 69,75
Capsaicina	i.p.	5	18,27 ± 1,09[a,b1]	- 50,83
Capsazepina/ capsaicina	i.p./i.p.	5 / 5	25,38 ± 0,76[a,b,c1]	- 31,70
Capsazepina / EHFCC	i.p./v.o.	5 / 100	25,32 ± 1,98[a,b,c1]	- 31,86

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área ulcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [b1] p< 0,01 *versus* grupo EHFCC. [c1] p< 0,01 *versus* grupo capsaicina.

Tabela - Efeito do pré-tratamento com glibenclamida na gastroproteção promovida pelo EFHCC.

Grupo	Via de administração	Dose em mg/Kg	% área lesionada	% de variação da área lesada
Salina	v.o.	-	37,16 ± 2,26	-
EHFCC	v.o.	100	11,87 ± 0,53[a]	- 68,05
Diazóxido	i.p.	3	14,74 ± 0,67[a]	- 60,33
Glibenclamida/ diazóxido	i.p./i.p.	5 / 3	26,82 ± 1,01[abc]	- 27,82
Glibenclamida / EHFCC	i.p./v.o.	5 / 100	11,93 ± 0,74[ad]	- 67,89

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área ulcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo diazóxido. [d] p< 0,001 *versus* grupo glibenclamida/diazóxido.

Tabela - Efeito do pré tratamento como L-NAME na gastroproteção promovida pelo EHFCC.

Grupo	Via de administração	Dose em mg/Kg	% área lesionada	% de variação da área lesada
Salina	v.o.	-	36,69 ± 2,37	-
EHFCC	v.o.	100	10,80 ± 0,71[a]	- 70,56
L-arginina	i.p.	600	25,85 ± 1,19[ab]	- 29,54
L-NAME/ L-arginina	i.p./i.p.	20/ 600	81,63 ± 0,57[abc]	122,48
L-NAME / EHFCC	i.p./v.o.	20 / 100	79,56 ± 1,38[abc]	116,84

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área ulcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo L-arginina.

Tabela - Efeito do pré-tratamento com indometacina na gastroproteção promovida pelo EFHCC.

Grupo	Via de administração	Dose em mg/Kg	% área lesionada	% de variação da área lesada
Salina	v.o.	-	36,69 ± 2,37	-
EHFCC	v.o.	100	11,87 ± 0,53[a]	- 67,64
Misoprostol	v.o.	0,016	7,09 ± 2,61[a]	- 80,67
Indometacina/ misoprostol	v.o. /v.o.	10 / 0,016	19,28 ± 1,98[ab1c]	- 47,45
Indometacina / EHFCC	v.o. /v.o.	10 / 100	20,67 ± 0,99[ab1c]	- 43,66

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área ulcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b1] p< 0,01 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo misoprostol.

Tabela - Efeito do pré-tratamento com ioimbina na gastroproteção promovida pelo EFHCC.

Grupo	Via de administração	Dose em mg/Kg	% área lesionada	% de variação da área lesada
Salina	v.o.	-	37,16 ± 2,26	-
EHFCC	v.o.	100	10,80 ± 0,79[a]	- 70,93
Clonidina	v.o.	0,05	10,93 ± 1,86[a]	- 70,58
Ioimbina/ clonidina	i.p. /v.o.	2 / 0,05	22,84 ± 1,67[abc]	- 38,53
Ioimbina / EHFCC	i.p. /v.o.	2 / 100	21,84 ± 0,98[abc]	- 41,22

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área ulcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo clonidina.

Tabela - Efeito do pré-tratamento com histamina na gastroproteção promovida pelo EFHCC.

Grupo	Via de administração	Dose em mg/Kg	% área lesionada	% de variação da área lesada
Salina	v.o.	-	36,80 ± 2,26	-
EHFCC	v.o.	100	11,24 ± 0,79[a]	- 69,45
Ranitidina	i.p.	40	14,41 ± 1,86[a]	- 60,84
Histamina / ranitidina	s.c. /i.p.	2 / 40	22,24 ± 1,67[abc]	- 39,56
Histamina / EHFCC	s.c. /v.o.	2 / 100	7,98 ± 0,98[ad]	- 78,31

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área ulcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b] p< 0,001 *versus* grupo EHFCC. [c] p< 0,001 *versus* grupo ranitidina. [d] p< 0,001 *versus* o grupo histamina/ranitidina.

Tabela - Efeito do pré-tratamento com naloxona na gastroproteção promovida pelo EFHCC.

Grupo	Via de administração	Dose em mg/Kg	% área lesionada	% de variação da área lesada
Salina	v.o.	-	37,09 ± 3,03	-
EHFCC	v.o.	100	11,77 ± 0,77[a]	- 68,26
Morfina	s.c.	5	8,36 ± 0,47[a]	- 77,46
Naloxona / morfina	i.p. / s.c.	2 / 5	19,74 ± 2,23[ab2c1]	- 46,77
Naloxona / EHFCC	i.p. /v.o.	2 / 100	18,49 ± 1,97[ab2]	- 50,14

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da área ulcerada média para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [b2] p< 0,05 *versus* grupo EHFCC. [c1] p< 0,01 *versus* grupo morfina.

Tabela – Efeito da administração oral do EHFCC no deslocamento intestinal em camundongos.

Grupo	Dose em mg/Kg	% percorrida pelo marcador	% de redução Redução
Salina	-	67, 31 ± 0,91	-
Atropina	3	50,43 ± 1,28[a1]	25,07
EHFCC	100	57,33 ± 2,64[ab2]	14,82

Os resultados são expressos como média ± erro padrão médio da porcentagem da distancia percorrida pelo marcador para 6 animais/grupo. [a] p< 0,001 *versus* grupo salina. [a1] p< 0,01 *versus* grupo salina. [b2] p< 0,05 *versus* grupo EHFCC.