



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

DEBORAH DE ARANTES E OLIVEIRA VALIM ARAUJO

**AVALIAÇÃO DA GASTROPROTEÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Protium*
heptaphyllum MARCH (BURSERACEAE) BEM COMO OS POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS EM MODELOS DE ÚLCERA
GÁSTRICA EM RATOS**

**EVALUATION OF GASTROPROTECTION ESSENTIAL OIL FROM *Protium*
heptaphyllum MARCH (BURSERACEAE) AND THE POSSIBLE MECHANISMS
INVOLVED ON EXPERIMENTAL GASTRIC ULCER MODELS IN RATS**

Campinas, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DA GASTROPROTEÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Protium
heptaphyllum* MARCH (BURSERACEAE) BEM COMO OS POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS EM MODELOS DE ÚLCERA
GÁSTRICA EM RATOS**

**ORIENTAÇÃO: Prof^ª. Dr^ª. ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO
COORDENAÇÃO: Prof. Dr. ANDERSON LUIZ FERREIRA**

**EVALUATION OF GASTROPROTECTION ESSENTIAL OIL FROM *Protium
heptaphyllum* MARCH (BURSERACEAE) AND THE POSSIBLE MECHANISMS
INVOLVED ON EXPERIMENTAL GASTRIC ULCER MODELS IN RATS**

DEBORAH DE ARANTES E OLIVEIRA VALIM ARAUJO

**Dissertação de Mestrado apresentada
à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas - UNICAMP
para obtenção de título de Mestra em
Farmacologia**

*Dissertation submitted the Pós-
Graduate School of Medical Sciences,
State University of Campinas -
UNICAMP to obtain the title of
Master in Pharmacology*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
DEBORAH DE ARANTES E OLIVEIRA VALIM
ARAUJO, E ORIENTADA PELA PROF^A. DR^A.
ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO.**

Assinatura do Orientador

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Ar15a Araujo, Deborah de Arantes e Oliveira Valim, 1972-
Avaliação da gastroproteção do óleo essencial do
Protium heptaphyllum March (Burseraceae) bem como
os possíveis mecanismos de ação envolvidos em
modelos de úlcera gástrica em ratos / Deborah de
Arantes e Oliveira Valim Araujo. -- Campinas, SP : [s.n.],
2012.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito.
Coorientador : Anderson Luiz Ferreira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Radicais livres. 2. Antioxidante. 3.
Antiulcerogênico. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza,
1954-. II. Ferreira, Anderson Luiz. III Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of gastroprotection essential oil from *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) and the possible mechanisms involved on experimental gastric ulcer models in rats.

Palavras-chave em inglês:

Free radicals

Antioxidant

Antiulcerogenic

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Anderson Luiz Ferreira [Coorientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Clelia Akiko Hiruma Lima

Data da defesa: 29-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

DEBORAH DE ARANTES E OLIVEIRA VALIM ARAUJO

Orientadora: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Co-orientador: Anderson Luiz Ferreira

Membros:

Prof. Dr. Anderson Luiz Ferreira

Anderson Ferreira

Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal

Sisi Marcondes Paschoal

Profa. Dra. Clelia Akiko Hiruma Lima

Clelia Akiko Hiruma Lima

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/08/2012

“A minha preocupação não está em ser coerente com minhas afirmações anteriores sobre determinado problema, mas em ser coerente com a verdade. O erro não se torna verdade por se difundir e multiplicar facilmente. Do mesmo modo, a verdade não se torna erro pelo fato de ninguém ver.”

(Mahatma Gandhi)

Dedico aos meus pais, com carinho,

Bei e Nilson

Minha origem, o início da minha vida, minha vida toda. Estes que me fizeram sentir o gosto pela vida a cada instante vivido, a cada palavra proferida. Não tenho como descrever o empenho de minha mãe em suprir todas as minhas necessidades, em apoiar-me em todas minhas decisões, em estar presente sempre! Ao meu pai agradeço, por ter certeza que ele me protege afastando de mim todos os males, abrindo meus caminhos, e mesmo não estando entre nós, sinto sua presença.

Obrigada.

Amo vocês!

Agradeço...

À Prof^a. Alba pela orientação, pelo carinho com que ensina e pela oportunidade de conhecer e aprender com a mestra e pessoa que é, agradeço pela tolerância, carinho e compreensão sempre que precisei...

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Aires, por acreditar que este trabalho pudesse ser realizado por mim...

À equipe do Laboratório de Produtos Naturais (Ana Cristina, Anderson, Cibele, Cilene, Christiane, Débora, Demétrio, Eduardo, Érica, Fabiana, Felipe, Fernanda, Luis, Maíra, Patrícia, Priscila, Ricardo, Tatiane, Victor e Vinicius), o pessoal do Lab está sempre presente, vocês são realmente uma equipe, obrigada a todos pelo apoio de sempre...

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia (Alexandra, Chico, Lécio, Ivo, Lú, Marcelo, Sandra e D. Zefa) pelo profissionalismo...

Ao Bruno, Assistente do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo esclarecimento de todas minhas dúvidas na execussão deste projeto, e pela competência na execussão de suas funções...

À minha mãe Bei, que me guia e me orienta em todos os momentos da minha vida, obrigada por me dar força para seguir sempre em frente com dignidade, obrigada por me ensinar respeitar e me fazer respeitar...

Ao meu irmão que participou deste momento tão importante da minha vida. O grande poeta Vinicius de Moraes disse que: “Filhos, melhor não tê-los...” gostaria de fazer um plágio e substituir filhos por irmãos, pois irmãos são como filhos..., Melhor não tê-los! Mas se não os temos como sabê-los? Quem os tem sabe, nunca estamos sozinhos e temos sempre com quem contar, obrigada irmão...

“Vem cá Luiza, me dá tua mão, o teu desejo é sempre o meu desejo...” Luisa minha maior riqueza, amor incondicional, impossível descrever a sensação de se ter um filho,

agradeço-a por fazer parte da minha vida e que dentro da inocência das crianças mostra-me um caminho de sabedoria, tolerância e amor...

Ao Marcelo, pelo companheirismo e compreensão, pela parceria nas lutas, nas farras, nas tristezas e alegrias, por estar ao meu lado sempre. Obrigada! Amo você...

Aos meus amigos, que em cada momento cada um teve seu papel importante, amigos são a família que escolhemos aqui na Terra, sou feliz por ter vocês por perto ou mesmo de longe, sempre presentes...

Ao Anderson, por acompanhar meu trabalho desde o começo, por estar sempre disposto a ajudar, por ensinar tudo o que sabe (o magistério corre nas veias), por saber ouvir, por ter me co-orientado tão sabiamente. Obrigada pela ajuda durante todo este tempo...

À Chris, pela disposição em ajudar sempre, por ensinar, sem muitas palavras, o que significa dedicação, amizade, companheirismo, um exemplo para ser seguido. Obrigada por tudo Chris.

Ao Felipe, Ricardo, Luis, Cinza e Aninha sempre presentes e prontos para o que se precisar, cada um de vocês tem um significado importante pra mim, sou muito grata a tudo o que me ensinaram e me ajudaram na elaboração deste trabalho...

Ao Antonio Calmon, pela atenção e importante colaboração neste trabalho, com envio de amostras da planta...

Ao Prof^o Jorge Yoshio Tamashiro pela disposição em ajudar com análise das exsiccatas...

Às docentes Prof^a. Dr^a. Sisi Marcondes Paschoal, Prof^a Dr^a Ana Paula Couto Davel e Prof^a. Dr^a. Fabíola Z.T. Mônica pela participação em meu exame de qualificação, sugestões e comentários sobre meu trabalho...

À Prof^ª. Dr^ª. Sisi Marcondes Paschoal pela paciência, solicitude e valiosa participação nas bancas de qualificação e defesa...

À Prof^ª Dr^ª Clélia Akiko Hiruma Lima pela atenção e disposição em participar da banca de defesa...

Aos docentes e funcionários do Departamento de Farmacologia e da Coordenadoria de Pós-graduação da FCM/UNICAMP...

À Elaine da secretaria do Departamento de Farmacologia, pela atenção e carinho no dia da minha qualificação.

Epígrafe

Quase

Ainda pior que a convicção do não, é a incerteza do talvez, é a desilusão de um quase!
É o quase que me incomoda, que me entristece, que me mata trazendo tudo que poderia ter sido e não foi.

Quem quase ganhou ainda joga, quem quase passou ainda estuda, quem quase amou não amou.

Basta pensar nas oportunidades que escaparam pelos dedos, nas chances que se perdem por medo, nas idéias que nunca sairão do papel por essa maldita mania de viver no outono.

Pergunto-me, às vezes, o que nos leva a escolher uma vida morna.

A resposta eu sei de cor, está estampada na distância e na frieza dos sorrisos, na frouxidão dos abraços, na indiferença dos "bom dia", quase que sussurrados.

Sobra covardia e falta coragem até para ser feliz.

A paixão queima, o amor enlouquece, o desejo trai. Talvez esses fossem bons motivos para decidir entre a alegria e a dor.

Mas não são.

Se a virtude estivesse mesmo no meio-termo, o mar não teria ondas, os dias seriam nublados e o arco-íris em tons de cinza.

O nada não ilumina, não inspira, não aflige nem acalma, apenas amplia o vazio que cada um traz dentro de si.

Preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer.

Para os erros há perdão, para os fracassos, chance, para os amores impossíveis, tempo.

De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar a alma.

Um romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance. Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando...

Fazendo que planejando...

Vivendo que esperando...

Porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.

Fernando Pessoa

Resumo

Protium heptaphyllum March (Burseraceae), conhecido como almécega ou breu branco, é uma planta medicinal abundante na região Amazônica. Seu exudato resinoso *in natura* é um conceituado remédio popular com ação anti-inflamatória, antiulcerogênica, analgésica e cicatrizante. O gênero *Protium* compreende cerca de 135 espécies, estima-se que a maioria das espécies da família Burseraceae pertençam a este gênero, tendo como principal característica sua capacidade em exsudar resinas aromáticas voláteis, usadas como curativo de feridas, tratamento de dor de dente, antisséptico, analgésico e distúrbios gastrointestinais. O objetivo deste trabalho, foi avaliar o potencial gastroprotetor do óleo essencial comercial do *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) (BB), bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos, através de modelos de úlcera gástrica em ratos Unib:WH. A análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) do BB indicou a presença de três monoterpenos majoritários: α -pineno (40%), p-mentha-1.4(8)-dieno (12%) e α -phellandreno (10%). Foram realizados diferentes modelos experimentais de úlcera gástrica que, com base em suas respectivas especificações, foram incluídos dois grupos controles, sendo um positivo (Lansoprazol 30 mg/kg, Carbenoxolona 200 mg/kg ou Cimetidina 100 mg/kg) e um negativo (Veículo – Tween 80[®] 12%, 10 mL/Kg). Após cada experimento, foi realizada eutanásia por deslocamento cervical, os estômagos removidos, abertos na região da maior curvatura e fotografados para quantificação da área de lesão ulcerativa (ALU) por meio do programa AVSoft[®]. O BB, na dose de 100 mg/Kg (dose mais efetiva), apresentou atividade antiulcerogênica contra lesões gástricas induzidas por etanol absoluto (96%) e por Drogas ant-inflamatórias não esteroidais (DAINEs) (97%). Para avaliar os mecanismos de ação envolvidos a atividade antissecretória, muco,

prostaglandina, atividade antioxidante e envolvimento dos Grupamentos Sulfidríla (G-SH), foram analisados. Além disto, o modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético e análise por *Western blotting* da expressão de COX-2 e EGF foram utilizadas para avaliar a capacidade cicatrizante do BB. Foi verificado que este óleo essencial não interfere na secreção ácida na mucosa gástrica; porém, sua gastroproteção depende de compostos com G-SH. A atividade gastroprotetora do BB não ocorre devido ao aumento na produção de muco induzido pelos níveis gástricos de PGE₂. Como o BB não atuou nos mecanismos citoprotetor e antissecretório, objetivou-se verificar o envolvimento do mecanismo antioxidante na atividade gastroprotetora. Existem evidências de que espécies reativas de oxigênio participem na etiologia da úlcera gástrica e muitos óleos essenciais foram recentemente qualificados como antioxidantes naturais. A capacidade do BB de reduzir ou prevenir estresse oxidativo foi avaliada *in vivo*, a partir de modelos de úlcera induzida por etanol absoluto. O BB apresentou atividade antioxidante modulando enzimas antioxidantes como Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e Glutathione Redutase (GSH-Rd), desta forma, diminuindo a peroxidação lipídica (LPO) e atividade da Mieloperoxidase (MPO). BB demonstrou também potente capacidade de cicatrização, com 95% de redução da ALU, aumentando a expressão de COX-2 (55%) e EGF (100%) na mucosa gástrica. Em adição, nenhum sinal de toxicidade foi observado durante os 14 dias de tratamento, considerando os parâmetros analisados. Portanto o BB é composto essencialmente por terpenos, não apresenta atividade antissecretora nem citoprotetora, apresenta atividade antioxidante e cicatrizante.

Abstract

Protium heptaphyllum March (Burseraceae), known as “Almécega” or “Breu Branco”, a medicinal plant is abundant in the Amazon region, its resinous exudates *in nature*, is a renowned folk remedy with anti-inflammatory, antiulcer, analgesic and healing. *Protium* genus comprises about 135 species, it is estimated that most species of Burseraceae, belong to this genus, the main feature, its ability to exude volatile aromatic resins, used for various purposes such as dressing for wounds, pain tooth, antiseptic, analgesic, treatment of stomach, among others. Based on the popular indications of this plant for the treatment of gastrointestinal disturbances, the present work aimed on evaluating the gastroprotective potential of the commercial essential oil of *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) (BB), as well as its possible mechanisms of action involved, through models of gastric ulcer in rats Unib: WH. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of BB indicated the presence of three majority monoterpenes as major compounds: α -pinene (40%), p-mentha-1.4(8)-diene (12%) and, α -phellandreno (10%). We performed different experimental models of gastric ulcer, based on your specifications included two control groups, a positive (Lansoprazole 30 mg/kg, Cimetidine 100 mg/kg or Carbenoxolone 200 mg/kg) and a negative (Vehicle - Tween 80, 12%, 10 mL/Kg). After each experiment, rats were killed by cervical dislocation, their stomachs removed and opened in the region of greater curvature and photographed for quantification of lesion area ulcerative through the AVSoft program. BB at a dose of 100 mg / kg (effective dose) showed antiulcer activity against gastric lesions induced by absolute ethanol (96%) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (97%). To evaluate the mechanisms involved in the BB antiulcerogenic activity, the antisecretory action, mucus, prostaglandins, antioxidant activity and involvement of sulfhydryl group (G-SH) were analyzed. The acetic acid-induced

gastric ulcer model and *western blotting* assay COX-2 and EGF were also used to evaluate the BB healing capacity. This essential oil does not interfere with acid secretion in the gastric mucosa, but their gastroproteção depends on G-SH compounds. The gastroprotective activity of the BB is not due to increased production of gastric mucus induced by PGE₂ levels. As the BB did not act in cytoprotective mechanisms and antissecretório, aimed to verify the involvement of the antioxidant mechanism in gastroprotective activity. There is evidence that reactive oxygen species involved in the etiology of gastric ulcer and many essential oils have recently been classified as natural antioxidants. The role of the essential oil in reducing or preventing the oxidative stress was evaluated *in vivo*, from absolute ethanol-induced gastric ulcer model. The BB showed antioxidant activity by modulating antioxidant enzymes like Superoxide Dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GSH-Rd), thereby decreasing lipid peroxidation (LPO) and activity Myeloperoxidase (MPO). The BB has demonstrated potent healing capacity, with 95% reduction of the ulcerative lesion area due to increased expression of COX-2 (55%) and EGF (100%) in the gastric mucosa. In addition, no signs of toxicity were observed during the 14 days of treatment, considering the analyzed parameters. So BB is composed mainly of terpenes, shows no activity antissecretora or cytoprotective, exhibits antioxidant activity and healing.

Lista de abreviaturas e siglas

ALU - área de lesão ulcerativa

ANOVA - análise de variância

BB - Óleo essencial de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae).

bEGF - fator de crescimento fibroblástico básico

CAT - catalase

CEMIB - Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Cl⁻ - anion cloreto

COX - ciclooxigenase

CuZnSOD - superóxido dismutase dependente de cobre e zinco/ superóxido dismutase citoplasmática

DAINEs- drogas anti-inflamatórias não esteroidais

ECSOD - superóxido dismutase extracelular

EGF- Fator de crescimento epidermal

EGF-R - receptor de fator de crescimento epidermal

EPM - erro padrão da média

EROs - espécies reativas do oxigênio

ERNs - espécies reativas do nitrogênio

FADH₂ - flavina adenina dinucleotídeo

GSH-Px - Glutathione peroxidase

GSH-Rd – Glutathione reductase

G-SH - grupamentos sulfidril não proteicos

GSH – glutathiona reduzida

GSSG - glutathiona oxidada

H⁺ - Hidrogênio

H₂ - receptor histamínico do tipo 2

HCl - ácido clorídrico

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HClO / ClO⁻ - ácido hipocloroso / hipoclorito

HGF - fator de crescimento de hepatócito

HNE - 4-hidroxinonenal

H.pylori- *Helicobacter pylori*

HNO₂ - ácido nitroso

IB - Instituto de Biologia

IL – interleucina

iNOS - enzima óxido nítrico sintase induzida

LPO - Peroxidação lipídica

Min - minuto

MDA- Malonildialdeído

MIP-2 - proteína inflamatória de macrófagos 2

MnSOD - superóxido dismutase dependente de manganês/ superóxido dismutase mitocondrial

MPO – Mieloperoxidase

N₂ - nitrogênio

NADH + H⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBT - nitro blue tetrazolium ou azul de nitrotetrazólio

NEM - N-etilmaleimida

NFκB - fator nuclear de transcrição κB

NO₃⁻ - nitratos

NO - óxido nítrico

N₂O - óxido nitroso

NO₂[•] - radical dióxido de nitrogênio

¹O₂ - oxigênio *singlet*

O₂ - oxigênio

O₂^{•-} - ânion superóxido

OE - Óleos essenciais

•OH - radical hidroxila

OMS - Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻ - peroxinitritos

PB - Tampão fosfato de sódio

PG – prostaglandina

PGD₂ - prostaglandina D₂

PGE₂ - prostaglandina E₂

PGF_{2α} - prostaglandina F₂

PGI₂ - prostaglandina I₂

PPI - inibidor de bomba protônica

ROO[•] - Radical peroxil

SDS - sulfato de sodio dodecil

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - ácido tiobarbitúrico

TGI - Trato Gastrointestinal

TXA₂ - tromboxano A₂

UD - Úlcera(s) duodenal(is)

UG - Úlcera(s) gástrica(s)

Unicamp - Universidade Estadual de Campinas.

UPG - Úlcera Péptica Gastroduodenal

vEGF - fator de crescimento epitelial vascular

V.O. - Via Oral

V.I.- Via Intraduodenal

XO- xantina oxidase

Lista de figuras

Figura 1 - Visualização anatômica e histológica do estômago *Apud*. Pimentel, F. 2006.

Figura 2 - Representação esquemática da ação de enzimas antioxidantes. Adaptado de Kwiecien (66)

Figura 3 - A- Exudato Resinoso do breu branco Fonte: portalamazonia.com; B- Árvore do breu branco Fonte: madeiras do Brasil; C-Frutos do breu branco Fonte: Wikipedia

Figura 4 - Efeito do BB 100 mg/Kg nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

Figura 5 - Efeito do BB 100mg/Kg nas lesões gástricas induzidas por Indometacina 30 mg/Kg em ratos

Figura 6 - Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica em ratos tratados com o BB 100mg/Kg.

Figura 7 - Quantificação dos níveis de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos tratados com BB 100 mg/Kg.

Figura 8 - Efeito da administração oral do BB 100 mg/Kg na ALU no estômago de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. (A) Visualização macroscópica das lesões. (B) (ALU).

Figura 9 - Índice de peroxidação lipídica na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.

Figura 10 - Atividade da enzima MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto.

Figura 11 - Níveis de G-SH na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto.

Figura 12 - Efeito da administração do BB 100 mg/Kg durante 14 dias consecutivos, na cura de úlceras induzidas por ácido acético 100%.

Figura 13 - Representação da análise de *Western blot* na expressão de COX-2 (A) e de EGF (B). Efeito da administração oral durante 14 dias consecutivos do BB mg/Kg, na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera gástrica induzida por ácido acético 100%. A análise densitométrica foi realizada seguindo a normalização ao controle (β -actina).

Figura 14 - Efeito do BB 100 mg/Kg administrado v.o. durante 14 dias consecutivos, sobre o peso dos animais.

Figura 15 - Peso dos órgãos dos animais tratados v.o. com Veículo 10 mL/Kg, Cimetidina 100 mg/Kg ou BB 100 mg/Kg durante 14 dias consecutivos.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição química (porcentagem) do BB pela análise de CG-EM.

Tabela 2 - Efeito do BB 100 mg/Kg, administrado em diferentes vias, nos parâmetros ácido-gástricos em ratos submetidos à ligadura de piloro. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m.

Tabela 3 - Atividade da enzima GSH-Px, SOD e GSH-R na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.

Sumário	
<i>Resumo</i>	17
<i>Abstract</i>	19
<i>Lista de abreviaturas e siglas</i>	21
<i>Lista de figuras</i>	25
Lista de Tabelas	26
1. Introdução	31
1.2. Trato gastrointestinal	32
1.3. Secreção gástrica	34
1.4. Proteção gástrica	35
1.4.1. Muco e bicarbonato	35
1.4.2. Prostaglandinas	36
1.4.3. Fluxo sanguíneo	36
1.4.4. Reconstituição	37
1.4.5. Sistema antioxidante	38
1.5. Úlceras pépticas	42
1.6. Etiologia das úlceras pépticas	43
1.7. Dados epidemiológicos	44
1.8. Tratamento de úlcera gástrica	45
2. Plantas medicinais	46
2.1. Espécie selecionada	48
2.1.1. Família Burseraceae	48
2.1.2. Terpenos	49
2.1.3. Óleos essenciais	50
3. Objetivos	53
4. Material e métodos	55
4.1. Animais	55
4.2. Óleo essencial	55
4.3. Identificação dos componentes do óleo essencial	55
4.4. Drogas	56
4.5. Atividade antiulcerogênica	57

4.5.1. Modelo de indução de úlcera gástrica aguda pelo etanol.....	57
4.5.2. Modelo de indução de úlcera gástrica aguda por indometacina	58
4.6. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica	58
4.6.1. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro	58
4.6.2. Muco aderido à mucosa gástrica	59
4.6.3. Níveis de Prostaglandina (PGE ₂)	59
4.7. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	60
4.7.1. Determinação da peroxidação lipídica (LPO)	60
4.7.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	61
4.7.3. Envolvimento do grupamento sulfidril (G-SH) na citoproteção.....	61
4.7.4. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	61
4.7.5. Determinação da atividade da Glutathione peroxidase (GSH-Px).....	62
4.7.6. Determinação da atividade da Glutathione redutase (GSH-Rd).....	62
4.8. Atividade cicatrizante	62
4.8.1. Modelo de indução de úlcera gástrica crônica pelo ácido acético.....	62
4.8.2. <i>Western blotting</i>	63
4.9. Avaliação dos parâmetros toxicológicos	64
4.10 Análise estatística.....	64
5. Resultados	65
5.1. Identificação dos componentes do óleo essencial	65
5.2. Atividade antiulcerogênica.....	66
5.2.1. Modelo de úlcera gástrica aguda induzida pelo etanol	66
5.2.2. Modelo de indução de úlcera gástrica aguda por indometacina	67
5.3. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica	68
5.3.1. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro	68
5.3.2. Muco aderido à mucosa gástrica	69
5.3.3. Níveis de Prostaglandina (PGE ₂)	70
5.4. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	71
5.4.1. Determinação da peroxidação lipídica (LPO)	72

5.4.2. Determinação da atividade da MPO	73
5.4.3. Envolvimento do G-SH na citoproteção	74
5.4.4. Determinação da atividade da SOD, GSH-Px e GSH-Rd.....	75
5.5. Atividade cicatrizante.....	76
5.5.1. Modelo de indução de úlcera gástrica crônica pelo ácido acético.....	76
5.5.2. <i>Western blotting</i>	77
5.6. Avaliação dos parâmetros toxicológicos.....	78
6. <i>Discussão</i>	81
7. <i>Conclusão</i>	93
8. <i>Perspectivas</i>	95
9. <i>Referências bibliográficas</i>	97
10. <i>Apêndice</i>	123
10. 1. Gastroprotective Effects of Essential Oil from <i>Protium heptaphyllum</i> March (Burseraceae) on Experimental Gastric Ulcer Models in Rats.....	123

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

Conhecer a atividade farmacológica de constituintes químicos presentes em espécies vegetais selecionadas para estudo, sempre foi objetivo de todo trabalho envolvendo plantas. Segundo Holetz e colaboradores (1), para se realizar pesquisa com plantas medicinais e obter sucesso na investigação farmacológica são necessários critérios adequados na seleção das espécies vegetais, uma análise fitoquímica preliminar, por exemplo, pode identificar grupos de metabólitos secundários relevantes que podem ou não estar relacionados às atividades biológicas encontradas, direcionando a pesquisa para a obtenção de um fitoterápico eficaz e seguro, além de identificar possíveis princípios ativos tóxicos.

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo: botânica, fitoquímica e farmacologia, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (2).

Combinando as informações populares sobre a flora medicinal com estudos químico/farmacológicos, é possível formular hipóteses quanto à atividade farmacológica e à substância ativa responsável pelas ações terapêuticas relatadas (3).

Assim, para um estudo bem elaborado de uma nova espécie de planta medicinal, faz-se necessário, conjunto de vários profissionais em equipes multidisciplinares,

envolvidos em um trabalho multidisciplinar e interativo, na busca de substâncias ativas com potencial terapêutico (4; 5).

A redução da biodiversidade chama a atenção para espécies que ora existem, mas que poderão extinguir dentro de pouco tempo. Esta redução trouxe a discussão sobre as perdas que estas práticas acarretam e a necessidade de procedimentos que tenham como meta o desenvolvimento sustentável (6).

O conhecimento dos constituintes químicos de diversas partes da planta favorece o seu uso sustentável e contribui para sua conservação. É neste contexto que a realização deste trabalho buscou estabelecer um estudo de úlceras gástricas e a atividade farmacológica do óleo essencial do *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae), popularmente conhecido como “Breu Branco”, na prevenção e tratamento destas úlceras.

1.2. Trato gastrointestinal

Na história da humanidade, as culturas primitivas identificam a natureza com "divindades", dotadas de pensamento e sentimentos, capazes de amor e ódio, que reagem segundo humores próprios. Por volta de 600 a.C. na Grécia, os fenômenos naturais passaram a ser observados com cuidado e até interpretados. A natureza começou assim a perder o seu caráter sagrado. Ao examinar, por exemplo, as vísceras de animais, o homem logo constatou que o trato gastrointestinal (TGI) transforma radicalmente a natureza dos alimentos ingeridos (7).

Neste processo no qual o tubo digestivo é parte fundamental, a simplificação dos alimentos obedece uma sucessão de etapas, nas quais cada segmento como boca, esôfago, estômago e intestino têm sua tarefa funcional, sendo o estômago o reservatório do alimento, além de processá-lo, mecanicamente, por mistura e formação do quimo e, quimicamente, pela secreção de pepsina, ácido clorídrico e do fator intrínseco (8). Após este

processamento o alimento sofrerá redução de tamanho através da digestão e terá sua entrada para o tubo intestinal controlada (8).

O estômago divide-se em cinco regiões revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro. A cárdia se dá na porção onde o estômago se une ao esôfago, está fixa ao diafragma e situa-se cerca de dois centímetros e meio à esquerda da linha média ao nível da nona vértebra torácica. O fundo é a porção do estômago acima de uma linha horizontal que vai da transição esofagogástrica até a grande curvatura. O corpo encontra-se entre o fundo e a incisura angular (ângulo de Hiss). O antro é a porção entre o corpo e o piloro. O peristaltismo antral promove a trituração de alimentos sólidos, reduzindo-os a partículas menores, que assim passam para o duodeno, onde começam a sofrer ação do suco gástrico. O piloro corresponde à junção gastroduodenal, é um esfíncter constituído pelo espessamento da camada muscular circular do estômago e sua localização é aproximadamente ao nível da primeira vértebra lombar (9), (Figura 1).

A mucosa gástrica, por sua vez, é constituída por uma série de depressões e glândulas. Na área glandular oxíntica encontram-se as células oxínticas ou parietais, compreendendo 80% do órgão, principalmente no fundo e no corpo. Na área glandular pilórica encontram-se as células G secretoras de gastrina, principalmente no antro (10), (Figura 1).

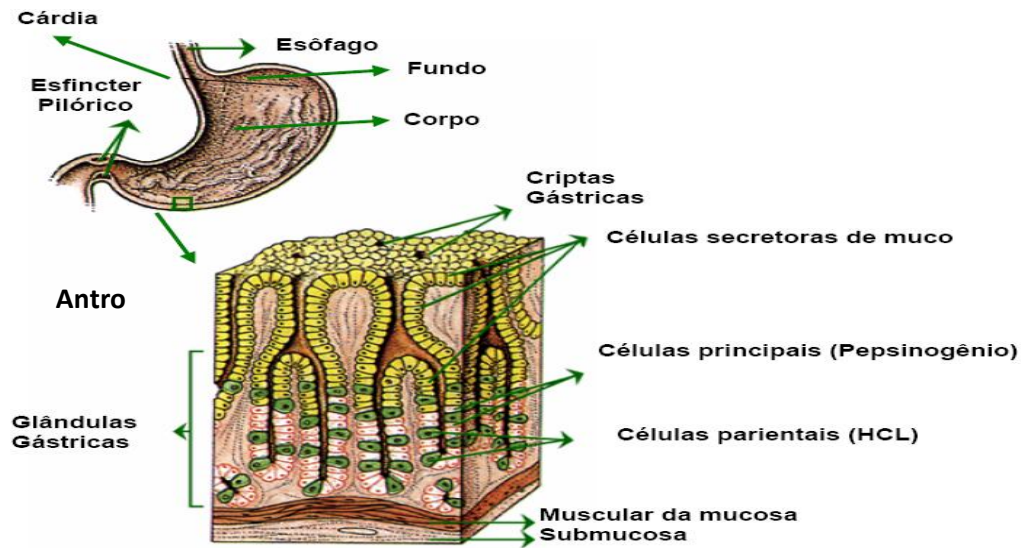


Figura 1- Visualização anatômica e histológica do estômago *Apud*. Pimentel, F. 2006.

1.3. Secreção gástrica

A secreção ácida gástrica é produzida pelas células oxínticas, um dos diversos tipos de células presentes nas glândulas gástricas (11). Esta secreção é o aspecto mais importante da função gástrica estudada na prática médica, sua influência nas alterações gástricas tem sido considerada no desenvolvimento de drogas (12). A produção do ácido depende da secreção da histamina a partir das células enterocromafins de forma parácrina, da acetilcolina lançada a partir de neurônios entéricos pós-ganglionares de forma neuronal e da gastrina liberada das células G de forma hormonal (10). Esta secreção é regulada, então, por mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico (13).

O ácido gástrico no estômago facilita a digestão de proteína, protege contra o crescimento bacteriano e contra infecções entéricas. As H^+/K^+ ATPases das células parietais estão envolvidas na etapa final da secreção ácida gástrica (14).

1.4. Proteção gástrica

O trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos externos nocivos ou a fatores endógenos que podem causar lesões. Em contrapartida, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores protetores como secreção de muco e bicarbonato que protege a mucosa contra estímulos nocivos (15; 16; 17).

1.4.1. Muco e bicarbonato

O muco e o bicarbonato são secretados juntamente pelas mesmas células, as células epiteliais superficiais do epitélio gástrico, constituindo a chamada barreira muco-protetora. Eles formam uma camada gelatinosa que protege a mucosa gástrica do suco gástrico constituindo a primeira linha de defesa da mucosa contra agentes nocivos (18; 19). O muco apresenta-se de forma viscosa, elástica, aderente, como um gel transparente, que contém 95% de água e 5% de glicoproteínas (mucinas), recobrindo toda a superfície da mucosa gastrointestinal, sendo capaz de agir como antioxidante e, desta forma, reduzir danos na mucosa promovidos por radicais livres (17). Sua produção é estimulada por hormônios gastrintestinais (gastrina e secretina), agentes colinérgicos e prostaglandinas (20). Apesar da sua importância ímpar na proteção da mucosa gástrica, alguns fatores e/ou condições fisiopatológicas como infecção por *Helicobacter pylori*, úlceras pépticas e colite ulcerativa podem comprometê-lo, afetando sua estrutura e espessura promovendo o agravamento das mesmas (21; 22; 23).

O Bicarbonato depois de secretado, é retido pelo muco, criando um gradiente de pH entre o lúmen e o epitélio gástrico, mantendo o pH neutro na superfície das células epiteliais. Este pH neutro protege as células epiteliais do pH extremamente ácido encontrado na luz do estômago e impede o contato da pepsina com o epitélio do estômago

devido à presença de fosfolipídeos hidrofóbicos. A regulação fisiológica da secreção do bicarbonato depende de vários fatores. No estômago, é regulado pelas prostaglandinas (20).

1.4.2. Prostaglandinas

As prostaglandinas (PG) derivadas do ácido araquidônico são denominadas de PG da série 2 ou PGE_2 , PGD_2 , PGI_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (24). A hidrólise de fosfolipídios de membrana, mediada pela fosfolipase A_2 , libera no citoplasma o ácido araquidônico, a partir do qual as PG são sintetizadas pela ação das ciclooxygenases (COX). Existem duas isoformas conhecidas a COX-1, constitutiva, que é relacionada à síntese fisiológica de PG e a COX-2, induzida, que aumenta a síntese de prostanóides na inflamação e em várias doenças (25; 26).

As PG são encontradas em todos os tecidos e órgãos e estão envolvidas em uma variedade de funções fisiológicas e patológicas (24), dentre elas estão modulação do fluxo sanguíneo, estimulação de muco, secreção de bicarbonato e aumento da resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (27; 28; 29; 30).

As drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs) inibem, de forma não seletiva, as enzimas COX e, conseqüentemente, a síntese de PG. O uso frequente de DAINes está relacionado ao desenvolvimento de gastrite e úlcera gástrica, fato que evidencia a importância das PG para a manutenção da integridade da mucosa gástrica (31).

1.4.3. Fluxo sanguíneo

É regulado e modificado por sistemas e fatores metabólicos locais como PG, leucotrieno e outros mediadores químicos endógenos na mucosa (32). Um dos papéis do fluxo sanguíneo é o de suprir de oxigênio, nutrientes e hormônios a mucosa gástrica, além de participar da regulação da saída do ácido, da produção de muco e da secreção de bicarbonato. A redução do fluxo sanguíneo torna a mucosa gástrica mais suscetível, o que

favorece formação das lesões causadas por estresse, etanol e DAINes (32; 33; 20) enquanto que o aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica diminui sensivelmente o dano causado por diversos agentes nocivos, portanto, a microcirculação gástrica regula a capacidade do estômago de reagir a agentes lesivos (34).

1.4.4. Reconstituição

O termo reconstituição refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida (35).

As células superficiais do epitélio do estômago são responsáveis pela secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos e formam uma importante barreira contra a difusão do ácido e da pepsina, devido à presença de junções oclusivas (*tight junctions*) (20).

O epitélio gástrico humano renova-se completamente a cada 2-4 dias, considerando a importância da superfície epitelial para prevenção de lesões no estômago, torna-se fundamental um balanço adequado entre perda e renovação celular para manter a integridade da mucosa gástrica (20).

A cicatrização da mucosa na úlcera gástrica se dá pela reconstituição da estrutura glandular epitelial, restauração da lâmina própria, aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera e aumento significativo de gastrina plasmática e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e interleucina (IL)-1 β (36; 37; 38; 20).

Todos estes eventos supracitados conduzem à cicatrização da úlcera e são controlados por fatores de crescimento epitelial vascular (vEGF), epidermal (EGF), fibroblástico básico (bFGF), de hepatócito (HGF) além de fator de transcrição e COX-2. De modo geral, estes fatores promovem proliferação e migração de células epiteliais para a

cratera da úlcera, levando à re-epitelização desta e maturação das glândulas. O EGF, seu receptor e a COX-2 são fundamentais neste processo de cicatrização (36; 39; 37; 38; 20).

Com o progresso da cicatrização da úlcera, ocorre o declínio gradual do fluxo sanguíneo, da gastrina plasmática e das citocinas pró-inflamatórias (36; 40).

1.4.5. Sistema antioxidante

Durante as últimas duas ou três décadas, muita atenção tem sido dada à bioquímica dos radicais livres, porque radicais livres medeiam algumas condições fisiopatológicas tais como inflamação, processo isquêmico e carcinogênese (41).

Radicais livres são átomos ou moléculas que contém um ou mais elétrons não pareados em sua última camada de valência. A presença deste elétron não pareado altera a reatividade química dos átomos ou moléculas tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares (aquelas com os elétrons pareados) (42; 43; 44). Os radicais livres danificam as proteínas das membranas, diminuem enzimas antioxidantes, podem destruir órgãos linfáticos, levando a depressão/dano do sistema imunológico (45).

Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o nitrogênio (N_2), estes radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de O_2 ou N_2 , são denominados ERO (espécies reativas do oxigênio) e ERN (espécies reativas do nitrogênio) (46; 47; 48).

As ERNs como o óxido nítrico (NO), estão envolvidas na sinalização celular durante uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (49).

O NO é um mediador envolvido tanto na inflamação quanto na proteção e manutenção de determinadas funções fisiológicas. Participa da proteção da mucosa gástrica relaxando o endotélio, regulando a microcirculação, inibindo a infiltração de neutrófilos e diminuindo a expressão de moléculas de adesão e algumas citocinas (50; 37; 51; 49).

Entretanto, em altas concentrações, o NO pode inibir enzimas de reparo do DNA e aquelas dependentes de grupamentos sulfidríla, além de formar peroxinitritos (ONOO^-) após reagir com ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e contribuir com o estresse oxidativo (52). O NO que ocorre como poluente atmosférico, também é gerado endogenamente em uma gama de células pela ação de três diferentes isoformas que podem ser do tipo constitutiva (endotelial – eNOS e neuronal – nNOS) ou induzida (iNOS), que catalisam a conversão de L-arginina para L-citrullina. A ação citotóxica do NO está principalmente relacionada à atividade da iNOS que, ao ser estimulada, produz NO por longos períodos de tempo e em grandes quantidades, favorecendo a formação de ONOO^- (50; 37; 49).

O oxigênio, é indispensável para todos os organismos aeróbios incluindo os seres humanos. Durante os processos vitais, o corpo produz um número de espécies derivadas de oxigênio, que são referidas como EROs, são elas: ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e peroxil ($\text{ROO}^\bullet$); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HClO) e hipoclorito (ClO^-), são produzidas endogenamente, principalmente através do processo de respiração mitocondrial e exogenamente pela exposição a condições deletérias, incluindo xenobióticos, agentes infecciosos e luz ultra violeta (49).

As EROs podem ser formadas na cadeia de transporte de elétrons que ocorre na membrana mitocondrial interna, durante a síntese de ATP, onde quatro elétrons doados por $\text{NADH} + \text{H}^+$ ou FADH_2 depois de atravessarem a cadeia de transporte, são transferidos pela citocromo oxidase ao oxigênio, formando água. A transferência monovalente de elétrons pode resultar em redução incompleta do oxigênio e gerar $\text{O}_2^{\bullet-}$ (43; 46).

A dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ produz H_2O_2 , que não apresenta grande reatividade, mas pode

dar origem ao $\bullet\text{OH}$, o radical mais deletério ao organismo, através de reações com metais de transição como Fe^{2+} ou Cu^+ (43; 46).

Outra fonte de produção de radicais livres em meios biológicos é o processo inflamatório no qual o oxigênio é reduzido a $\text{O}_2^{\bullet-}$, por meio da enzima NADPH oxidase presente por exemplo, na membrana plasmática de células fagocitárias (48). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é convertido a H_2O_2 , que pode originar ácido hipocloroso ou hipoclorito na presença do ânion cloreto (Cl^-), em reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO) (53).

As EROs estão envolvidas em uma ampla gama de processos fisiológicos (produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, síntese de substâncias biológicas importantes, transdução de sinal e envelhecimento) assim como patológicos (inflamação, carcinogênese, doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças cardiovasculares, artrite, câncer e úlceras gástricas) (41; 49).

Além de causar oxidação de moléculas biológicas, as EROs são capazes de modular vias de sinalização intracelular ou agir como substâncias parácrinas, através da ativação de citocinas, angiotensinas e fatores de crescimento. As EROs também são apontadas como fatores reguladores da resposta inflamatória (54; 53).

Dentre os elementos ativados pelas EROs está o fator nuclear de transcrição kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$), que regula a expressão de diversos genes importantes para o processo inflamatório e para proliferação celular (55; 56). O $\text{NF}\kappa\text{B}$ regula a expressão de várias citocinas, das enzimas iNOS e COX-2 além de outros mediadores inflamatórios como moléculas de adesão (57; 53; 58).

Quando produzidas em quantidades adequadas as EROs são essenciais para a vida e apresentam um equilíbrio entre sua formação e detoxificação por agentes antioxidantes

endógenos. Porém, quando ocorre um desequilíbrio entre esta formação e detoxificação, tornam-se prejudiciais, pois ocorre estresse oxidativo que oxida biomoléculas e o próprio DNA induzindo a morte celular, a menos que os sistemas de defesa de enzimas antioxidantes seja restabelecido (41; 49).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta. Antioxidante é uma molécula que protege um alvo biológico contra dano oxidativo (59).

O organismo possui agentes antioxidantes não enzimáticos (vitaminas A, E, C, β -caroteno, glutathiona (GSH), transferrina, compostos com grupamento sulfidríla e quelantes como EDTA) (60; 61; 62) e enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GSH-Rd)). A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet -}$ em um radical menos nocivo, como o H_2O_2 , o qual é futuramente degradado pela CAT ou GSH-Px. A CAT é uma enzima que acelera a degradação do H_2O_2 em água e O_2 (63; 64; 65). A segunda via de degradação do H_2O_2 é através da ação da GSH-Px em cooperação com a GSH-Rd. A redução do H_2O_2 em água e O_2 pela GSH-Px é acompanhada pela conversão da GSH na forma reduzida para a forma oxidada (GSSG). A enzima G-Rd retorna GSSG a sua forma reduzida GSH (63; 65), (Figura 2).

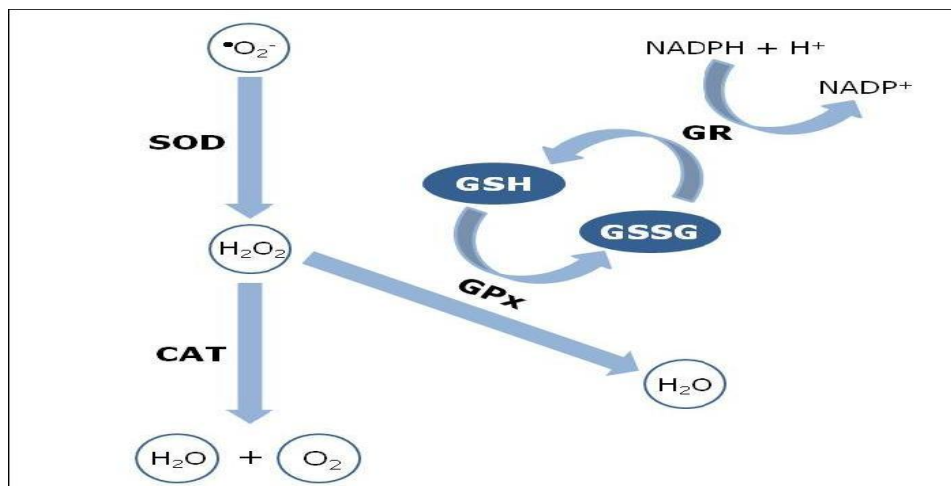


Figura 2 - Representação esquemática da ação de enzimas antioxidantes. A enzima SOD catalisa a dimutação de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , o qual é convertido em H_2O e O_2 pela enzima CAT, ou em H_2O , pela atividade da GSH-Px, que nesta reação oxida uma molécula de GSH. A enzima GSH-Rd retorna GSSG a sua forma reduzida (GSH). Adaptado de Kwiecien (66).

1.5. Úlceras pépticas

Originalmente, acreditava-se que todas as úlceras do TGI eram causadas apenas pela ação agressiva do ácido clorídrico e da pepsina sobre a mucosa, assim, tornaram-se conhecidas como “úlceras pépticas” (67). A úlcera péptica (UP) é um problema global muito comum, sua incidência e prevalência vêm aumentando constantemente. Acredita-se que seu desenvolvimento é devido à perda do delicado equilíbrio entre os fatores gastroprotetores e fatores agressores. A diminuição dos fatores gastroprotetores e o aumento dos fatores agressores resultam em ulceração (68; 69). Por definição, UP consiste em lesões ulceradas no estômago, chamada de úlcera gástrica (UG) ou no duodeno, chamada de úlcera duodenal (UD); estas lesões se estendem através da mucosa e penetram a camada muscular (70; 71; 72).

Geralmente, os estímulos lesivos sobre a mucosa, responsáveis pela formação de UG, são acompanhados por danos microvasculares locais, com consequente isquemia, diminuição da distribuição de nutrientes, formação de radicais livres e necrose tecidual (38; 20).

A UG é considerada uma doença dos tempos modernos, que muitas vezes se torna fatal. Antes não se apresentava em proporções significativas na clínica médica, mas, atualmente, distúrbios gastrointestinais ocorrem em número expressivo, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. É uma alteração histológica da mucosa onde se observa infiltrado de células inflamatórias, podendo ser aguda, crônica ou apresentar formas especiais (73; 74; 75; 76).

As UP com complicações levam a um alto índice de mortalidade, principalmente em pacientes idosos, assim se faz necessário o conhecimento etiológico destas, para investigar uma possível maneira de preveni-las (77).

1.6. Etiologia das úlceras pépticas

Foi estabelecido que a infecção por *Helicobacter pylori* seja a maior causa das úlceras gástricas, aproximadamente metade da população mundial está infectada por *H. pylori*. Esta bactéria está presente em 75% dos casos de UP sendo mais predominante em países em desenvolvimento que em países desenvolvidos (78; 79; 80).

Estudos demonstram que o uso de DAINes é o maior fator de risco para UP não associadas com *H.pylori*, especialmente úlcera gástrica. Estima-se que usuários crônicos de DAINes têm risco de desenvolver úlcera gástrica 46 vezes maior que a média da população. A patogênese das DAINes depende em parte de sua habilidade em reduzir a produção de PG através da inibição da COX; mecanismo COX-dependente, e em parte pelo mecanismo COX-independente, incluindo disfunção mitocondrial, prejuízo da

movimentação das células da mucosa e a ativação dos neutrófilos. A combinação da ativação destes dois mecanismos leva a um dano oxidativo no tecido (81; 82; 83; 84).

Além dos dois fatores citados, outros podem estar relacionados à etiologia da UP como doença de Crohn, hipercalcemias, hiperfunção de células G, infecção por *Helicobacter heilmanni*, citomegalovírus ou herpes do tipo I. Para uma pequena parcela de indivíduos com úlcera gástrica não se identifica a causa etiológica da doença, são os casos de úlceras idiopáticas (82).

Outros fatores de risco como tabagismo, predisposição genética, ingestão de álcool, estresse físico e psicológico podem desencadear a UP (85; 74; 86; 75).

Quanto aos fatores de risco verificou-se que o fenômeno das migrações populacionais, o aumento da participação da mulher no mercado de trabalho e o estresse a ele associado interferem aumentando a incidência da úlcera, além de existir uma correlação importante entre o aumento de idade e a incidência de úlcera (87; 88; 89). Verificou-se também que um terço da população mundial com quinze anos ou mais seja fumante, evidências epidemiológicas sugerem que o cigarro seja deletério para o TGI aumentando a incidência, reincidência e retardando a cura da UP. O uso excessivo do álcool está geralmente relacionado com alterações no TGI, exames revelam alterações morfológicas, mudanças na flora bacteriana, na absorção e motilidade gastrointestinal (90; 91; 92).

Um fator peculiar da UP é que, mesmo sob exposição a fatores de risco em grau similar, alguns pacientes desenvolvem a doença gástrica, outros não, e ainda alguns sofrem complicações fatais, outros não (93).

1.7. Dados epidemiológicos

As UP afetam cerca de 10% da população mundial. A incidência desta enfermidade no mundo é estimada em 1.500 a 3.000 casos, por 100.000 habitantes, por ano.

No Brasil, apesar de ser uma doença frequente, não se conhece precisamente sua real incidência. Nas diferentes estatísticas, a incidência de UP no Brasil varia de 1 a 20%, devido à variação das populações estudadas, a diferenças na coleta de dados e aos critérios de diagnóstico (94; 95; 82). Em geral, os estudos para diagnóstico das UP, são baseados tanto na soro prevalência como na endoscopia (96).

1.8. Tratamento de úlcera gástrica

O tratamento de úlcera gástrica consistiu, por muito tempo, em procedimento cirúrgico, com altas taxas de morbimortalidade. Na década de 70, surgiu a terapia baseada na redução da secreção ácida, com uso de antagonistas de receptores histamínicos (H_2) como a Cimetidina, a utilização destes inibidores reduziu bastante a terapia invasiva de úlceras pépticas. Na década de 80, o surgimento de inibidores de bomba protônica (PPI), como o Lansoprazol, permitiu o aumento dos índices de cicatrização de úlceras gástricas (97; 88; 92; 98). A associação de *H.pylori* com o surgimento de úlceras gástricas, fato que revolucionou a terapêutica desta enfermidade também ocorreu na década de 80. Assim, o tratamento de primeira linha em casos de úlcera gástrica com presença de *H.pylori*, consiste atualmente, na administração de PPI ou de antagonistas de H_2 , associados a antibióticos (99; 100; 101).

Porém, existem alguns problemas a serem resolvidos, como tratar úlceras quando há falhas na erradicação de *H. Pylori*, como prevenir o desenvolvimento e evitar a reincidência de úlceras em usuários de DAINes e como tratar úlceras não relacionadas à infecção por *H.pylori* ou ao uso de DAINes. O que torna necessário investigar novas substâncias para o tratamento desta doença.

2. Plantas medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A estas substâncias é dado o nome de princípios ativos e são eles os responsáveis pelo efeito terapêutico que a planta medicinal possui. Estes princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e são produzidos (quase todos) pelo metabolismo secundário das plantas (102).

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais mágico/religiosos ou como medicamento (103; 104). Autores gregos e muitos físicos da Arábia, já descreviam a existência de numerosos remédios obtidos através da utilização de material vegetal a partir da indicação popular. Atualmente, mesmo com o advento das inovações tecnológicas na síntese de novos fármacos, as plantas ainda constituem excelentes ferramentas para a descoberta de novas moléculas farmacologicamente ativas (105).

De acordo com a OMS, 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais, sendo a maioria de países em desenvolvimento (104).

A fitoterapia, que é o estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças, acompanha a humanidade desde os povos primitivos, sendo reconhecida pela OMS na Conferência de Alma-Ata em 1978. O aproveitamento das plantas medicinais foi ressaltado como parte do programa “Saúde Para Todos” no ano 2000, recomendando-se inclusive, a realização de mais estudos e a propagação do uso das plantas medicinais regionais como uma maneira de diminuir os custos dos programas de saúde pública (106).

O aumento do uso da medicina herbária levou muitos cientistas a contribuir com a pesquisa neste sentido. Depois de uma fase inicial de críticas, hoje eles reconhecem a possibilidade de investigar o valor científico dos produtos medicinais, compostos essencialmente de extratos vegetais (107).

A maior parte da flora medicinal é ainda desconhecida químico/farmacologicamente, o Brasil está incluído entre as doze nações que abrigam 70% da biodiversidade do planeta. A importância, de âmbito global, da conservação desta biodiversidade, soma-se sua relevância para a economia do país. Dados recentes na literatura demonstram a grande variedade de substâncias químicas isoladas de plantas que apresentaram atividade antiulcerogênica e contra distúrbios do trato gastrointestinal (3; 108).

Acredita-se que os produtos naturais devam ser discutidos na farmacologia e que, posteriormente, possam vir a ser usados para o tratamento e cura da UP. De acordo com recentes publicações, muitas plantas medicinais apresentam atividade antiulcerogênica aumentando fatores protetores da mucosa, diminuindo secreção ácida gástrica, inibindo o crescimento da *H. pylori* e modulando enzimas antioxidantes (109; 110; 111; 112; 113; 114). Uma das mais utilizadas como ferramenta farmacológica, a carbenoxona, é derivada do ácido glicirretínico, extraído de *Glycyrrhiza glabra* ou alcaçuz (115; 116; 117).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o uso terapêutico de plantas medicinais e seus manufaturados ajudariam a diminuir a importação de fármacos ou medicamentos e ainda incrementaria o desenvolvimento econômico. Além disto, medicamentos derivados de plantas conhecidas, tendem a ser mais aceitos pela população facilitando a aderência ao tratamento (118).

2.1. Espécie selecionada

2.1.1. Família Burseraceae

A família Burseraceae originária na América do Norte migrou para regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, resultando em cerca de 18 gêneros e mais de 800 espécies conhecidas, distribuídas por todo o Sul do continente Americano e pela Europa, alcançando África, Ásia e Oceania (119; 120). Alguns gêneros desta família são produtores de uma seiva oleosa rica em óleo essencial e triterpenos (119).

É, em grande parte, representada pelo gênero *Protium*, que compreende cerca de 135 espécies. Estima-se que mais de 80% das espécies de Burseraceae na região amazônica, pertençam a este gênero, que, além de ser o maior gênero de sua família, é também o mais heterogêneo (121).

Pertencente ao gênero *Protium*, encontra-se o *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) popularmente conhecido como almécega ou breu branco, abundante na região Amazônica e em várias outras partes do Brasil. O exudato resinoso (Figura 3A) coletado do tronco desta planta *in natura* é um remédio popular com ação anti-inflamatória, antiulcerogênica, analgésica, repelente de insetos, expectorante e cicatrizante de feridas (122; 120; 121).

É uma árvore pequena (10 metros de altura) com tronco espesso 50-60 cm de diâmetro na base, casca vermelho-escura, folhas opostas, imparipinadas, (Figura 3B) flores miúdas em panículas terminais e seus frutos são drupas avermelhadas contendo de uma a quatro sementes (Figura 3C). Apresenta copa simples, de densidade foliar intermediária. Quando sofre um dano qualquer no tronco, libera um líquido esbranquiçado, com odor agradável. Também exala um cheiro apazível quando se destaca alguma de suas folhas. Esta característica lhe dá o nome de amescla-de-cheiro. A casca viva possui odor agradável

e cor amarelada; após oxidação apresenta modificação da coloração para avermelhada. A floração é a partir do mês de junho, prolongando-se até agosto (123).

A resina extraída da casca do *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) é rica em monoterpenos e triterpenos. Os triterpenos isolados de várias espécies de plantas medicinais são, em geral, responsáveis, pelo menos em parte, por suas atividades biológicas, geralmente têm propriedades anti-inflamatória, antiulcerogênica, antitumoral, e hepatoprotetora (124). Foi demonstrada função gastroprotetora sobre danos induzidos por etanol da resina crua do breu branco (122). Também foi demonstrada, atividade anti-inflamatória e antitumoral de óleos essenciais obtidos a partir das folhas e resina do *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) (125; 122; 124).

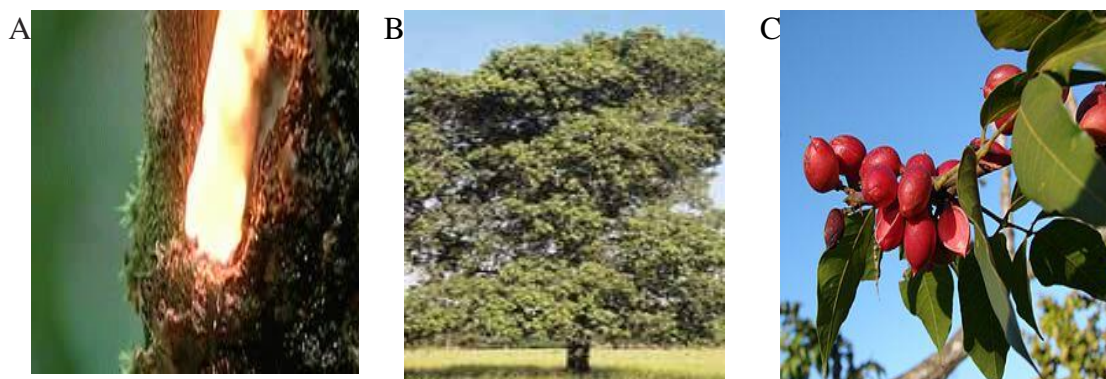


Figura 3 - A- Exudato Resinoso do breu branco Fonte: portalamazonia.com; B- Árvore do breu branco Fonte: madeiras do Brasil; C-Frutos do breu branco Fonte: Wikipedia

2.1.2. Terpenos

O grupo dos terpenos compreende cerca de 15 a 20.000 estruturas já identificadas. Ele se distingue das outras classes de compostos secundários vegetais pela sua origem, a partir do mevalonato e isopentenil pirofosfato, além da natureza lipofílica de suas estruturas. Quimicamente, os terpenóides são usualmente caracterizados como hidrocarbonetos insaturados com diferentes quantidades de oxigênio ligados ao seu

esqueleto isoprênico. A nomenclatura dos terpenóides depende basicamente do número de estruturas isoprênicas e dos átomos de carbono presentes na molécula (126).

A grande diversidade estrutural dos terpenos dificulta o resumo de suas características comuns, pois, não somente existe uma grande variedade dos grupos funcionais, como também do número de átomos de carbono que formam seus esqueletos. Os terpenos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e sua frequência e abundância estão intimamente ligadas a fatores genéticos e climáticos (127).

Diversos terpenóides, incluindo lactonas sesquiterpênicas, diterpenos e triterpenos, foram avaliados cientificamente quanto ao seu potencial antiulcerogênico (69). Entretanto, o único terpenóide já comercializado para o tratamento de úlceras gástricas foi a Carbenoxolona, um triterpeno pentacíclico derivado do ácido glicirretínico (U.S. Patent 3.070.623). Sintetizada em 1960 pela Biorex Laboratories, a Carbenoxolona foi amplamente usada na Europa para o tratamento de úlceras gástricas. Entretanto, seus efeitos benéficos eram acompanhados por graves efeitos colaterais em um número significativo de pacientes, atualmente é usada somente como ferramenta farmacológica (128; 129; 116).

2.1.3. Óleos essenciais

Os Óleos essenciais (OE) são obtidos de partes de plantas aromáticas (130). Em geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas que apresentam solubilidade em solventes orgânicos apolares com aparência oleosa à temperatura ambiente; são extraídos, principalmente, através de destilação por arraste com vapor d'água e, logo após a extração, são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados. Os OE diferem dos óleos fixos, pois estes, geralmente são uma mistura de substâncias lipídicas obtida na maioria das vezes de sementes (131).

A maior parte dos OE é constituída de terpenóides (131) sua composição química

pode variar conforme o órgão da planta, idade ou estágio do ciclo vegetativo e às condições ambientais (132).

O uso dos OE, devido à sua fragrância e propriedades medicinais, remonta à antiguidade, onde eram utilizados em embalsamento, conservação de alimentos, práticas religiosas e medicinais (132). A longa história que descreve o uso dos OE para fins medicinais sugere a presença de componentes farmacologicamente ativos (133). Estudos recentes demonstram a gama de propriedades medicinais dos OE como antioxidante (134), anti-inflamatória (135), antinociceptiva (136), antimicrobiana (137), antifúngica (138) e antiulcerogênica (139; 140).

Atualmente, cerca de 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dentre os quais 10% são comercialmente importantes para a indústria farmacêutica, na qual são empregados *in natura* para a preparação de infusões ou sob a forma de preparações farmacêuticas simples. Devido a esta utilização crescente, o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos voláteis constituem importantes atividades econômicas (131; 132).

3. Objetivos

1. Analisar a composição química do óleo essencial da espécie *Protium heptaphyllum* March (BB);
2. Avaliar a atividade antiulcerogênica do BB, em modelos clássicos de indução de úlcera gástrica em ratos;
3. Avaliar o possível mecanismo de ação antiulcerogênica relacionado à prevenção das úlceras gástricas;
4. Avaliar o possível potencial cicatrizante envolvido na atividade antiulcerogênica do BB.
5. Avaliar os possíveis mecanismos antioxidantes envolvidos na atividade antiulcerogênica do BB.

4. Material e métodos

4.1. Animais

Para avaliação da atividade antiulcerogênica e elucidação dos mecanismos de ação do BB, foram utilizados ratos machos Wistar Unib: WH, pesando entre 180-250g, todos provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de quinze dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar em torno de $60\pm 1\%$ e ciclos/claro escuro controlados de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Nuvital (Nuvilab[®]), água *ad libitum* e distribuídos ao acaso nos diferentes grupos experimentais. Os períodos de jejum a que foram submetidos os animais estão de acordo com o preconizado para cada uma das metodologias empregadas. Os protocolos experimentais dos testes utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEUA-IB-Unicamp), protocolo número 852-1. Todos os experimentos foram iniciados no período da manhã.

4.2. Óleo essencial

O BB foi comprado de Laszlo Aromaterapia Ltda. e foi obtido a partir de folhas e caule desta espécie por destilação a vapor. Partes do *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae), foram coletadas no delta do rio Jequiriçá, na cidade de Valença, Estado da Bahia (BA), Brasil, por Antonio Calmon. Sua exsicata foi analisada e identificada pelo Prof. Jorge Yoshio Tamashiro, do Departamento de Biologia Vegetal do IB - Unicamp, um exemplar foi depositado no Herbário UEC (Herbário da Universidade Estadual de Campinas, SP-Brasil) com o "voucher" n° 151890.

4.3. Identificação dos componentes do óleo essencial

As amostras do BB foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas eletrônica (70eV) (CG-EM, Shimadzu, GC-2010), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária (DB-5; 5,30 m x 0,32mm x 0,25 µm), o hélio foi usado como gás de arraste (1,52 mL/min, a White Martins, 99,9%), a temperatura do injetor a 250°C, a temperatura do detector a 250°C e razão de split 1:30. Os espectros de massa foram obtidos em intervalos de massa entre 40-600 m/z. O óleo essencial (10 µL) foi diluído em clorofórmio (1:100) para produzir 1 µL de solvente cromatográfico, o qual foi injetado como amostra na taxa de divisão de 1:30. A temperatura da coluna foi programada para 60°C (3 min) -220°C (5 min) a 3°C/min, com tempo total de corrida de 40 min. O espectro de massa foi de 40 a 600 u.m.a. A identificação das substâncias foi realizada pela comparação de seus espectros de massas com o banco de dados do sistema GC-MS (NIST 62 lib.), com a literatura e com os índices de retenção de Kovats (141). Este índice foi calculado através da equação de Kovats, utilizando-se uma solução padrão de hidrocarbonetos (C₈ a C₂₀). Todos os procedimentos de análise foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal do IB – Unicamp, com colaboração do Prof. Dr. Marcos José Salvador.

4.4. Drogas

As drogas utilizadas foram o Lansoprazol (Medley, Campinas-SP, Brazil), Tween 80[®] e ácido acético (Sinth, SP, Brasil), etanol absoluto (Merk[®] KGaA, Darmstadt, Germany), Cimetidina, Carbenoxolona e Indometacina (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA). Todos os reagentes possuíam alto grau de pureza. O BB foi dissolvido em Tween 80[®] a 12%.

4.5. Atividade antiulcerogênica

Para avaliar a atividade antiulcerogênica do BB foram realizados experimentos de indução de úlcera gástrica por etanol e Indometacina. Com base em suas respectivas especificações foram utilizados: grupos controle positivo (tratados com Cimetidina 100mg/Kg ou Lansoprazol 30mg/Kg) e controle negativo (Veículo 10 mL/Kg), o BB foi administrado em diferentes doses, por via oral (v.o.) ou por via intraduodenal (v.i.). Após cada experimento, os animais foram mortos por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, as áreas de lesões ulcerativas foram examinadas com um microscópio de dissecação (Nikon SMZ 800) e fotografadas com uma câmera Nikon Coolpix 4500 para serem analisadas posteriormente através do Bioview 4 (AvSoft, Brasil), um software de análise de imagem (142).

4.5.1. Modelo de indução de úlcera gástrica aguda pelo etanol

Após 24 horas de jejum e livre acesso a água, ratos machos Wistar Unib: WH (n = 7, por grupo) foram tratados v.o., por gavagem, com o BB nas doses 12,5, 25, 50 e 100 mg/Kg, com Lansoprazol 30 mg/Kg (controle positivo) e com Veículo 10 mL/Kg (controle negativo). Após 1 hora deste tratamento, foi induzida a lesão gástrica pela administração, também por v.o., de 1 mL/Kg de etanol absoluto. Após 1 hora da indução, os animais foram mortos por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, examinados, fotografados e analisados conforme descrito anteriormente (143).

De acordo com os resultados obtidos a partir deste experimento, no qual o BB 100 mg/Kg inibiu significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas por etanol, esta dose foi selecionada para os demais ensaios.

4.5.2. Modelo de indução de úlcera gástrica aguda por Indometacina

Após 24 horas de jejum, ratos machos Wistar Unib: WH (n = 7, por grupo) foram tratados por v.o. com Veículo 10 mL/Kg, Cimetidina 100 mg/Kg ou BB 100 mg/Kg. Passados 30 min do tratamento, os danos gástricos foram induzidas por administração subcutânea de Indometacina 30 mg/Kg e, 4 horas após a administração da Indometacina, os animais foram mortos por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, examinados, fotografados e analisados conforme descrito anteriormente (144).

4.6. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica

4.6.1. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro

Os experimentos de ligadura do piloro em ratos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Shay (145) com modificações em Batista (146). Após 24 horas de jejum, os animais, sob anestesia com ketamina 50 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para localização e amarradura do piloro. Imediatamente após a ligadura do piloro foram administrados por v.o. e v.i. o Veículo 10 mL/Kg (controle negativo), a Cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) e o BB 100 mg/Kg. Após as administrações as incisões foram suturadas, 4 horas após a cirurgia, os ratos foram mortos por deslocamento cervical, as incisões reabertas e, mantendo-se a ligadura do cárdia (para preservação do conteúdo gástrico), os estômagos foram retirados. O conteúdo estomacal foi coletado e pesado logo em seguida, este conteúdo foi expresso em mL. O pH foi determinado em pHmetro (PA 200, Marconi S.A., Piracicaba, Brasil).

4.6.2. Muco aderido à mucosa gástrica

Após 24h de jejum, os animais ($n = 7$, por grupo) foram tratados por administração v.o. de Veículo 10 mL/Kg, Carbenoxolona 200 mg/Kg ou BB 100 mg/Kg. Uma hora depois, os animais sob anestesia (50 mg/Kg de ketamina e 10 mg/Kg de xilazina) foram submetidos a uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a ligadura do piloro. Quatro horas após a ligadura, os animais foram mortos por deslocamento cervical, as porções glandulares dos estômagos foram separadas, pesadas e imersas em solução de Alcian Blue para o procedimento de quantificação de muco. A leitura das absorbâncias foi realizada a 598 nm e os resultados expressos como μg de Alcian Blue/g de tecido (147).

4.6.3. Níveis de Prostaglandina (PGE_2)

A metodologia foi realizada segundo Curtis (148). Os animais permaneceram em jejum durante 24 horas e foram aleatoriamente divididos em grupos ($n = 7$, por grupo) Sham, Veículo 10 mL/Kg + DAINes e BB 100 mg/Kg + DAINes. Primeiramente, Indometacina dissolvida em solução de bicarbonato de sódio 5% (30 mg/Kg) - foi administrada pela via subcutânea. Meia hora depois, os animais foram tratados (via oral) com Veículo 10mL/Kg ou BB 100 mg/Kg e meia hora após o tratamento oral, os animais foram mortos por deslocamento cervical e seus estômagos removidos. As porções glandulares dos estômagos foram raspadas, pesadas e suspensas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (PB) (10 mM, pH 7,4). Os raspados foram homogeneizados com Polytron (PT – 10 – 35, Kinematica AG – Switzerland) e encubados a 37°C por vinte minutos. Os níveis de PGE_2 foram quantificados utilizando-se um kit de dosagem imuno-enzimática (R&D Systems, EUA).

4.7. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

Para avaliar a atividade antioxidante *in vivo* do BB, foram feitas medições da atividade de enzimas antioxidantes e produtos da oxidação da mucosa gástrica, em relação aos índices de lesão ulcerativa obtidos em modelo experimental de úlcera induzida por etanol absoluto (143). Os animais foram divididos em quatro grupos ($n = 7$, por grupo): Sham, Veículo 10 mL/Kg, Lansoprazol 30 mg/Kg, BB 100 mg/Kg. O grupo Sham foi formado por animais não tratados, expostos aos procedimentos experimentais, mas sem efetiva indução de úlcera. Os estômagos foram abertos ao longo da maior curvatura e as suas porções glandulares foram raspadas com lâminas de vidro e homogeneizadas em 1mL de PB 0,1 M (pH = 7,4). Os homogenatos permaneceram congelados a -70°C , até a realização dos ensaios bioquímicos. As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente e os resultados expressos em nmol/min/mg de proteína. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com método descrito por Bradford (149), utilizando albumina do soro bovino para estabelecimento da curva padrão.

4.7.1. Determinação da peroxidação lipídica (LPO)

As concentrações da peroxidação lipídica da mucosa gástrica foram determinadas pela estimativa de malonildialdeído, utilizando o teste do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (150). Os estômagos dos ratos foram retirados e lavados imediatamente com salina fria. Para minimizar a possibilidade de interferência de hemoglobina com os radicais livres, todo o sangue que adere à mucosa foi cuidadosamente removido. A mucosa do corpo foi raspada, pesada e homogeneizada, este homogenato foi diluído KCl, 15M (relação 1:10). Ao homogenato (0,5 mL) foi adicionada uma solução contendo: 0,2 mL de 80 g/L de lauril sulfato de sódio; 1,5 mL de 200 g/L de ácido acético; 1,5 mL de 8 g/L de 2-

tiobarbitúrico e 0,3 mL de água destilada. Esta mistura foi aquecida a 98°C durante 1 hora e depois resfriada, 5mL de n-butanol: piridina (15:1) foi adicionada. A mistura foi para o vórtex por 1 min e centrifugadas por 30 min a 4000 × g. A absorbância do sobrenadante foi medida em 532 nm. A curva padrão foi obtida através de 1,1,3,3 tetramethoxypropano. A recuperação foi de mais de 90%. Os resultados expressos como nanomoles MDA por grama de tecido úmido (nmol / gr. tecido).

4.7.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO na mucosa gástrica foi determinada de acordo com o método de Winterbourn (151). As amostras do raspado da mucosa gástrica foram centrifugadas a 12.000 × g, por 15 min, a 4°C. A uma alíquota do sobrenadante foi adicionada solução de O-dianisidina (0,167 g/L) e 0,0005% H₂O₂ em PB 50mM, pH 6,3, na proporção de 1:30. As absorbâncias foram lidas a 460 nm, por 10 minutos e os resultados expressos em U/g de proteína.

4.7.3. Envolvimento do grupamento sulfidrila (G-SH) na citoproteção

As amostras foram centrifugadas (12000 × g, a 4°C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em PB (0,1 M, pH 7,4). A seguir, fez-se a leitura da absorbância de 100 µl da amostra, acrescidos de 100 µl de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura adicionou-se 20 µl de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01mM) e realizou-se nova leitura (A2), a 412 nm, decorridos 15 minutos da reação, para determinação de G-SH. A concentração de grupamentos sulfidrila (tiol) foi determinada por (A1- A2) x 1,57 (152).

4.7.4. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium ou azul de nitrotetrazólio) pelo O₂^{•-} gerado através do sistema hipoxantina /

xantina oxidase (XO), a 37°C. A reação enzimática foi composta de: PB 0,1 M, pH 7,4; 0,07 U de XO/MI; 100 µM hipoxantina; 600 µM NBT e 1 mg/mL de proteína da amostra. Os resultados expressos como U/mg proteínas (151).

4.7.5. Determinação da atividade da Glutathione peroxidase (GSH-Px)

Este ensaio é baseado na oxidação da GSH-Rd para GSH-Px, acompanhado da redução do NADPH pela GSH-Rd, o homogenato de tecido estomacal foi diluído em PB (1: 10), em 100 µL desta solução adicionou-se 50 µL H₂O₂ (0.25 mM), 20 µL de GSH-Rd (10 mM), 20 µL NADPH (4mM), 10 µL (1 U) de enzima GR em PBS, pH 7,8. A absorbância foi lida a cada min. em espectrofotômetro a 365 nm entre 1 e 10 min. Os resultados expressos em mM/min/mg de proteína (153).

4.7.6. Determinação da atividade da Glutathione redutase (GSH-Rd)

A atividade desta enzima foi determinada seguindo-se espectrofotometricamente a oxidação de NADPH a 340 nm. A reação enzimática foi constituída de: PB 1M, pH 7; 0,2 mM EDTA; 1 mM GSSG e 0,1 mM de NADPH. O consumo de NADPH foi determinado pela diminuição da absorbância a 340 nm. O coeficiente de extinção para o NADPH é 6,22 M⁻¹ cm⁻¹ (154).

4.8. Atividade cicatrizante

4.8.1. Modelo de indução de úlcera gástrica crônica pelo ácido acético

O experimento foi realizado conforme descrito por Takagi (155), com modificações em Okabe (156). Ratos machos Wistar Unib: WH (n = 7, por grupo), foram anestesiados (ketamina 50 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg) e foi realizada uma incisão abdominal. A parede anterior do estômago foi exposta e foi colocado externamente um tubo pequeno na região serosa, dentro deste tubo foi colocado ácido acético a 100% por 1 min. O abdômen foi fechado e os animais voltaram a comer normalmente. Dois dias após a cirurgia foram

iniciados os tratamentos por v.o., com o Veículo 10 mL/Kg (controle negativo), Cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) e BB 100 mg/Kg, os tratamentos persistiram por 14 dias consecutivos. Ao final do tratamento, no 15º dia, os animais foram mortos por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, examinados, fotografados e analisados conforme descrito anteriormente.

4.8.2. Western blotting

As porções glandulares dos estômagos obtidos a partir de ratos submetidos à indução de úlcera por ácido acético foram homogeneizadas em 1 mL de tampão (PB 0,1M, pH 7,4 com inibidor de protease 1%). Os homogenatos foram centrifugados ($12000 \times g$, 15 min, 4°C) e seus sobrenadantes coletados e armazenados a -80°C para posterior análise de *western blotting*. As amostras foram tratadas com Laemmli buffer (PB 0,5 M, pH 6,8; glycerol; dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; bromofenol 0,1% e β -mercaptoetanol) na proporção 1:1. Para cada amostra, 100 μ g de proteína, foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Na próxima etapa, as proteínas foram, por eletroforese, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos específicos primários: EGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) e COX-2 (Cayman Chemical, USA) na diluição de 1:500. Cada membrana foi lavada três vezes por 10 min e incubada com anticorpo de cabra, anti-imunoglobulina G (Zymed Laboratories, USA) para EGF, e anticorpo de coelho (Zymed Laboratories, USA) para COX-2, ambos na diluição de 1:5000. Como controle, os blots foram analisados pela expressão da proteína constitutiva β -actina, usando anticorpo anti- β -actina (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA). A imunodeteção foi realizada utilizando um Kit de detecção de luz por quimioluminescência (SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate, Pierce, IL, USA). Os dados

densitométricos foram realizados seguindo a normalização ao controle (proteína constitutiva) pelo programa AVSoft (149).

4.9. Avaliação dos parâmetros toxicológicos

O experimento de toxicidade é uma estimativa das propriedades tóxicas *in vivo* da substância teste na sua dose terapêutica (157). Os parâmetros toxicológicos foram feitos de acordo com o método de Souza–Brito, (158). Foi avaliada a toxicidade nos animais submetidos ao tratamento com Veículo 10 mL/Kg, Cimetidina 100 mg/Kg ou BB 100 mg/Kg sem terem a úlcera induzida. Durante os 14 dias de tratamento, foram observados diariamente progressão de peso corpóreo, alteração de pêlo, da mucosa e das fezes. Ao final do tratamento os órgãos (coração, fígado, rins e pulmões) foram removidos e pesados para detectar qualquer efeito do BB sobre seus pesos.

4.10 Análise estatística

Todos os resultados farmacológicos foram expressos em média $\pm$ erro padrão da media (EPM), depois foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste *a posteriori* de Tukey ou Dunnett, com o menor nível de significância sendo $p \leq 0,05$ (Prisma, USA).

5. Resultados

5.1. Identificação dos componentes do óleo essencial

A análise de CG-EM eletrônica demonstrou que os componentes do BB são: α -pineno 40%; seguido por p-mentha-1,4(8)-dieno 12%; e α -phellandreno 10%; além de treze outros componetes em menores concentrações (Tabela 1). Isto demonstra que o BB é composto essencialmente por substâncias da classe dos terpenos. O α -pineno, componente em maior concentração no BB, é um composto orgânico da classe dos terpenos, que geralmente é encontrado nos óleos essenciais das árvores coníferas (140).

Tabela 1 - Composição química (porcentagem) do BB pela análise de CG-EM

Pico	RT	Componentes	Composição %
1	4,283	α -thujeno	1,03
2	4,435	α-pineno	40,32
3	4,734	Campheno	1,32
4	5,311	Sabineno	0,12
5	5,376	β -pineno	4,78
6	5,448	p-menth-2-eno	0,1
7	5,765	β -myrceno	0,11
8	5,919	carano	2,36
9	6,062	α-phellandreno	10,27
10	6,208	3-careno	5,78
11	6,377	2-careno	2,31
12	6,582	p-cimeno	9,64
13	6,696	m-menta-1,8-dieno	8,88
14	7,518	gamma-terpineno	0,66
15	8,322	p-menta-1,4(8)-dieno	12,14
16	9,841	camphor	0,18

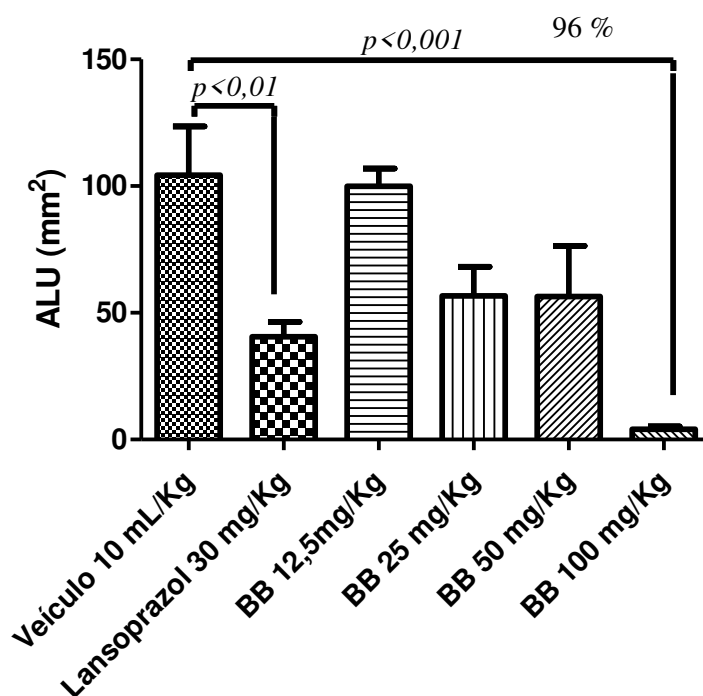
RT- Tempo de Retenção

5.2. Atividade antiulcerogênica

5.2.1. Modelo de úlcera gástrica aguda induzida pelo etanol

O BB inibiu de forma estatisticamente significativa as lesões ulcerativas induzidas por etanol apenas na dose de 100 mg/Kg, esta inibição foi de 96%, em relação ao grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg, devido a esta inibição, esta dose foi selecionada para os demais ensaios (Figura 4).

Figura 4 - Efeito do BB 12,5, 25, 50 e 100 mg/Kg nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

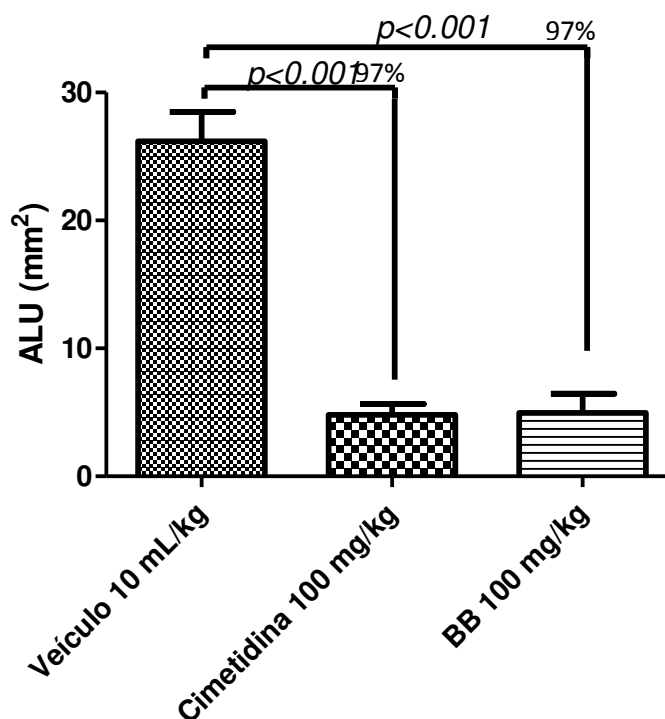


Dados expressos em média $\pm$ epm, $n = 7$. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet

5.2.2. Modelo de indução de úlcera gástrica aguda por Indometacina

Com a dose mais efetiva selecionada, verificou-se a atividade antiulcerogênica do BB no modelo de úlcera gástrica induzida por Indometacina 30 mg/Kg. A administração do BB 100 mg/Kg inibiu significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas por Indometacina 30 mg/Kg em 97%. Esta inibição foi semelhante àquela apresentada pelo grupo tratado com Cimetidina 100 mg/Kg droga padrão utilizada como controle positivo, com percentual de inibição de 97% (Figura 5).

Figura 5 - Efeito do BB 100mg/Kg nas lesões gástricas induzidas por Indometacina 30mg/Kg em ratos



Dados expressos em média $\pm$ epm, $n = 7$. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet

5.3. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica

5.3.1. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro

Com o objetivo de avaliar a participação do BB nos parâmetros bioquímicos gástricos (volume gástrico e pH), foi realizado a administração do BB 100 mg/kg pelas vias oral e intraduodenal em ratos submetidos à ligadura do piloro. Em ambas as administrações, o BB 100 mg/Kg não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do BB 100mg/Kg, administrado em diferentes vias, nos parâmetros ácido-gástricos em ratos submetidos à ligadura de piloro

Via	Tratamentos	Dose (mg/Kg)	Suco gástrico (mL)	pH (unidades)
Intraduodenal	Veículo	-	0,94 ± 0,07	1,62 ± 0,07
	Cimetidina	100	0,49 ± 0,07*	1,60 ± 0,06
	BB	100	2,20 ± 0,26***	0,61 ± 0,07***
Oral	Veículo	-	0,82 ± 0,15	2,44 ± 0,18
	Cimetidina	100	1,68 ± 0,18**	5,10 ± 0,08***
	BB	100	1,32 ± 0,11	1,96 ± 0,13

Dados expressos como média ± e.p.m., $n = 7$. ANOVA seguida de teste de Dunnet,

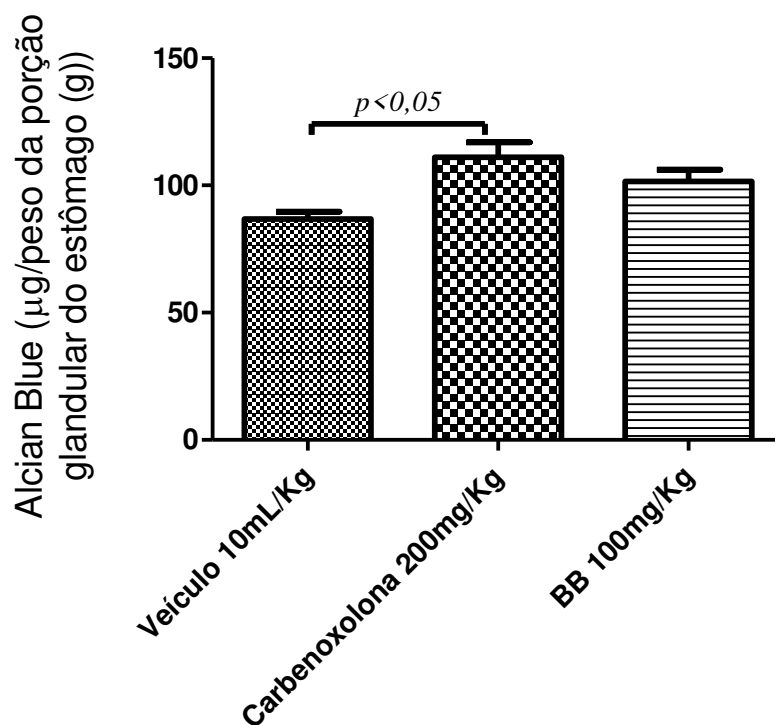
* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ comparados ao grupo controle negativo tratado com

Veículo 10 mL/Kg

5.3.2. Muco aderido à mucosa gástrica

Os animais tratados com BB 100 mg/kg não apresentaram alteração significativa na quantidade de muco aderido à mucosa gástrica, em comparação com o grupo de animais tratado com Veículo 10 mL/Kg, demonstrando que a atividade protetora do BB provavelmente não se dá por aumento da secreção de muco (Figura 6).

Figura 6 - Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica em ratos tratados com o BB 100mg/Kg.

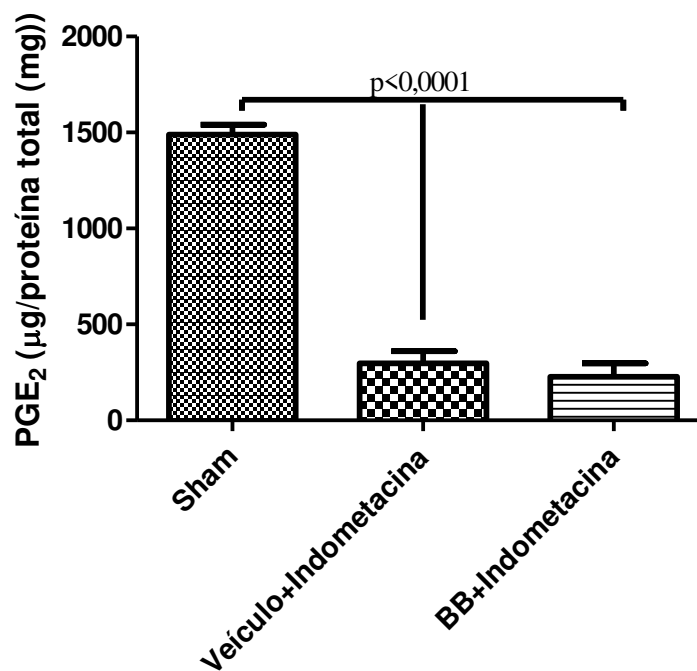


Dados expressos como média $\pm$ e.p.m, $n = 7$. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet.

5.3.3. Níveis de Prostaglandina (PGE₂)

Os resultados que mostram o efeito do BB 100 mg/kg sobre os níveis gástricos de PGE₂ estão demonstrados na Figura 7.

Figura 7 - Quantificação dos níveis de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos tratados com BB 100 mg/Kg.



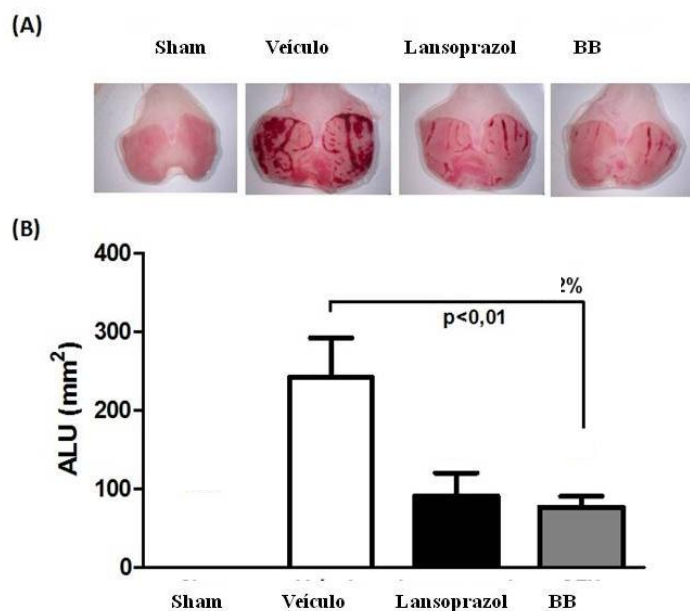
Dados expressos como média $\pm$ e.p.m, $n = 7$. ANOVA seguida por teste de Tukey

O BB 100 mg/Kg, administrado concomitantemente à Indometacina 30 mg/Kg (inibidor inespecífico da isoenzima COX), não foi capaz de manter os níveis de PGE₂. Quando comparado ao grupo Sham houve uma redução estatisticamente significativa, mostrando que BB 100 mg/Kg não foi capaz de manter a produção da PGE₂ (Figura 7).

5.4. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

A avaliação da atividade antioxidante *in vivo* do BB, foi realizada com amostras obtidas no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto. A administração oral de etanol absoluto em ratos causa lesões hemorrágicas no estômago, como se observa no grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg (Figura 8A). O efeito gastroprotetor do pré-tratamento com BB 100 mg/Kg neste modelo experimental de úlcera está apresentado na Figura 8B mostrando uma proteção de 96%.

Figura 8 - Efeito da administração oral do BB 100 mg/Kg na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.



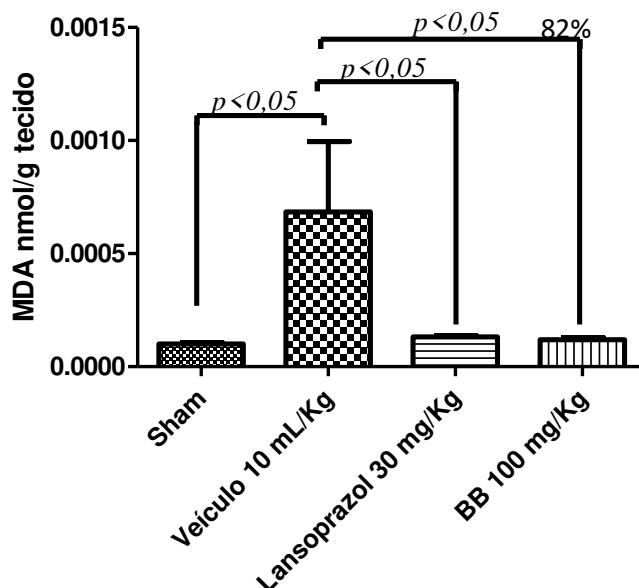
(A) Visualização macroscópica das lesões. (B) Área da lesão ulcerativa de ratos submetidos à úlcera gástrica por etanol. Dados expressos em média $\pm$ e.p.m, $n = 7$. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnet.

Considerando a formação de EROs na úlcera induzida por etanol, foram analisadas as enzimas antioxidantes SOD, GSH-Px, GSH-Rd. Também foram analisados os níveis de grupamento sulfidríla, peroxidação lipídica e mieloperoxidase.

5.4.1. Determinação da peroxidação lipídica (LPO)

O malonildialdeído (MDA) é o produto final da LPO e é usado para determinar os níveis da peroxidação lipídica. O efeito do BB sobre o índice de LPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto está demonstrado na Figura 9. Os níveis de MDA aumentaram de forma estatisticamente significativa no grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg, quando comparados com o grupo Sham. O grupo tratado com BB 100 mg/kg foi capaz de inibir em 82 %, o índice de MDA em comparação ao grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg, mantendo os níveis deste índice similares aos do grupo Sham.

Figura 9 - Índice de peroxidação lipídica na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.

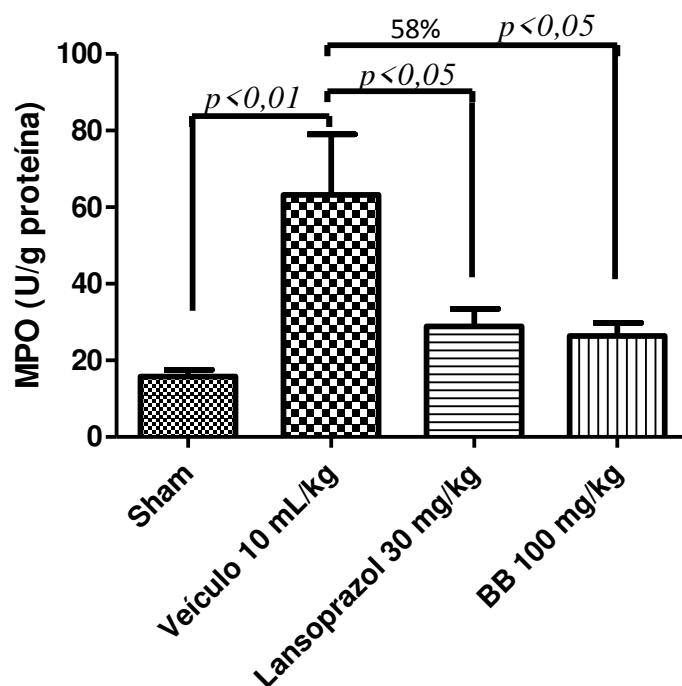


Dados expressos como média $\pm$ e.p.m, $n = 7$. ANOVA seguida de teste de Dunnet.

5.4.2. Determinação da atividade da MPO

O aumento de atividade da enzima MPO pode se indicativo de maior infiltração de neutrófilos no tecido. Os resultados obtidos para efeito do BB sobre a atividade da MPO na mucosa gástrica de animais submetidos à indução de úlcera por etanol absoluto estão apresentados na Figura 10. O grupo tratado com BB 100 mg/Kg foi capaz de inibir a atividade da MPO em 58% em relação ao grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg, mantendo níveis de atividade similares aos do grupo Sham.

Figura 10 - Atividade da enzima MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto.

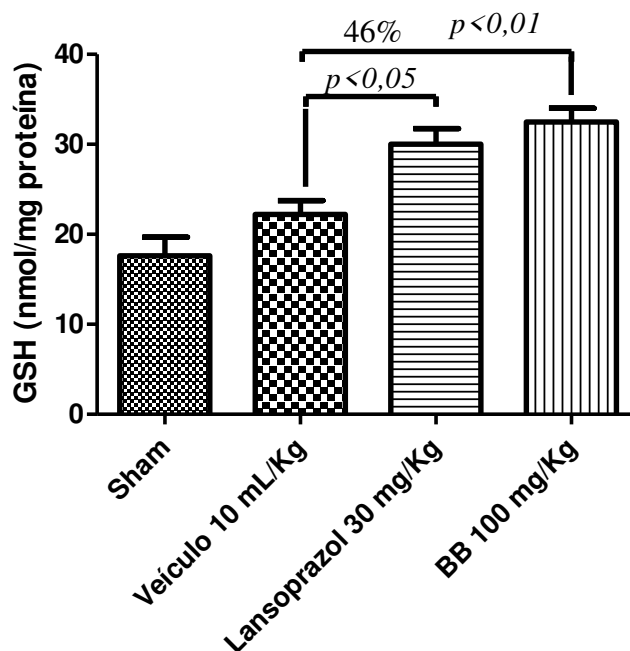


Dados expressos em média $\pm$ e.p.m, $n = 7$. ANOVA, seguida de teste de Dunnet.

5.4.3. Envolvimento do G-SH na citoproteção

A depleção de G-SH, geralmente, é observada na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto como índice de estresse oxidativo. Os níveis de G-SH encontrados na mucosa gástrica de ratos expostos a este modelo experimental encontram-se na Figura 15. Após exposição ao agente ulcerogênico, o grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg não apresentou alteração significativa nos níveis de G-SH, em relação ao grupo Sham, ao contrário do que se encontra na literatura. O pré-tratamento com BB 100 mg/Kg, apresentou um aumento significativo nos níveis de G-SH em relação ao grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg, sendo este aumento de 46%.

Figura 11 - Níveis de G-SH na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto.



Dados expressos em média $\pm$ e.p.m, $n = 7$. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.4.4. Determinação da atividade da SOD, GSH-Px e GSH-Rd

Observou-se um aumento nos níveis de atividade da enzima SOD no estômago dos animais do grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg em relação ao grupo Sham (Tabela 3). A enzima SOD pode ser considerada a primeira linha de defesa frente à geração de EROs. O aumento nos níveis da atividade desta enzima pode ser evidência de estresse oxidativo. No grupo tratado com BB 100 mg/Kg, houve uma redução nos níveis da SOD (43%), sendo estes níveis similares aos níveis do grupo Sham (Tabela 3), indicando menor geração de ERO no estômago dos animais que receberam este tratamento. Os resultados obtidos no grupo tratado com BB 100 mg/Kg são semelhantes aos obtidos no grupo tratado com Lansoprazol 100 mg/Kg controle positivo.

Observou-se também, um aumento nos níveis de atividade da enzima GSH-Px no estômago dos animais do grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg em relação ao grupo Sham (Tabela 3). O aumento nos níveis de atividade desta enzima pode ser indicativo de estresse oxidativo. O grupo pré-tratado com BB 100 mg/Kg apresentou diminuição de 42% da atividade de GSH-Px em relação ao grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg. Os níveis da atividade desta enzima no grupo pré-tratado com BB 100 mg/Kg apresentaram-se semelhante ao grupo Sham (Tabela 3) e apresentaram-se semelhantes aos resultados obtidos no grupo tratado com Lansoprazol 100 mg/Kg controle positivo, indicando menor estresse oxidativo no estômago dos animais tratados com este óleo.

Com relação à GSH-Rd, o tratamento com BB 100 mg/Kg produziu um aumento significativo nos níveis da atividade desta enzima quando comparados com o grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg (Tabela 3). Os níveis atingidos no tratamento com BB 100 mg/Kg são similares aos níveis do grupo controle positivo lansoprazol 100 mg/Kg (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade da enzima GSH-Px, SOD e GSH-Rd na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.

Tratamentos	SOD (U/mg proteína)	GSH-Px (nmol/min/mg de proteína)	GSH-Rd (mmol/min/mg de proteína)
Sham	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,3	0,9 ± 0,1
Veículo	3,4 ± 0,5+	3,1 ± 0,3+	0,9 ± 0,1
Lansoprazol	2,2 ± 0,1*	1,9 ± 0,2*	1,5 ± 0,1*
BB	2,0 ± 0,1* 43%	1,8 ± 0,2* 42%	1,6 ± 0,1*81%

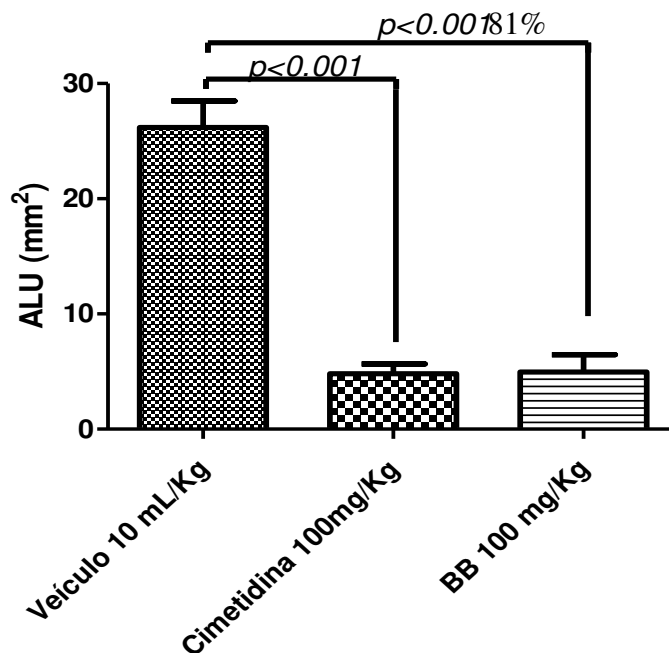
Dados expressos em média ± e.p.m, $n = 7$. ANOVA seguida pelo de Tukey (*) $p \leq 0,05$ em relação ao grupo tratado com Veículo e (+) $p \leq 0,05$ em relação ao Sham.

5.5. Atividade cicatrizante

5.5.1. Modelo de indução de úlcera gástrica crônica pelo ácido acético

O tratamento oral com BB 100 mg/kg durante 14 dias consecutivos promoveu uma aceleração na cicatrização da úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos (Figura 12). A porcentagem de cicatrização apresentada pelo grupo tratado com BB 100 mg/Kg (81%) foi semelhante aquela apresentada pelo grupo tratado com Cimetidina 100 mg/Kg (82%), droga padrão utilizada como controle positivo.

Figura 12 - Efeito da administração do BB 100mg/Kg durante 14 dias consecutivos, na cura de úlceras induzidas por ácido acético 100%.



Dados expressos em média $\pm$ e.p.m., $n = 7$. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

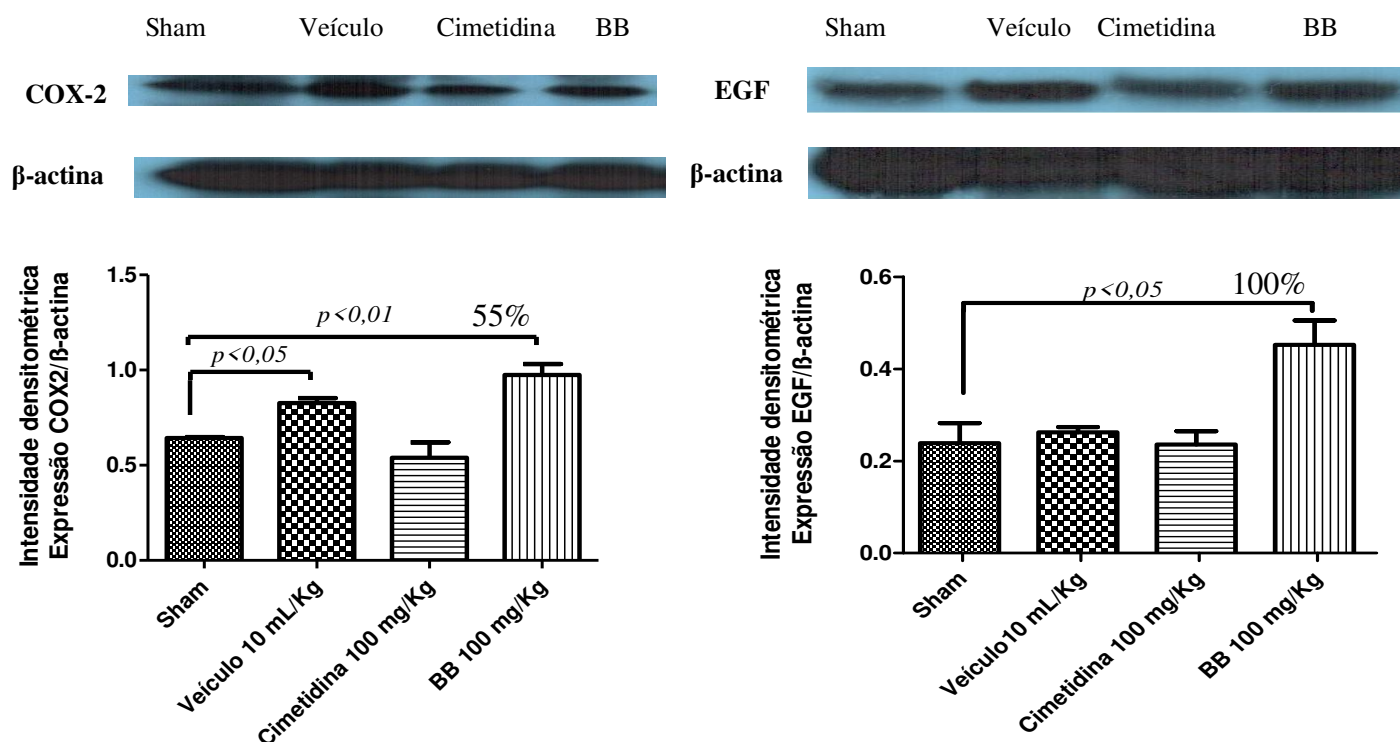
5.5.2. Western blotting

É sabido que a COX-2 e o EGF participam do processo de cicatrização da úlcera gástrica. Diante deste fato, verificamos a expressão de ambos pela técnica de *western blotting* utilizando como controle interno a proteína β -actina.

As figuras 13A e 13B representam as intensidades densiométricas obtidas nas revelações das membranas com os anticorpos para COX-2 e EGF, respectivamente. As análises mostraram que o tratamento oral com BB 100mg/Kg durante 14 dias consecutivos, após lesões gástricas induzidas por ácido acético absoluto, promoveu um aumento na expressão de ambas na mucosa gástrica. O tratamento com BB 100 mg/Kg aumentou a

expressão da enzima COX-2 em 55% e a expressão de EGF em 100%, ambos comparados ao grupo Sham.

Figura 13 - Representação da análise de *Western blot* na expressão de COX-2 (A) e de EGF (B) durante 14 dias consecutivos de tratamento com BB 100 mg/Kg, na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera gástrica induzida por ácido acético a 100%.



A análise densitométrica foi realizada seguindo a normalização ao controle (β -actina).

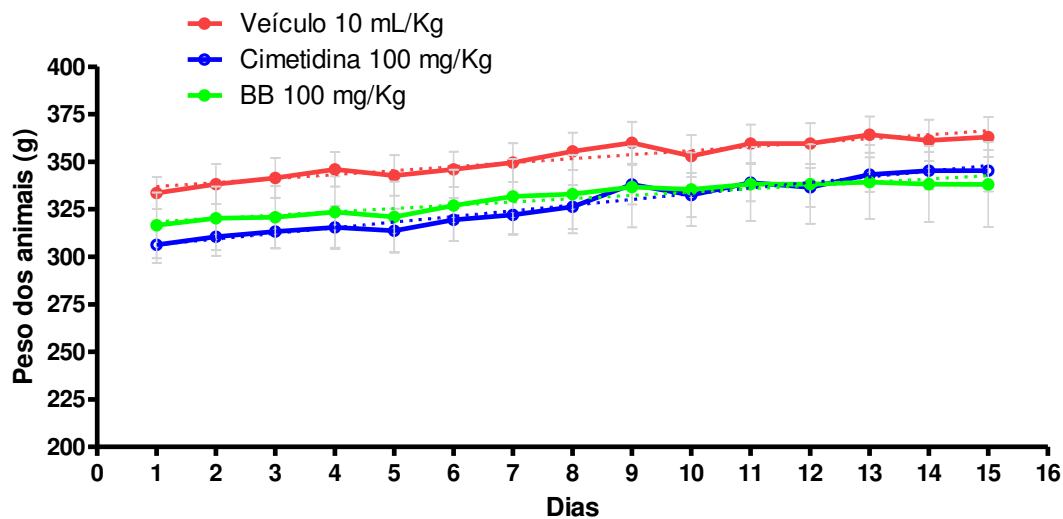
Dados expressos como média $\pm$ e.p.m., $n = 7$. ANOVA seguida de teste de Dunnet.

5.6. Avaliação dos parâmetros toxicológicos

As Figuras 14 e 15 mostram, respectivamente, a evolução ponderal e o peso de órgãos importantes para a atividade metabólica de animais submetidos à administração oral sub-aguda durante 14 dias consecutivos com Veículo 10 mL/Kg, Cimetidina 100 mg/kg e

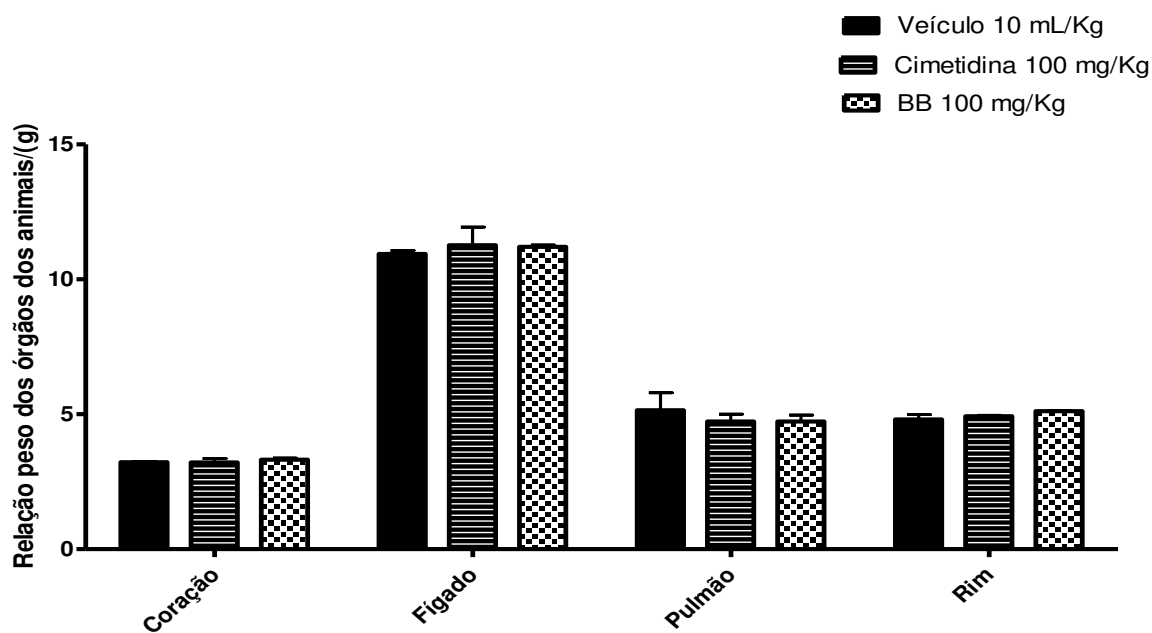
BB 100 mg/kg. Durante os 14 dias de estudo, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na progressão dos pesos corpóreos nem nos pesos dos órgãos para todos os grupos (Veículo 10mL/Kg, Cimetidina 100 mg/Kg e BB 100 mg/Kg. Nenhuma anormalidade macroscópica foi detectada nos órgãos avaliados, na pelagem, nem nas fezes.

Figura 14- Efeito do BB 100 mg/Kg administrado durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais.



Dados expressos em média $\pm$ epm, $n = 7$. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett, $P > 0.05$ comparados ao grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg.

Figura 15 - Peso dos órgãos dos animais tratados v.o. com Veículo 10 mL/Kg, Cimetidina 100 mg/Kg ou BB 100 mg/Kg durante 14 dias consecutivos.



Dados expressos em média $\pm$ epm, $n = 7$. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, $P > 0.05$ comparados ao grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg.

6. Discussão

Plantas aromáticas são utilizadas desde a antiguidade devido às suas propriedades conservantes e medicinais, as quais são parcialmente atribuídas aos óleos essenciais. Estudos recentes indicam que componentes de óleos essenciais, especialmente monoterpenos, apresentam diversos efeitos farmacológicos. Óleos essenciais são compostos naturais voláteis, complexos, caracterizados por um forte odor e são utilizados para fins medicinais, cosméticos, agrícolas e alimentícios (140; 159).

Considerando o conhecimento popular do uso da espécie *Protium heptaphyllum* March para tratar distúrbios gastrointestinais, estudamos o óleo essencial do *Protium heptaphyllum* March (BB), inicialmente identificando os componentes deste óleo, através da CG-EM eletrônica. Foram identificados majoritariamente α -pineno 40%, p-mentha-1.4(8)-dieno 12% e α -phellandreno 10%. Geralmente, os compostos majoritários são responsáveis pelos efeitos biológicos do óleo essencial do qual foram isolados, sendo que a amplitude de seus efeitos depende da concentração destes compostos, no entanto é possível que a atividade dos compostos majoritários seja modulada pelos minoritários, havendo sinergismo entre eles, neste sentido, para efeitos biológicos, estudar todo o óleo essencial em vez de alguns de seus componentes fornece informações mais significativas (132; 160).

O α -pineno, composto majoritário do BB, está relacionado com uma série de propriedades farmacológicas como anti-inflamatória, digestiva e antioxidante. Os efeitos do α -pineno que é um monoterpeno, variam conforme a interação com mono ou sesquiterpenos presentes (160; 161; 135; 140).

O p-mentha-1.4(8)-dieno, é um monoterpeno monocíclico com um anel de ciclohexano e fragrância semelhante à do limão. Foi demonstrado que este componente apresenta efeito sedativo (162).

O α -phellandreno, pertence ao grupo dos terpenos monocíclicos, classe dos monoterpenos, são isolados de fontes vegetais variadas, principalmente a partir de plantas da espécie *Eucalyptus radiata*, seu nome científico é derivado da espécie *Eucalyptus phellandra*. O crescente interesse por este componente dá-se principalmente por seu odor agradável (163).

Muitos aspectos podem estar envolvidos na patogênese da úlcera gástrica sendo que, a integridade funcional da mucosa gástrica depende do balanço entre fatores agressores e mecanismos protetores. Assim, o sucesso do tratamento farmacológico contra úlcera gástrica depende não somente do controle dos fatores patogênicos, mas também do aumento dos fatores de proteção da mucosa gástrica (164; 140; 69).

A atividade protetora gástrica do BB foi inicialmente caracterizada nos modelos de indução de lesões por agente necrosante (etanol) e por DAINES (Indometacina). Estes modelos clássicos de lesão gástrica aguda, que utilizam etanol e Indometacina para a indução de úlceras, fornecem importantes indicativos da ação destes produtos sobre o trato gastrointestinal, já que o uso crônico de álcool e DAINES estão envolvidos na etiologia das patologias gástricas no homem (165; 166).

A formação das lesões gástricas induzidas por etanol tem origem multifatorial que inclui dano ao DNA, decréscimo nos níveis de glutathione total e peroxidação lipídica nas células da mucosa gástrica. Estes eventos levam a necrose, hemorragia subepitelial, edema, esfoliação celular e aumento da permeabilidade da mucosa (17; 167; 168). Além disto, as lesões induzidas por etanol estão diretamente relacionadas à produção de espécie reativas de oxigênio (EROs) que produzem um desequilíbrio entre o processo oxidante e atividade antioxidante celular que leva à modificação oxidativa na membrana celular, formando um ambiente favorável para o estresse oxidativo (61; 169).

O grupo de animais tratados com BB 100 mg/Kg inibiu em 96% a formação de lesões gástricas causadas pelo etanol, quando comparado com o grupo de animais tratado com Veículo 10 mL/Kg. Esta proteção foi 36% maior que a do grupo tratado com Lansoprazol 30mg/Kg, droga padrão utilizada como controle positivo. Considerando a participação das EROs na formação de lesões gástricas induzidas por etanol é possível que o BB 100 mg/Kg iniba a formação destas lesões por evitar a formação do estresse oxidativo. Nossos resultados estão de acordo com aqueles obtidos com a resina da *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) que, quando administrada por via oral, evitou danos na mucosa gástrica induzidos por etanol (125). Porém, no nosso estudo trabalhamos com o óleo comercial essencial do *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae), a dose eficaz utilizada, na concentração de 100mg/Kg foi menor do que a apresentada no trabalho citado, que era de 200 ou 400 mg/Kg.

DAINEs, como a Indometacina, são amplamente usadas no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, pois reduzem a dor e a inflamação, através da inibição da enzima cicloxigenase (COX). No entanto, seu uso é limitado pela sua propensão em causar danos significativos na mucosa gástrica (169). Estudos recentes demonstraram que EROs têm sido descritas, como um dos prováveis fatores patogênicos envolvidos nas lesões da mucosa induzidas por DAINEs (169; 170; 171; 172).

No modelo experimental de úlcera gástrica induzida por DAINEs, o grupo de animais tratado com BB 100 mg/kg apresentou atividade gastroprotetora quando comparado com o grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg. Esta proteção foi igual à proteção apresentada no grupo de animais tratado com Cimetidina 100 mg/Kg, droga padrão utilizada como controle positivo. Considerando que a atividade ulcerogênica das DAINEs pode ser atenuada sem o envolvimento de PGE₂ e que agentes antioxidantes podem

proteger a mucosa gástrica contra lesões causadas por DAINes por inibir o aumento de EROs este resultado reforça a possível ação antioxidante deste óleo essencial.

Está amplamente demonstrado que a úlcera gástrica induzida por etanol aparece devido à ação necrotizante deste na mucosa gástrica com menor participação da secreção ácida, não sendo, portanto, inibida por agentes antissecretórios como a Cimetidina, e sim por aqueles fatores que aumentam os mecanismos de defesa da mucosa gástrica (173; 168). Considerando que o BB 100 mg/Kg não foi capaz de aumentar os fatores citoprotetores da mucosa (Muco e PGE₂) e considerando a participação das EROs na patofisiologia da úlcera gástrica, verificamos os mecanismos antioxidantes em sua atividade gastroprotetora. Para tanto, a atividade antioxidante do BB 100 mg/Kg foi testada *in vivo*, através do modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.

EROs são continuamente produzidas durante os eventos fisiológicos normais, sendo removidas pelo mecanismo de defesa antioxidante. Na literatura, são diversos os trabalhos que mostram aumento da peroxidação lipídica na úlcera gástrica (174). É importante lembrar que a peroxidação lipídica resulta na produção e liberação de substâncias que recrutam e ativam leucócitos polimorfonucleares (175; 171). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o BB 100 mg/Kg promoveu significativa redução da peroxidação lipídica em relação à redução da ALU, sugerindo um controle da fonte biológica de EROs, agindo portanto como um antioxidante.

Foi avaliada a atividade do BB 100 mg/Kg em relação a enzima mieloperoxidase (MPO). Esta é uma enzima importante para a defesa imunológica não específica, é secretada por neutrófilos nos locais de inflamação participando da proteção do organismo contra patógenos invasores, devido à sua capacidade única de gerar ácido hipoclorídrico. Este ácido é um importante agente antimicrobiano necessário para combater as infecções

nos locais de inflamação. No entanto, quando secretado em excesso, pode causar modificação oxidativa de proteínas, lipídios e outras moléculas biologicamente importantes. Distúrbios cardiovasculares, doença degenerativas do sistema nervoso e artrite reumatóide, são comumente associados ao acúmulo de MPO nos tecidos afetados (55; 176). Trabalhos também apresentam aumento na atividade da MPO associado à úlcera gástrica (177; 114). Após indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, observou-se aumento na atividade de MPO no estômago de ratos que receberam apenas o Veículo. Nos animais tratados com o BB 100 mg/Kg, este aumento foi evitado, o que indica possível inibição de infiltração de neutrófilos e, conseqüentemente, menor liberação de radicais livres e substâncias lesivas no tecido, contribuindo para a gastroproteção deste tratamento. Vale ressaltar, que este resultado é condizente com aquele obtido no índice de peroxidação lipídica, mostrando que se o grupo de animais tratado com BB 100 mg/Kg apresentou redução nos níveis de peroxidação lipídica, provavelmente inibe a infiltração de neutrófilos nos tecidos.

Além do aumento da peroxidação lipídica, diversos trabalhos evidenciam diminuição na quantidade dos grupamentos sulfidril não proteicos (G-SH) na mucosa gástrica lesionada pelo etanol (178; 179; 180; 181; 182). Ao contrário do que foi descrito, após exposição ao agente ulcerogênico, o grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg não apresentou alteração significativa nos níveis dos G-SH, em relação ao grupo Sham. A literatura relata que os G-SH são agentes-chave na proteção da mucosa contra danos gástricos induzidos por etanol, uma vez que estes compostos fazem uma reciclagem antioxidante (98). O grupo pré-tratado com BB 100 mg/Kg, apresentou um aumento significativo nos níveis de G-SH em relação ao grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg, e não apresentou diferença estatisticamente significativa com o grupo que recebeu a droga padrão

Lansoprazol 30 mg/Kg. Os G-SH têm um papel proeminente na reparação do tecido quando as EROs estão envolvidas, prevenindo o dano tecidual e mantendo EROs em níveis fisiológicos (183). Estes resultados indicaram que os G-SH, estão envolvidos com a atividade antioxidante do BB.

O organismo possui defesas antioxidantes, que abrangem um complexo sistema de enzimas e moléculas capazes de “capturar” os radicais livres (184). A primeira enzima antioxidante da mucosa gástrica é a superóxido desmutase (SOD), que cataliza a dismutação do $O_2^{\cdot-}$, em H_2O_2 que é menos nocivo. O segundo passo do metabolismo do H_2O_2 depende da atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px), que converte H_2O_2 em água, a partir da oxidação da glutathione reduzida (GSH) a sua forma dissulfídica, glutathione oxidada (GSSG), a qual pode novamente ser convertida a glutathione (GSH) pela ação da GSH-Rd utilizando como co-fator NADPH (63; 65).

A enzima SOD é considerada primeira linha de defesa frente à geração de EROs. O aumento na atividade desta enzima pode ser evidência de estresse oxidativo e maior liberação de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (185). A SOD forma um grupo de enzimas conjugadas com antioxidante vital na saúde humana conferida pela ação sequestradora do $O_2^{\cdot-}$ (186). Além desta ação sequestradora, esta enzima também é componente essencial de vias de sinalização que regulam a fisiologia celular (187). Existem três formas conhecidas de SOD em células de mamíferos, a SOD contendo cobre e zinco (CuZnSOD), encontrada principalmente no citoplasma e núcleo, a SOD contendo manganês (MnSOD), encontrada nas mitocôndrias e a SOD extracelular (ECSOD), encontrada primariamente nos compartimentos extracelulares (187). Estudos demonstram a participação da SOD na região no epitélio gástrico em resposta à lesão ulcerativa. Foi observado aumento na expressão de mRNA da enzima SOD associado ao aumento de estresse oxidativo e liberação de

mediadores inflamatórios em modelo de indução de úlcera gástrica por etanol, DAINES e ácido acético (184; 188; 189; 169; 114). Assim, a maior atividade e expressão da enzima SOD na mucosa gástrica podem indicar maior exposição do tecido à geração de EROs. Além disto, Repetto e colaboradores (185) atribuem o aumento na atividade da SOD ao estresse oxidativo e maior liberação do $O_2^{\bullet-}$.

Tem sido demonstrado também que substâncias com propriedades antioxidantes podem proteger a mucosa gástrica, atenuando lesões no estômago de ratos causadas pela aplicação de agentes nocivos como o etanol e que este efeito protetor é acompanhado pelo aumento da atividade da SOD (190).

Após indução de úlcera por etanol absoluto, a enzima SOD apresentou-se com atividade aumentada no estômago do grupo de animais tratados Veículo 10 mL/Kg em relação ao grupo Sham. No grupo de animais pré-tratado com o BB 100 mg/kg, a atividade da SOD foi menor em comparação ao grupo de animais tratado com Veículo 10 mL/Kg, evidenciando menores danos à mucosa gástrica dos animais e, conseqüentemente, menor exposição ao estresse oxidativo. Este resultado sugere uma capacidade do BB 100 mg/Kg de detoxificação das EROs, agindo portanto como antioxidante.

GSH-Px, outra enzima antioxidante, desempenha papel fundamental na eliminação do H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos nas células da mucosa gástrica (191). Após indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, houve aumento na atividade da GSH-Px no grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg, o que não foi observado no grupo tratado com BB 100 mg/Kg. Ao contrário disto, diversos trabalhos relatam diminuição na atividade da enzima GSH-Px após exposição do tecido ao etanol (192; 193; 177). Esta enzima pode ser inativada através de modificações nos resíduos de selenocisteína em seu sítio ativo, por 4-hidroxinonenal (HNE), um produto da peroxidação lipídica (194; 193). Além disto, a

atividade da GSH-Px pode ser reduzida devido à depleção da glutathione pelo etanol (195; 196). No entanto, há divergências com relação à atividade desta enzima. Repetto e colaboradores (185) analisaram a atividade da GSH-Px em modelo de úlcera induzida por etanol e não observaram diferenças entre os grupos experimentais. Em outros tipos de lesões, como colite ulcerativa, foi relatado aumento na atividade da GSH-Px em modelos experimentais, provavelmente como efeito do acúmulo de peróxidos (197; 198). Sendo assim, é provável que a elevada atividade da GSH-Px nos animais tratados apenas com Veículo 10 mL/Kg esteja relacionada com o acúmulo de peróxidos, evidenciando que o mecanismo antioxidante do BB está provavelmente relacionado com sequestro de peróxidos, confirmando os resultados da inibição do índice de peroxidação lipídica. Uma vez que o grupo de animais pré-tratado com o BB 100 mg/Kg apresentou atividade reduzida da SOD em comparação com o grupo de animais tratado com Veículo 10 mL/Kg, não houve acúmulo de peróxido de hidrogênio reduzindo, consequentemente, a atividade da GSH-Px nos animais tratados com o óleo essencial.

Sistemas enzimáticos, que eliminam EROs e impedem sua ação destrutiva, protegem as células catalisando glutathione através do ciclo redox (184). O ciclo “redox” da glutathione desempenha importante papel para garantir a integridade da mucosa em exposição ao etanol, pois a glutathione endógena, em sua forma reduzida, GSH, tem importância na diminuição do estresse oxidativo, por eliminar radicais livres, reduzir os peróxidos e se complexar com compostos eletrofílicos de maneira a proteger estruturas celulares protéicas, DNA e lipídeos, além de proteger a célula de outros produtos tóxicos, a GSH-Rd é responsável por converter GSSG em GSH utilizando como co-fator NADPH (199).

Antioxidantes intracelulares, tais como GSH-Rd são importantes para proteção celular em tecidos gástricos, G-SH e GSH-Rd têm um papel proeminente no tecido de reparação quando EROs estão envolvidos; foi relatado que em humanos uma redução na GSH-Rd gástrica pode ocorrer após o consumo de etanol gástrico (183).

Na determinação da atividade da GSH-Rd, não foram observadas diferenças significativas estatisticamente entre os grupos Sham e o grupo tratado com Veículo 10 mL/Kg, diferente do observado por alguns autores, cujos trabalhos demonstram diminuição na atividade da GSH-Rd em lesão ulcerativa causada por etanol (200; 196; 201). Porém, no grupo de animais tratado com BB 100 mg/kg, a GSH-Rd apresentou um aumento significativo de atividade quando comparado com o grupo de animais tratado com Veículo 10 mL/Kg. Os níveis atingidos no tratamento com BB 100 mg/kg são similares aos níveis do grupo de animais controle positivo tratados com Lansoprazol 30 mg/kg. Este resultado mostra que G-SH e GSH-Rd fazem parte do mecanismo antioxidante do BB.

Assim, o mecanismo antioxidante do BB está relacionado à diminuição do estresse oxidativo pela inibição da peroxidação lipídica, da atividade da MPO e aumento dos níveis dos G-SH e da GSH-Rd, os quais são importantes na proteção da mucosa quando EROs estão envolvidas. Os resultados obtidos com o grupo de animais tratados com BB 100 mg/Kg foram melhores ou iguais aos resultados obtidos no grupo tratado com Lansoprazol 30mg/Kg, droga padrão utilizada como controle positivo.

Até recentemente, estudos sobre gênese de úlcera péptica focavam em anormalidades da secreção ácida e da pepsina, sendo que a supressão ácida, através de antagonista de receptor de H_2 e inibidor de bomba protônica, foi a principal estratégia de tratamento durante três décadas. Atualmente, está aumentando o interesse sobre os mecanismos de cicatrização da úlcera e sobre a possibilidade de que a rapidez e a qualidade

do processo de cicatrização possam ser farmacologicamente moduladas. Para tanto, foi desenvolvido um modelo de úlcera induzida por ácido acético a fim de avaliar o processo de cicatrização das úlceras pépticas. Este modelo se assemelha muito à úlcera em humanos, tanto no aspecto patológico quanto nos mecanismos de cicatrização, considerando que são difíceis de tratar e requerem longo tempo para cicatrização (156; 71; 202; 140).

O ácido acético induz a úlcera gástrica de natureza perfurativa e de difícil cicatrização (183). O grupo tratado com BB 100 mg/kg demonstrou ser capaz de acelerar o processo de cicatrização de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos. Este resultado foi semelhante ao resultado obtido com o grupo tratado com Cimetidina 100 mg/Kg droga padrão utilizada como controle positivo.

A cicatrização da úlcera é um processo de reparo geneticamente programado que inclui inflamação, proliferação celular, re-epitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese e remodelação tecidual com interação entre células e a matriz extracelular. A capacidade de acelerar este processo depende de muitos fatores, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento epitelial vascular (vEGF) e COX-2; essa dependência é espacial e temporalmente sincronizada (38; 203; 183).

A COX-2 desempenha importante função na cicatrização da úlcera gástrica, sua expressão controla mecanismos de proteção da mucosa dentre eles re-epitelização e angiogênese. Fármacos como Lansoprazol promovem *up-regulation* de EGF e COX-2 em tratamentos crônicos, drogas com esta propriedade apresentam sucesso maior na cicatrização de úlceras gástricas (204; 205; 206; 207; 114).

Tsuji e colaboradores (208) apontaram a isoenzima cicloxigenase como fator fundamental para a cicatrização de úlceras gástricas, os autores propuseram que o *up-*

regulation de COX-2 produz aumento dos níveis séricos de gastrina e seria isto que tornaria a proteção da mucosa mais eficiente, já que este evento desencadeia elevação de outros fatores, como EGF, o qual também é responsável pelo *up-regulation* de COX-2.

Tem sido demonstrado que a COX-2 induzida na mucosa gástrica ulcerada, está envolvida na defesa e mecanismos de reparação desta mucosa e que a sua inibição por um inibidor seletivo da COX-2 atrasa o processo de cura da úlcera, também foi demonstrado que, no estômago humano a COX-2 é exclusivamente expressa em células mesenquimais gástrica, tais como fibroblastos e células inflamatórias do leito e das margens da úlcera, sugerindo que a COX-2 expressada nas células mesenquimais na margem da úlcera desempenhe um papel fundamental no processo de reparação da úlcera (183). Também foi demonstrado que o processo de cicatrização não é alterado quando apenas COX-1 é suprimida. Contudo, outro fator importante apontado é que a úlcera não se desenvolve espontaneamente em animais COX-1 ou COX-2 suprimidos, para que isto ocorra, é necessário que ambas isoformas sejam suprimidas (206).

Fatores de crescimento e seus receptores desempenham importante função na proliferação e migração celular, reparo de tecido lesionado e cicatrização de úlcera. O principal receptor de fator de crescimento expresso nas células progenitoras gástricas é o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF-R), o qual regula a proliferação celular (20). Considerando que o EGF é eficaz em proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por ácido acético, é razoável supor que este fator tenha a capacidade de limitar as lesões da mucosa causadas por agentes ulcerogênicos, provavelmente ajudando na restauração da mucosa. Diversos autores associam o processo antiulcerogênico com cicatrização da úlcera crônica e participação do EGF (60; 183).

Considerando a importância de COX-2 e EGF no processo de cicatrização, a expressão destas proteínas foi analisada por *western blotting* em estômagos de ratos submetidos à indução de úlcera por ácido acético. Pôde-se observar aumento na expressão de ambos no grupo de animais tratados com o BB 100 mg/kg, aumentando em 55% e em 100% a expressão de COX-2 e EGF respectivamente, comparados ao grupo Sham. Portanto, o aumento nestas expressões, para restauração da mucosa gástrica, em animais tratados com BB 100 mg/Kg, é uma evidência da capacidade cicatrizante deste óleo essencial, sendo estes dados condizentes com a literatura.

7. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pôde-se concluir que a atividade antiulcerogênica promovida pelo óleo essencial do *Protium heptaphyllum* March (BB) não se deve à produção de fatores citoprotetores como Muco e PGE₂. Esta atividade gastroprotetora se deve à atividade antioxidante modulando enzimas antioxidantes, LPO, MPO e G-SH. Foi demonstrado que o BB possui atividade cicatrizante modulada pelo aumento na expressão de COX-2 e EGF na mucosa gástrica. Portanto, este estudo mostra através de quais mecanismos ocorre a gastroproteção observada no BB, demonstrando importante capacidade de proteger a mucosa gástrica de animais contra diferentes agentes agressores, pelos mecanismos cicatrizante e antioxidante, sem apresentar toxicidade nos parâmetros avaliados.

8. Perspectivas

Os resultados obtidos com o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* March são promissores devido à significativa proteção contra úlcera gástrica induzida por diferentes agentes e sugerem aplicação terapêutica; no entanto, estudos adicionais acerca deste óleo essencial ainda são necessários. Assim, são perspectivas do trabalho com o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* March:

- Estudos adicionais de toxicidade;
- Avaliar o potencial antiulcerogênico dos compostos majoritários do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* March: α -pineno; p-mentha-1.4(8)-diene e; α -phellandrene além de seus possíveis mecanismos de ação ;
- Desenvolver formas farmacêuticas contendo o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* March e realizar estudos de farmacocinética e farmacodinâmica.

9. Referências bibliográficas

1. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7): 1027-1031.
2. Maciel MAM, Pinto AC, e Veiga VFJr. Plantas Medicinais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. *Quím. Nova*. 2002; 25(3):429-438.
3. Silva MS, Antonioli AR, Batista JS, Mota CN. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. *Acta bot. bras*. 2006; 20(4): 815-829.
4. Souza-Brito ARM. How to study the pharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. *Cienc Cult*. 1996; 49:402-408.
5. Souza Brito ARM, Nunes DS. Ehnopharmacology and sustainable development of new plan-derived drugs. *Cienc Cult*. 1997; 49:402-408.
6. Fonte NN. A Complexidade das Plantas Medicinais: Enfoque Farmacêutico. In: Correia JC, Graça LR, Sceffer MC. *Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas*. Curitiba: Emater; 2004; 24 - 45.
7. Santos AA. Why does your stomach not digest itself ?. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica*. 2007; 1(3): 1-8.
8. Papini-Berto SJ, Burini RC. Causes of malnutrition in post-gastrectomy patient. *Arq Gastroenterol*. 2001; 38(4):272-5.
9. Valezi AC. Bases Anatômicas. In: Garrido JAB (Org). *Cirurgia da Obesidade*. São Paulo: Atheneu; 2002.

10. Schubert ML, Peura DA. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. *Gastroenterology*. 2008; 134(7):1842-60. Review.
11. Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol*. 2003; 65:103-31. Review.
12. Pohle T, Domschke W. Gastric function measurements in drug development. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2003; 56(2): 156-164.
13. Konturek PC, Konturek SJ, Ochmański W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. *Eur J Pharmacol*. 2004; 19:15-27.
14. Masaoka T, Suzuki H, Hibi T. Gastric Epithelial Cell Modality and Proton Pump Inhibitor. *J. Clin. Biochem. Nur*. 2008; 42:191-196.
15. Dong MH, Kaunitz JD. Gastroduodenal Mucosal Defense. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006; 22:599–606.
16. Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol. Pharm. Bull*. 2001; 24(1):1-9.
17. Repetto MG, Llesuy SL. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medice for gastric ulcers. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2002; 35: 523-534.
18. Bi LC, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense: an intregated protective response. *Curr Opin Gastroenterol*. 2003; 19:526-532.
19. Banić M, Malfertheiner P, Babić Z, Ostojić R, Kujundzic M, Fatović-Ferenčić S, Plesko S, Petričušić L. Historical impact to drive research in peptic ulcer disease. *Dig Dis*. 2011; 29(5):444-53.

20. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology*. 2008; 135: 41-60.
21. Cabeza J, Motilva V, Martín MJ, Alarcon de la Lastra C. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sciences*. 2001; 68: 1405-15.
22. Gindzienski A, Zwierz K, Sarosiek J. The role of mucus and its components in protection and repair within the alimentary tract mucosa: Polish experience. *J Physiol Pharmacol*. 2003; 54(3): 127-44.
23. Yan XM, Joo MJ, Lim JC, Whang WK, Sim SS, Im C, Kim HR, Lee SY, Kim IK, Sohn UD. The Effect of Quercetin-3-O- β -D-Glucuronopyranoside on Indomethacin-induced Gastric Damage in Rats via Induction of Mucus Secretion and Down-regulation of ICAM-1 Expression. *Arch Pharm Res*. 2011; 34(9): 1527-34.
24. Dey I, Lejeune M, Chadee K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol*. 2006; 149:611-623.
25. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99: 13926-13931.
26. Gudis K, Sakamoto C. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. *Digestive Diseases and Sciences*. 2005; 50:16-23.
27. Hawkey CJ, Rampton DS. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment?. *Gastroenterology*. 1985; 89:1162-1188.

28. Ding M, Kinoshita Y, Kishi K, Nakata H, Hassan S, Kawanami C, *et al.* Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins*. 1997; 53:199–216.
29. Hawkey CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology*. 2000; 119: 521-535.
30. Brzozowski T, Tarnawski A, Hollander D, Sekhon S, Krause WJ, Gergely H.
Comparison of prostaglandin and cimetidine in protection of isolated gastric glands against indomethacin injury. *J Physiol Pharmacol*. 2005; 56(5):75-88.
31. Vonkeman HE, Van de Laar MA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2010; 39: 294-312.
32. Kawano S, Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 15: D1-6.
33. Abdel-Salam OM, Czimmer J, Debrececi A, Szolcsanyi J, & Mozsik G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J. Physiol Paris*. 2001; 95: 105-127.
34. Brzozowski T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – Polish achievements. *J Physiol Pharmacol*. 2003; 54(3): 99-126.
35. Paimela H, Goddard PJ, Silen W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Dig Dis Sci*. 1995; 40:2495-2496.
36. Milani S, Calabro A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc Res Tech*. 2001; 53(5):360-371.
37. Wallace JL, Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.). 2001; 226:1003-1015.

38. Tarnawski AS. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci.* 2005; 50(1):24-33.
39. Tarnawski AS, Szabo IL, Husain SS, Soreghan B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factor and signal transduction pathways. *Journal of Physiology, Paris.* 2001; 95: 337-344.
40. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D *et al.* Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. *Microsc Res Tech.* 2001; 53(5):343-353.
41. Aboul-Enein HY, Kładna A, Kruk I. Radical scavenging ability of some compounds isolated from *Piper cubeba* towards free radicals. *Luminescence.* 2011; 26(3): 202-7.
42. Júnior AAJ, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vanucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina Ribeirão Preto.* 1998; 31: 434-49.
43. Naito Y, Yoshikawa T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine.* 2002; 33: 323-336.
44. Aviello G, Canadanovic-Brunet JM, Milic N, Capasso R, Fattorusso E, *et al.* Potent Antioxidant and Genoprotective Effects of Boeravinone G, a Rotenoid Isolated from *Boerhaavia diffusa*. *PLoS One.* 2011; 6(5): e 19628.
45. Seema R, Chandana H. Melatonin ameliorates oxidative stress and induces cellular proliferation of lymphoid tissues of a tropical rodent, *Funambulus pennanti*, during reproductively active phase. *Protoplasma.* 2011.
46. Barreiros ABS, David JM. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 2006; 1: 113-123.

47. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD. Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling. *Mol Cells*. 2011; 32(6): 491-509.
48. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease *Biochim Biophys Acta*. 2011.
49. Chen X, Tian X, Shin I, Yoon J. Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Chem Soc Rev*. 2011.
50. Júnior LR, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metanólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova* 2001; 1: 112-119.
51. Tatemichi M, Ogura T, Sakurazawa N, Nagata H, Sugita M, Esumi H. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers. *International Journal of Experimental Pathology*. 2003; 84: 213-220.
52. Cho CH. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *Journal of Physiology, Paris*. 2001; 95: 253-256.
53. Fialkow L, Wang YC, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 42: 153-164.
54. Ganguly K, Kundu P, Banerjee A, Reiter RJ, Swarnakar S. Hydrogen peroxide-mediated downregulation of matrix metalloprotease-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 41: 911-925.
55. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed., New York: Oxford University Press Inc. 2007.

56. Raskatov JA, Meier JL, Puckett JW, Yang F, Ramakrishnan P, Dervan PB. Modulation of NF- κ B-dependent gene transcription using programmable DNA minor groove binders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 27.
57. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*. 1996; 12: 274-277.
58. Lee SU, Choi YH, Kim YS, Min YK, Rhee M, Kim SH. Anti-resorptive sauro lactam exhibits in vitro anti-inflammatory activity via ERK-NF-kappaB signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2010; 10(3): 298-303.
59. Halliwell B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32(3):125-30.
60. Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Szlachcic A, Nauert C, Slomiany B. Nitric oxide in gastroprotection by aluminium-containing antacids. *Eur J Pharmacol*. 1992; 229(2-3):155-62.
61. Das SK & Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences*. 2007; 81: 177-187.
62. Pervaiz S. Redox Pioneer: Professor Barry Halliwell. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(9): 1761-6.
63. Zablocka A, Janusz M. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw*. 2008; 62:118-124.
64. Baker RD, Cook CO, Goodwin DC. Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(3): 833-9.
65. Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. *Int J Biol Sci*. 2012;8(1):139-49.

66. Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J. Physiol Pharmacol.* 2002; 53: 761-773.
67. Richardson CT. Úlcera péptica. Em: Tratado de Medicina Interna. Ed. J.C. Wyngaarden, L.H. Smith and J.C. Bennett. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, p. 663-667, 1993.
68. Srikanta BM, Siddaraju MN, Dharmesh SM. A novel phenol-bound pectic polysaccharide from *Decalepishamiltonii* with mul-step ulcer prvenive activity. *World J Gastroenerol.* 2007; 13(39):5196-5207.
69. de Almeida AB, Luiz-Ferreira A, Cola M, Di Pietro Magri L, Batista LM, de Paiva JA, Trigo JR, Souza-Brito AR. Anti-ulcerogenic mechanisms of the sesquiterpene lactone onopordopicrin-enriched fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): role of somatostatin, gastrin, and endogenous sulfhydryls and nitric oxide. *J Med Food.* 2012; 15: 378-383.
70. Carvalho E, Franco A. R. M. e col. In: Ferreira, Carvalho, Silva. Gastroenterologia e Hepatologia - diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Medsi, 2003: 69 - 113.
71. Falcão HS, Mariath IR, Diniz MFFM, Batista LM, Barbosa-Filho JM. Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomedicine.* 2008; 15: 132–146.
72. Leong RW. Differences in peptic ulcer between the East and the West. *Gastroenterology Clinics of North America.* 2009; 38: 363-379.
73. Aguiar DCF, Corvelo TCO, Araújo M, Cruz EM, Daibes S, Assumpção MB. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas da mucosa gástrica. *Arq Gastroenterol.* 2002; 39(4): 222-232.

74. Vasconcelos PCP, Ballesteros KVR, Lima ZP, Kushima H, Hiruma-Lima CA, Vilegas W, Pellizzon CH. Avaliação da atividade antiulcerogênica das folhas de *Mouriri pusa*(Melastomataceae): uma espécie medicinal do cerrado. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Anais em CD. 2005, Botucatu, SP, Brasil.
75. Vasconcelos PC, Andreo MA, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. J Ethnopharmacol. 2010; 131(1): 146-53.
76. Couto G, Macedo G, Ribeiro F. Upper gastrointestinal bleeding associated with acetylsalicylic acid and non-steroidal antiinflammatory drugs in Portugal Results from PARAINES study. Port Gastreenterol. 2010; 17(5): 200-206.
77. Hermansson M, Ekedah A, Ranstam J, Zilling T. Decreasing incidence of peptic ulcer complications after the introduction of the proton pump inhibitors, a study of the Swedish population from 1974–2002. BMC Gastroenterol. 2009; 9:25.
78. Ahmed S, Salih M, Jafri W, Ali Shah H, Hamid S. *Helicobacter pylori* infection: approach of primary care physicians in a developing country. BMC Gastroenterol. 2009; 9: 23.
79. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in Health and Disease. Gastroenterol. 2009; 136:1863–1873.
80. Napolitano L. Refractory Peptic Ulcer Disease. Gastroenterology Clinics of North America. 2009; 38: 267-288.
81. Xia B, Xia HH, Ma CW, Wong KW, Fung FM, Hui CK, Chan CK, Chan AO, Lai KC, Yuen MF, Wong BC. Trends in the prevalence of peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection in family physician-referred uninvestigated dyspeptic patients in Hong Kong. Aliment Pharmacol Ther. 2005; 22:243–249.

82. Castro LP, Coelho LGV, Vieira WLSV, Rodrigues MAG. Úlcera Péptica gastroduodenal. Tratado de Clínica Médica. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Roca. 2009.
83. Colucci R, Fornai M, Antonioli L, Ghisu N, Tuccori M, Blandizzi C, Del Tacca M. Characterization of mechanisms underlying the effects of esomeprazole on the impairment of gastric ulcer healing with addition of NSAID treatment. Dig Liver Dis. 2009; 41:395-405.
84. Bolten WW. Rational use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and proton pump inhibitors in combination for rheumatic diseases. Orthopedic Research and Reviews. 2010, 2: 75–84.
85. Quan C, Talley NJ. Management of peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or NSAIDs. Am. J. Gastroenterol. 2002; 97(12):2950-61.
86. Torab FC, Amer M, Abu-Zidan FM, Branicki FJ. Perforated Peptic Ulcer: Different Ethnic, Climatic and Fasting Risk Factors for Morbidity in Al-Ain Medical District, United Arab Emirates. Asian J Surg. 2009; 32(2):95-101.
87. Kang JY, Elders A, Majeed A, Maxwell JD, Bardhan KD. Recent trends in hospital admissions and mortality rates for peptic ulcer in Scotland 1982-2002. Aliment Pharmacol Ther. 2006; 24(1): 65-79.
88. Yuan YH, Padol IT, Hunt RH. Peptic ulcer disease today. Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology. 2006; 3: 80-89.
89. Chen WQ, Wong TW, Yu TS. Direct and interactive effects of occupational stress and coping on ulcer-like symptoms among Chinese male off-shore oil workers. Am J Ind Med. 2009; 52(6):500-8.

90. Hauge T, Persson J, Sjolund K. Neuropeptides in the duodenal mucosa of chronic alcoholic heavy drinkers. *Alcohol Alcohol*. 2001; 36(3):213-218.
91. Wu WK, Cho CH. The Pharmacological Actions of Nicotine on the Gastrointestinal Tract. *J Pharmacol Sci*. 2004; 94:348–358.
92. Lee SW, Chang CS, Lee TY, Yeh HZ, Tung CF, Peng YC. Risk factors and therapeutic response in Chinese patients with peptic ulcer disease. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(16): 2017-22.
93. Kim YS, Park SW, Kim MH, Jang EJ, Park JS, Park SJ, Baik HW, Chung G, Hahm KB. Novel single nucleotide polymorphism of the *VEGF* gene as a risk predictor for gastroduodenal ulcers. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23(2):131–139.
94. Berstad K, Berstad A. *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1993; 28: 561-567.
95. d'Accampora JA, Lima DAN, Sousa MV, Aquino AC, Russi RF, Vieira J, Lopes A. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perfurada atendidos no centro cirúrgico do Hospital Florianópolis. *Revista do Médico Residente*. 2008; 10: 141-146.
96. Tan HJ, Goh KL. Changing epidemiology of *Helicobacter pylori* in Asia. *J Dig Dis*. 2008; 9(4):186-9. Review.
97. Gustavsson S, Nyren O. Time trends in peptic-ulcer surgery, 1956 to 1986 - a nationwide survey in Sweden. *Annals of Surgery*. 1989; 210: 704-709.
98. Rozza AL, de Mello Moraes T, Kushima H, Nunes DS, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. Involvement of Glutathione, Sulfhydryl Compounds, Nitric Oxide, Vasoactive Intestinal Peptide, and Heat-Shock Protein-70 in the Gastroprotective Mechanism of

- Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) Essential Oil. J Med Food. 2010; 14(9): 1011-7.
99. Chan FK, Leung WK. Peptic-ulcer disease. The Lancet. 2002; 360: 933-941.
100. Suzuki H, Nishizawa T, Hibi T. *Helicobacter pylori* eradication therapy. Future Microbiology. 2010; 5: 639-648.
101. Navabi N, Aramon M, Mirzazadeh A. Does the presence of the *Helicobacter pylori* in the dental plaque associate with its gastric infection? A meta-analysis and systematic review. Dent Res J (Isfahan). 2011; 8(4): 178-82.
102. Montanari JJ. Aspectos da Produção Comercial de Plantas Medicinais Nativas. Campinas/ BRASIL: CPQBA-Unicamp. 2002.
103. Li Y, Ohizumi Y. Search for constituents with neurotrophic factor-potentiating activity from the medicinal plants of paraguay and Thailand. Yakugaku Zasshi. 2004; 124(7): 417-424.
104. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med. 2006; 27(1): 1-93.
105. Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Cienc Cult. 2003; 55(3): 37-39.
106. Tôrres AR, Oliveira RAG, Diniz MFFM, Araújo EC. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. Rev Bras Farmacogn. 2005; 15(4): 373-380.
107. Calapai G, Caputi AP. Herbal medicines: can we do without pharmacologist? Evid Based Complement Alternat Med. 2007; 4(1): 41-3.

108. Brandão MG, Cosenza GP, Stanislau AM, Fernandes GW. Influence of Brazilian herbal regulations on the use and conservation of native medicinal plants. *Environ Monit Assess.* 2010; 164(1-4): 369-77.
109. Ibrahim AA, Abdulqader AA, Jaber SM, Mohammed OA, Mohammed AA, Syed R, Shaffi AS. Gastroprotective Effect of an Aqueous Suspension of Black Cumin *Nigella sativa* on Necrotizing Agents-Induced Gastric Injury in Experimental Animals. *Saudi J Gastroenterol.* 2008; 14(3): 128-134.
110. Bonacorsi C, Raddi MS, Carlos IZ, Sannomiya M, Vilegas W. Anti-Helicobacter pylori activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). *BMC Complement Altern Med.* 2009, 16;9:2.
111. Alqasoumi S, Al-Sohaibani M, Al-Howiriny T, Al-Yahya M, Rafatullah S. Rocket "*Eruca sativa* ": A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(16): 1958-1965.
112. Luiz-Ferreira A, Almeida AC, Cola M, Barbastefano V, Almeida AB, Batista LM, Farias-Silva E, Pellizzon CH, Hiruma-Lima CA, Santos LC, Vilegas W, Brito AR. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Molecules.* 2010; Oct 5;15(10): 7153-66.
113. Caldas GF, do Amaral Costa IM, da Silva JB, da Nóbrega RF, Rodrigues FF, da Costa JG, Wanderley AG. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2011; 137(1):886-92.
114. de-Faria FM, Almeida AC, Luiz-Ferreira A, Dunder RJ, Takayama C, da Silva MS, da Silva MA, Vilegas W, Rozza AL, Pellizzon CH, Toma W, Souza-Brito AR.

- Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. J Ethnopharmacol. 2012; 139(1): 234-43.]
115. Barrowman JA, Pfeiffer CJ. Drugs and peptic ulcer. Boca Raton: CRC Press. 1982.
 116. Barbastefano V. (2007) Atividade antiulcerogênica de extratos brutos, frações semi-purificadas e substância ativa de duas espécies do gênero *Vernonia*: *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea*. Orientadora: Dr^a Alba Regina Monteiro Souza Brito. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas/SP.
 117. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. Phytother Res. 2008; 22: 709-724.
 118. Moraes MO, Bezerra FA, Lotufo LV, Pessoa C, Moraes ME. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. Arq Bras Fitomed Cient. 2004; 1:30-38.
 119. Bandeira PN, Pessoa ODL, Trevisan MTS. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. Química Nova. 2002; Vol. 25(6B): 1078-1080.
 120. Rüdiger AL, Sianib AC, Veiga Junior VF. The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). Pharmacognosy Reviews. 2007; 1(1): 93-104.
 121. Ferreira LC, Thomazi RD, Oliveira DAC, Silva AG. Population structure and spatial pattern of *Protium icariba* (DC.) Marchand at the Environmental Protection Area of Setiba, Espírito Santo, Southeastern Brazil. Natureza on line. 2010; 8 (1): 39-45.
 122. Oliveira FA, Costa CL, Chaves MH, Almeida FR, Cavalcante IJ, Lima AF, *et al.* Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α- and h-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. Life Sci 2005; 77: 2942–2952.

123. Citó AML, Costa FB, Lopes JAD, Oliveira VMM, Chaves MH. Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). Rev Bras Pl Med Botucatu. 2006; 8(4): 4-7.
124. Aragão GF, Carneiro LMV, Junior APF, Vieira LC, Bandeira PN, Lemos TLG, *et al.* A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Pharmacol Biochem and Behav 2006; 85: 827–834.
125. Oliveira FA, Vieira-Júnior GM, Chaves MH, Almeida FR, Florêncio MG, Lima RC *et al.* Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. Pharmacological Research. 2004; 49: 105–111.
126. Wagner KH, Elmadfa I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. Ann Nutr Metab. 2003; 47(3-4): 95-106.
127. Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica orgânica. Venezuela: Editorial Torino; segunda edição, 2002.
128. Baker ME. Licorice and enzymes other than 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: an evolutionary perspective. Steroids. 1994; 59(2): 136-141.
129. Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D *et al.* Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. Nat Prod Rep. 2006; 23(3): 394-411.
130. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology. 2004; 94: 223-253.
131. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC; 2004.

132. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 446-475.
133. Wei A, Shibamoto T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58: 7218-7225.
134. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 2005; 91: 621-632.
135. Neves A, Rosa S, Gonçalves J, Rufino A, Judas F, Salgueiro L, Lopes MC, Cavaleiro C, Mendes AF. Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced NF κ B activation and NO production in human chondrocytes: characterization of the inhibitory activity of α -pinene. *Planta Medica*. 2010. 76: 303-308.
136. Martínez AL, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ, Navarrete A. Antinociceptive effect and GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. *Planta Medica*. 2009; 75: 508-511.
137. de las Heras B, Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflammation and Allergy-Drug Targets*. 2009; 8: 28-39.
138. Sacchetti G, Medici A, Maietti S, Radice M, Muzzoli M, Manfredini S, Braccioli E, Bruni R. Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum mictanthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 3486-3491.

139. Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC, Machado Rocha LR, Marques MO, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*. 2009; 180: 499-505.
140. Takayama C, de-Faria FM, de Almeida AC, Valim-Araújo Dde A, Rehen CS, Dunder RJ, Socca EA, Manzo LP, Rozza AL, Salvador MJ, Pellizzon CH, Hiruma-Lima CA, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2011; 135(1): 147-55.
141. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream. Allured Publish Corporation. 1995.
142. Khan HA. Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004; 49(2):89-95.
143. Morimoto Y, Oshima S, Hara H, Sukamoto T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jpn J Pharmacol*. 1991; 57(4):495-505.
144. Hayden LJ, Thomas G, West GB. Inhibitors of gastric lesions in the rat. *Journal of Pharmacology*. 1978; 30: 244-246.
145. Shay H, Komarov SA, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol*. 1945; 5: 43-61.
146. Batista LM, de Almeida AB, de Pietro ML, Toma W, Calvo TR, Vilegas W, *et al.*. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004; 27: 328-332.

147. Rafatullah S, Tariq M, Al-Yahya MA, Mossa JS, Ageel AM. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. J. Ethnopharmacol. 1990; 29: 25-34.
148. Curtis GH, ManNaughton WK, Gall DG, Wallace JL. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 1995; 73: 130-134.
149. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.
150. Ohkawa H, Nobuko O, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Ana Biochemical. 1979; 95 : 351-358.
151. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrel RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med 1995; 85 : 337-341.
152. Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In Analysis of free radicals in biological systems. Ed Verla Bostonp. 1995; 237-48.
153. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Inuma S *et al.* Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. Gut. 1993; 34(6):732-7.
154. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. Methods Enzymol 1985; 113: 484-490.
155. Takagi K, Okabe S, Saziki R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. Jpn J Pharmacol. 1969; 19 : 418-426.

156. Okabe S, Amagase K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models -The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1321-1341.
157. Lima ZP, Severi JA, Pellizzon CH, Brito AR, Solis PN, Caceres A. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent?. *J Ethnopharmacol.* 2006; 106(1): 29-37.
158. Souza-Brito ARM. In *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Editora da Unicamp, Campinas, 1994.
159. Abu-Darwish MS, Al-Ramamneh EA, Kyslychenko VS, Karpiuk UV. The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region - South of Jordan. *Pak J Pharm Sci.* 2012; 25(1):239-46.
160. Mercier B, Prost J, Prost M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *International journal of Occupational Medicine and Environmental Health.* 2009; 22: 331-342.
161. Selene M de Moraes, Eveline SB Cavalcanti, Sônia MO Costa, Liza A Aguiar. Antioxidant action of teas and seasonings more consumed in Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2009; 19(1B): 315-320.
162. Ito K, Ito M. Sedative effects of vapor inhalation of the essential oil of *Microtoena patchoulii* and its related compounds. *J Nat Med.* 2011; 65(2):336-43.
163. Marzec KM, Reva I, Fausto R, Proniewicz LM. Comparative matrix isolation infrared spectroscopy study of 1,3- and 1,4-diene monoterpenes (α -phellandrene and γ -terpinene). *J Phys Chem A.* 2011; 115(17):4342-53.
164. Cuevas VM, Calzado YR, Guerra YP, Yera AO, Despaigne SJ, Ferreiro RM, Quintana DC. Effects of grape seed extract, vitamin C, and vitamin e on ethanol- and aspirin-induced ulcers. *Adv Pharmacol Sci.* 2011; 2011:740687.

165. Murata K, Oyagi A, Takahira D, Tsuruma K, Shimazawa M, Ishibashi T, Hara H. Protective Effects of Astaxanthin from *Paracoccus carotinifaciens* on Murine Gastric Ulcer Models. *Phytother Res.* 2011; doi: 10.1002/ptr.3681.
166. Lemos M, Santin JR, Júnior LC, Niero R, Andrade SF. Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. *J Ethnopharmacol.* 2011; 138(2):503-7.
167. Vazquez-Ramirez R, Olguin-Martinez M, Kubli-Garfias C, Hernandez-Munoz R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanolinduced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *World J.Gastroenterol.* 2006; 12(27): 4318-4324.
168. Madalosso RC, Oliveira GC, Martins MT, Vieira AE, Barbosa J, Caliari MV, Castilho RO, Tagliati CA. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *J Ethnopharmacol.* 2011.
169. Deguchi H, Yasukawa K, Yamasaki T, Mito F, Kinoshita Y, Naganuma T, Sato S, Yamato M, Ichikawa K, Sakai K, Utsumi H, Yamada K. Nitroxides prevent exacerbation of indomethacin-induced gastric damage in adjuvant arthritis rats. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(9): 1799-805.
170. Rocha NF, Oliveira GV, Araújo FY, Rios ER, Carvalho AM, Vasconcelos LF, Macêdo DS, Soares PM, Sousa DP, Sousa FC. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur J Pharm Sci.* 2011 Nov; 44(4):455-61.
171. La Casa C, Villegas I, arcon de la LC, Motilva V, Martin Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology.* 2000; 71: 45-53.

172. Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farre S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Molecular Aspects of Medicine*. 2004; 25: 191-198.
173. Toma W, Gracioso JS, de Andrade FD, Hiruma-Lima CA, Vilegas W, Souza-Brito ARM. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2002; 25: 1151-1155.
174. Rodrigues PA, de Morais SM, de Souza CM, Silva AR, de Andrade GM, Silva MG, Albuquerque RL, Rao VS, Santos FA. Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 127: 725-730.
175. Zimmerman BJ, Granger DN. Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: role in ischemia-reperfusion injury. *Hepato-gastroenterology*. 1994; 41: 337-342.
176. Vlasova II, Sokolov AV, Arnhold J. The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase. *J Inorg Biochem*. 2012; 106(1):76-83.
177. Alimi H, Hfaiedh N, Bouoni Z, Hfaiedh M, Sakly M, Zourgui L, Rhouma KB. Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. inermis root extract in rats. *Phytomedicine*. 2010; 17(14):1120-6.
178. Mizui T, Doteuchi M. Lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sciences*. 1986; 38: 2163-2167.

179. Melchiorri D, Sewerynek E, Reiter RJ, Ortiz GG, Poeggeler B, Nistico G. Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 1997; 121: 264-270.
180. Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Krohn RL, Bagchi DJ, Garg A, Bagchi M, Mitra S, Stohs SJ. Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Journal of Applied Toxicology*. 1998; 18: 3-13.
181. Kahraman A, Erkasap N, Koken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology*. 2003; 183: 133-142.
182. Arafa HM, Sayed-Ahmed MM. Protective role of carnitine esters against alcohol-induced gastric lesions in rats. *Pharmacological Research*. 2003; 48: 285-290.
183. Araujo DAOV, Takayama C, Luiz-Ferreira A, de-Faria FM, Socca EAR, ARM Souza-Brito. Gastroprotective Effects of Essential Oil from *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) on Experimental Gastric Ulcer Models in Rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2011; 21(4): 721-729.
184. Farias-Silva E, Cola M, Calvo TR, Barbastefano V, Ferreira AL, De Paula Michelatto D, Alves de Almeida AC, Hiruma-Lima CA, Vilegas W, Brito AR. Antioxidant Activity of Indigo and its Preventive Effect against Ethanol-Induced DNA Damage in Rat Gastric Mucosa. *Planta Med*. 2007; 73(12):1241-6.
185. Repetto M, Maria A, Guzman J, Giordano O, Llesuy S. Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. *J Pharm Pharmacol*. 2003; 55: 551-557.

186. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005; 26: 340-352.
187. Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2005; 59: 143-148.
188. Konturek PC, Burnat G, Brzozowski T, Zopf Y, Konturek SJ. Tryptophan Free Diet Delays Healing of Chronic Gastric Ulcers in Rat. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2008; 59: 53-65.
189. Ganguly K, Swarnakar S. Induction of matrix metalloproteinase-9 and-3 in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute gastric ulcers in mice: regulation by melatonin. *Journal of Pineal Research*. 2009; 47: 43-55.
190. Alvarez-Suarez JM, Dekanski D, Ristić S, Radonjić NV, Petronijević ND, Giampieri F, Astolfi P, González-Paramás AM, Santos-Buelga C, Tulipani S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *PLoS One*. 2011; 6(10): e25878.
191. Zamora Rodríguez ZB, González Alvarez R, Guanche D, Merino N, Hernández Rosales F, Menéndez Cepero S, Alonso González Y, Schulz S. Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators Inflamm*. 2007; 2007: 65873.
192. Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2003; 26: 1398-1402.
193. Luczaj W, Skrzydlewska E. Antioxidant properties of black tea in alcohol intoxication. *Food and Chemical Toxicology*. 2004; 42: 2045-2051.

194. Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biological Chemistry*. 2003; 384: 567-574.
195. Loguercio C, Taranto D, Beneduce F, Del Vecchio BC, de VA, Nardi G, Romano M. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut*. 1993; 34: 161-165.
196. Bilici D, Suleyman H, Banoglu ZN, Kiziltunc A, Avci B, Ciftcioglu A, Bilici S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Digestive Diseases and Sciences*. 2002; 47: 856-861.
197. Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD, Gil A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Digestive Diseases and Sciences*. 2000; 45: 1820-1827.
198. Tham DM, Whitin JC, Cohen HJ. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatric Research*. 2002; 51: 641-646.
199. Long LK, Yang J, An Y, Liu G. Disruption of a glutathione reductase encoding gene in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of its growth, cephalosporin production and antioxidative ability which is recovered by exogenous methionine. *Fungal Genet Biol*. 2011.
200. Moghadasian MH, Godin DV. Ethanol-induced gastrointestinal damage - Influence of endogenous antioxidant components and gender. *Digestive Diseases and Sciences*. 1996; 41: 791-797.

201. Rukkumani R, Aruna K, Varma PS, Menon VP. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2004; 55: 551-561.
202. Wallace JL. Prostaglandins, NSAID, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiological Reviews*. 2008; 88: 1547-1565.
203. D'Argenio G, Mazzone G, Tuccillo C, Grandone I, Gravina AG, Graziani G, Fogliano V, Romano M. Apple polyphenol extracts prevent aspirin-induced damage to the rat gastric mucosa. *Br J Nutr*. 2008; 100(6): 1228-36.
204. Peskar BM. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. *Inflammopharmacology*. 2005; 13: 15-26.
205. Poonam D, Vinay CS, Gautan P. Cyxlo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in experimental chronic gastric ulcer healing. *European Journal of Pharmacology*. 2005; 519: 277-284.
206. Schmassman A, Zoidl G, Peskar BM, Waser B, Schmassmansuhijar D, Gebbers JO, Reubi JC. Role of the different isoformas of cyclooxygenase and nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in cyclooxygenase-1 and -2 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 290(4): G747-G756.
207. Wallace JL. Recent advances in gastric ulcers therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005; 5(6): 573-577.
208. Tsuji S, Sun W, Tsuji M, Kawai N, Kimura A, Kakiuchi Y, Yasumaru S, Komori M, Murata H, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Lansoprazole Induces Mucosal Protection through Gastrin Receptor-Dependent Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 in Rats. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 2002; 303(3): 1301-1308.

10. Apêndice

10. 1. Gastroprotective Effects of Essential Oil from *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) on Experimental Gastric Ulcer Models in Rats

Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats

Deborah A. O. Valim Araujo,^{*,1} Christiane Takayama,² Felipe M. de-Faria,² Eduardo A. R. Socca,² Ricardo J. Dunder,² Luis P. Manzo,² Anderson Luiz-Ferreira,² Alba R. M. Souza-Brito²

¹Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas Universidade Estadual de Campinas, Brazil,

²Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brazil.

Abstract: Peptic ulcers are a common disorder of the entire gastrointestinal tract, its etiology has not been completely elucidated. The basic physiopathological of peptic ulcers result from an imbalance between some endogenous aggressive factor and cytoprotective factors. The treatment of this disease is usually done with antacids or proton pump, but are currently being used plants derivated compounds. We evaluated the gastroprotective properties and its possible mechanisms of action of the essential oil from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, Burseraceae (BB). The formation of ulcers, were evaluated in three experimental models, through the induction of gastric lesions by ethanol, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetic acid. The mechanisms of action were evaluated through the pylorus ligation experiment, western blot, GSH, GR, SOD, GPx, MDA and MPO activities. BB significantly inhibited the formation of ulcers induced by the three different models, increased the GSH and GR levels and maintained the same levels of SOD and GPx of the sham group, inhibited MPO and MDA, did not produce significant modification in gastric juice content and showed increased COX-2 and EGF. BB exerts its gastroprotective activity, possibly, by increasing COX-2 and EGF expression and due to its possible antioxidant property.

Introduction

Peptic ulcer is a common disorder of the entire gastrointestinal tract, they occur mainly in the stomach and the proximal duodenum (Mayty et al., 2003). Despite great advances in the understanding of the peptic ulcer illness, its etiology has not been completely elucidated. The basic physiopathological of gastric ulcer results from an imbalance between some endogenous aggressive factor(s) [hydrochloric acid, pepsin, refluxed bile, leukotrienes, reactive oxygen species (ROS)] and cytoprotective factors, which include the function of the mucus-bicarbonate barrier, surface active phospholipids, prostaglandins (PG), mucosal blood flow, cell renewal and migration, nonenzymatic and enzymatic antioxidants and some growth factors (Bandyopadhyay et al., 2001; Bhattacharjee et al., 2002).

Although recent advances in our understanding have highlighted the multi-factorial pathogenesis of peptic ulcers, secretion of gastric acid is still recognized as a central component of this disease. Therefore, the

main therapeutic target is the control of this secretion using antacids, H₂ receptor blockers (ranitidine, famotidine) or proton pump blockers (omeprazole and lansoprazole) (Rao et al., 2004). However, nowadays, gastric ulcer therapy faces a major drawback because most of the drugs currently available in the market show limited efficacy against gastric diseases and are often associated with severe side effects (Bandyopadhyay et al., 2002; Lehne, 1998).

In this context, the use of medicinal plants for the prevention and treatment of different pathologies is in continuous expansion worldwide (Mota et al., 2009). Natural products are gaining space and importance in the pharmaceutical industry as well as inspiring the search for new potential sources of bioactive molecules (Cechinel-Filho & Yunes, 2001; Schmeda-Hirschmann & Yesilada, 2005). The natural active compounds classes or secondary metabolites as alkaloids, flavonoids, terpenoids, tannins and others have attracted researchers to investigate their chemical, toxicological and pharmacological features. Some plants studied showed efficacy against gastric ulcers

Revista Brasileira de Farmacognosia
Brazilian Journal of Pharmacognosy
21(4): 721-729, Jul./Aug. 2011

5
ANOS

Article

Received 10 Aug 2010

Accepted 1 Jan 2011

Available online 8 Jul 2011

Keywords:

essential oil

gastric ulcer

Protium heptaphyllum

ISSN 0102-695X

doi: 10.1590/S0102-695X2011005000117

such as: *Anacardium humile* have shown to possess antiulcerogenic activity (Luiz-Ferreira et al., 2010), as well as *Vernonia polyanthes* (Barbastefano et al., 2007), among others.

Protium heptaphyllum (Aubl.) Marchand, Burseraceae, is a medicinal plant largely found in the North and Northeast of Brazil, it is popularly known as “breu branco”, and popularly used for inflammations, pain, ulcers and wounds. The triterpenes isolated from several species of medicinal plants are, in general, responsible, at least in part, for their biological activities (Aragão et al., 2006), including anti-inflammatory, anti-ulcer, anti-hyperlipidemic, anti-tumor, and hepatoprotective (Oliveira et al., 2005). Essential oils are complex mixtures comprising many single compounds, chemically derived from terpenes and their oxygenated compounds, these constituents contribute to the antifungal, antiviral, antioxidant effects (Laciar et al., 2009; Aidi et al., 2010). The present study aims to characterize the anti-ulcerogenic activity of the essential oil of *Protium heptaphyllum* March (BB) in three distinct induced gastric ulcer models: ethanol, Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs and acetic acid as well as the mechanisms of action.

Materials and Methods

Animal

Male Wistar rats Unib: WH, (n=7, 180-250 g), were obtained from the Central Animal House of the State University of Campinas (CEMIB/Unicamp). Animals were fed a certified Nuvilab® (Nuvital) diet, with free access to tap water, and were housed on a 12 h light/dark cycle at 60±1% humidity and a temperature of 21±2 °C. The experimental protocols were all approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Institute of Biology in the State University of Campinas (n° 852-1, CEEA/IB/Unicamp).

Essential oil

The BB was purchased from Laszlo aromaterapia Ltda. and was obtained from leaves and stem from this specimen by steam distillation. Parts of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, Burseraceae, were collected in the river delta Jequiriçá in the city of Valença, Bahia state (BA), Brazil by Antonio Calmon. An authenticated “voucher” specimen was identified by Jorge Yoshio Tamashiro of Unicamp and deposited under the number 151890 at UEC herbarium (Campinas, SP-Brazil).

Identification of essential oil constituents

The BB samples were analyzed in a gas chromatographer coupled to an electronic (70 eV) mass spectrometer (GC-MS, Shimadzu, GC-2010) equipped with a capillary column of fused silica (DB-5; 5.30 m x 0.32 mm x 0.25 µm), helium as the carrier gas (1.52 mL/min, White Martins, 99.9%), injector at 250 °C, detector at 250 °C and split injection mode. Mass spectrum acquisition was performed at a mass range from 40 to 600 m/z. The essential oil (10 µL) was diluted in chloroform to produce 1 mL of chromatographic grade solvent, 1 µL of which was injected as sample at the split ratio of 1:30. The column temperature was heated to 60 °C and programmed at 5 °C/min to 220 °C. The identification of substances was performed by the comparison of its mass spectra with the GC-MS system database (NIST 62 lib.), the literature and with the Kovats retention indices.

Drugs

The following drugs were used: lansoprazole (Medley, Campinas-SP, Brazil), Tween 80® and acetic acid (Sinth, SP, Brasil), absolute ethanol (®Merck KGaA, Darmstadt, Germany), cimetidine, carbenoxolone, indomethacin, were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). All reagents were of high grade of purity. The BB was dissolved in a 12% Tween 80® solution (w/v). The substances were prepared just before use.

Ethanol-induced gastric lesions

Ethanol-induced ulcers were evaluated in rats according to Morimoto (Morimoto et al., 1991). Rats fasted for 24 h were treated with BB (12.5, 25, 50 and 100 mg/kg), lansoprazole (30 mg/kg) or vehicle 12% Tween 80® (10 mL/kg). One hour after treatment all the animals received, orally, 1 mL/kg of absolute ethanol. Animals were killed by cervical dislocation one hour after ethanol administration, their stomachs removed, opened along the great curvature and fixed between two glass plates. The inner surface of the stomach was examined with a dissecting microscope (Nikon SMZ 800) and photographed with a Nikon Coolpix 4500 camera for later computer analysis. The total ulcerated area in the stomach corpus was measured with Bioview 4 (AvSoft, Brazil) an image analysis software (Khan, 2004).

Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) - induced gastric lesions

In this model, the gastric ulcer was induced using indomethacin (100 mg/kg), administered to rats after 36 h fast. BB (100 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg) or vehicle 12% Tween 80 (10 mL/kg) was administered

orally, 30 min before the induction of gastric ulcer. The animals were killed by cervical dislocation 5 h after ulcer induction (Puscas et al., 1997). Their stomachs were removed and analyzed as previously described.

Chronic ulcer and toxicity evaluation

The experiments were carried out according to the method described by Takagi (Takagi et al., 1969) with some modifications in Okabe (Okabe & Amagase, 2005). Rats fasted for 24 h, under anaesthesia with ketamine and xylazine, a laparotomy was done in all animals through a midline epigastric incision. After exposing the stomach, one small tube was placed on the stomach, in the serosa region with an acetic acid solution 100% for 1 min. The abdomen was then closed and all the animals were fed normally. Two days after surgery, the treatment started: oral administration of BB (100 mg/kg), carbenoxolon (100 mg/kg) and vehicle Tween 80 12% (10 mL/kg), once a day for fourteen consecutive days. On the day after the last drug administration, the rats were killed by cervical dislocation, the stomachs removed and analyzed as described above. The toxicological parameters were set according to the method of Souza-Brito 1994 (Souza-Brito, 1994). The toxicity in the animals submitted to BB (100 mg/kg) treatment was evaluated for a period of fourteen days. The body weight progression, hair and mucosal alteration were observed daily. The following organs were weighed to detect any effect of the essential oil on their individual weights: heart, lungs, liver and kidneys.

Gastric secretion in pylorus ligation induced lesions

The method described by Shay (Shay et al., 1945), was used with some modifications. Rats were fasted for 36 h. Immediately after pylorus ligation, BB (100 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg) and vehicle Tween 80 12% (10 mL/kg) were administered orally and intraduodenally. Rats were killed 4 h later, their abdomens were opened and their stomachs removed. The amount of the gastric juice (mL) and its pH were determined using a pH-meter (PA 200, Marconi S.A., Piracicaba, Brazil).

Western blot assay

Frozen glandular stomachs samples were homogenized in 1mL of ice cold phosphate buffer (PB 0.1M, pH 7.4 and protease inhibitor 1%). Homogenates were centrifuged (12000 g 15 min, 4 °C) and the supernatants were collected and stored at -80 °C. Protein concentration of the homogenate was determined following Bradford's colorimetric method (Bradford,

1976). Then, samples were treated with Laemmili buffer (PB 0.5 M, pH 6.8; glycerol, sodium dodecyl sulphate (SDS) 10%, bromophenol 0.1%, β -mercaptoethanol) in a 1:1 proportion. Equal amounts of protein from samples (100 μ g) were separated on 10% acrylamide gel by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. In the next step, proteins were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with specific primary antibodies: EGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) and COX-2 (Cayman Chemical, USA) at dilution of 1:500. Each membrane was washed three times for 10 min and incubated with anti-goat immunoglobulin G antibody (Zymed Laboratories, USA) for EGF and with anti-rabbit (Zymed Laboratories, USA) for COX-2, both at dilution of 1:5000. To prove equal loading, the blots were analyzed for β -actin expression using an anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich, MO, USA). Immunodetection was performed using enhanced chemiluminescence light-detecting kit (SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate, Pierce, IL, USA). Densitometric data were performed following normalization to the control (housekeeping gene) by AVSoft program.

Antioxidant activity

All tissues used in these antioxidant experiments were obtained from models of gastric ulcer induced by ethanol (Morimoto et al., 1991).

Glutathione peroxidase (GPx)

The activity of GPx in the gastric mucosa was evaluated spectrophotometrically at 365 nm. The absorbances were read at each minute between 1 and 10 min. This assay is based on the oxidation of the reduced glutathione by glutathione peroxidase coupled to the oxidation of NADPH by glutathione reductase. The tissue homogenate was diluted in phosphate buffer (PB) (1:10). 100 μ L of this solution was mixed with 50 μ L H_2O_2 (0.25 mM), 20 μ L of reduced glutathione (10 mM), 20 μ L NADPH (4 mM), 10 μ L (1 U) of glutathione reductase. The new solution was diluted again in PBS, pH 7.8 (Yoshikawa et al., 1993).

Glutathione reductase (GR)

GR activity was determined spectrophotometrically by measuring the rate of NADPH oxidation at 340 nm (Carlberg & Mannervick, 1985). Results are expressed as the amount of enzyme that catalyses the oxidation of 1 μ mol of NADPH per minute per milligram of tissue (μ mol/min⁻¹/mg tissue⁻¹).

Superoxide dismutase (SOD)

The SOD activity was assessed by the inhibition of the reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) by the generated superoxide radical through the hypoxanthine/xanthine oxidase system (XO) at 37 °C. The enzymatic reaction was composed of: PB 0.1 M; pH 7.4; 0.07 U of XO mL⁻¹; 100 µM hypoxanthine; 600 µM NBT and 1 mg/mL of protein from the sample (Winterbourn et al., 1995).

Mieloperoxidase (MPO)

The MPO activity in the gastric mucosa was determined according to the method of Winterbourn (Winterbourn et al., 1995). After the experiment of inducing ulcer with absolute ethanol, a portion of the glandular stomach of the animals was shaved and suspended in 1 mL of sodium phosphate buffer 0.05 M pH 6.8. The tissue was homogenized and centrifuged at 4 °C, 12000 x g, for 15 min and the supernatant was analyzed. The absorbances were read at 460 nm at each minute between 1 and 10 min. The results were expressed in U/g of protein.

Sulfhydryl group (GSH)

The samples were centrifuged (12000 x g, 4 °C for 15 min.) and the supernatant diluted (1:10) in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Then, a reading was made based on the absorbance of 100 µL of sample plus 100 µL of Tris solution (1.0 mM) and EDTA (0.02 mM) at 412 nm (A1). After the reading, 20 µL of (5,5 ditiobis 2-nitrobenzoic) acid (DTNB 0.01 mM) was added, dissolved in methanol and has been re-read (A2) at 412 nm after 15 min. of reaction. The concentration of sulfhydryl group (thiol) is given by (A1-A2) x 1.57 (Faure & Lafond, 1995).

Determination of lipid peroxidation or malondialdehyde (MDA) formation

The concentrations of gastric mucosal lipid peroxidation were determined by estimating malondialdehyde using the thiobarbituric acid test (Ohkawa et al., 1979). The stomachs of the rats were promptly excised and rinsed with cold saline. To minimize the possibility of hemoglobin's interference with free radicals, any blood adhering to the mucosa was carefully removed. The gastric mucosa was scraped, weighed, and homogenized in 10 mL of 100 g/L KCl. The homogenate (0.5 mL) was added to a solution containing 0.2 mL of 80 g/L sodium lauryl sulfate, 1.5 mL of 200 g/L acetic acid, 1.5 mL of 8 g/L 2-thiobarbiturate, and 0.3 mL of distilled water. This mixture was heated at 98 °C for 1 h. and after cooled, 5

mL of *n*-butanol:pyridine (15:1) was added. The mixture was vortexed for 1 min. and centrifuged for 30 min. at 4000 x g. The supernatant absorbance was measured at 532 nm. The standard curve was obtained by using 1,1,3,3-tetramethoxypropane. The recovery was over 90%. The results were expressed as nanomoles of MDA per gram of wet tissue (nmol/g tissue).

Statistical analysis

Results were expressed as the mean±SEM. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Tukey's post-hoc test, with the minimum level of significance set at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Although there are many products in the market for the treatment of gastric ulcers, including antacids, proton pump inhibitors, anticholinergics and histamine H₂-antagonists, most of these drugs produce several adverse reactions, such as gynecomastia, hematopoietic changes, acute interstitial nephritis, thrombocytopenia anaphylaxis reactions, nephrotoxicity and hepatotoxicity. In developing countries the peptic ulcer treatment is very expensive, thus, there is a growing need for less expensive antiulcer agents with minor side effects. In this context, medicinal plants are amongst the most attractive sources of new drugs, and have been shown to give promising results in the treatment of gastric ulcers. In Brazil, a large number of herbal extracts is used in folk medicine to treat various types of digestive disorders (Hiruma-Lima et al., 2006). We studied the gastroprotective effect of the BB and its possible mechanisms of action.

In the present investigation, the GC-MS analysis revealed that the components of the BB are α -pinene 40%, followed by *p*-mentha-1,4(8)-diene 12% and α -phellandrene 10% and thirteen components in lower concentrations (Table 1), thus revealing that this oil is composed mainly by monoterpenes. Monoterpenic essential oils are considered natural antioxidants due to the presence of α -pinene (Singh et al., 2010; Aidi et al., 2010).

Oral administration of absolute ethanol is noxious to the stomach since it affects the gastric mucosa topically by disrupting its barrier and provoking pronounced microvascular changes within a few minutes after its application (Moleiro et al., 2009). Even oral administration of absolute ethanol to rats produced linear hemorrhagic lesions, extensive submucosal edema, mucosal friability, inflammatory cells infiltration, and epithelial cell loss in the stomach, which are typical characteristics of alcohol injury

(Franke et al., 2005). The pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal damage occurs directly and indirectly through various mediators such as lipoxygenase, cytokines, and oxygen-derived free radicals (Abdel-Salam et al., 2001). Oral administration of BB (12.5, 25, 50 and 100 mg/kg) inhibited ethanol-induced gastric lesions by 4, 45, 46 and 96% respectively. When compared to the control value, BB significantly inhibited ulcerative lesions at the dose of 100 mg/kg, therefore this dose was used in all other experiments (Table 2).

Table 1. Chemical composition (percentage) of essential oils extracted from *Protium heptaphyllum* using analysis by GC-MS.

Peak	RT	Compound	Composition%
1	4,283	α -thujene	1,03
2	4,435	α -pinene	40,32
3	4,734	camphene	1,32
4	5,311	sabinene	0,12
5	5,376	β -pinene	4,78
6	5,448	<i>p</i> -menth-2-ene	0,1
7	5,765	β -myrcene	0,11
8	5,919	carane	2,36
9	6,062	α -phellandrene	10,27
10	6,208	3-carene	5,78
11	6,377	2-carene	2,31
12	6,582	<i>p</i> -cimene	9,64
13	6,696	<i>m</i> -mentha-1,8-diene	8,88
14	7,518	δ -terpinene	0,66
15	8,322	<i>p</i> -mentha-1,4(8)-diene	12,14
16	9,841	camphor	0,18

RT- Retention time

Table 2. Effect of BB on gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. Results were expressed as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and compared to vehicle. * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$.

Treatments (p.o.)	Dose (mg/kg)	Damage Area (mm ²)	Gastroprotection %
<i>Ethanol-induced gastric lesions</i>			
Vehicle	10	104.3 $\pm$ 19.3	-
Lansoprazole	30	40.5 $\pm$ 5.9*	38.8
BB	12.5	99.9 $\pm$ 6.9	4.2
	25	56.7 $\pm$ 11.4	54.3
	50	56.4 $\pm$ 20.0	54.0
	100	4.1 $\pm$ 1.0**	96.0
<i>Indomethacin-induced gastric lesions</i>			
Vehicle (mL/kg)	10	29.9 $\pm$ 13.5	-
Cimetidine	100	0.9 $\pm$ 0.4**	96.9
BB	100	0.9 $\pm$ 0.1**	96.9

It is well known that indomethacin is used not only as an anti-inflammatory drug but also to induce an experimental ulcer model in rats (Polat et al., 2010), due to the fact that this compound inhibits the synthesis of cytoprotective prostaglandins, synthesized by COX-1 and COX-2 in the stomach tissue. Furthermore, it's also been shown that reactive oxygen species (ROS) play an important role in the pathogenesis of mucosal damages caused by indomethacin (Odabasoglu et al., 2006). Oral treatment with BB (100 mg/kg) reduced the indomethacin-induced gastric lesion by 95% (Table 2).

Ulcer healing, a genetically programmed repair process, includes inflammation, cell proliferation, reepithelialization, formation of granulation tissue, angiogenesis, interactions between various cells and the matrix and tissue remodeling, all resulting in scar formation, the capacity to accelerate the ulcer healing process depends on many factors, like the epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), trefoil peptides and COX-2 in a well synchronized spatial and temporal manner (Tarnawski, 2005). Regarding the COX-2 (Figure 1A) and EGF (Figure 1B) expression, Western Blotting analysis in the present study shows a great quantity of both in the gastric mucosa of animals treated with BB.

It has been shown that COX-2 induced in ulcerated gastric mucosa is involved in the defense and repairing mechanisms of the mucosa and that its inhibition by a selective COX-2 inhibitor delays ulcer healing, we have also shown, in human stomach, that COX-2 is exclusively expressed in gastric mesenchymal cells such as fibroblasts and in inflammatory cells of the ulcer bed and margins, suggesting that COX-2 expressed in mesenchymal cells at the ulcer margin plays a key role in the ulcer repair process (Miura et al., 2004).

Several authors associate the antiulcerogenic process with healing of chronic ulcers and participation of EGF. Growth factors and their receptors play important roles in cell proliferation and migration, repair of the tissue injury and ulcer healing, considering that EGF is effective at protecting the gastric mucosa from acetic acid-induced gastric lesions, it is reasonable to assume that this factor limits mucosal damage caused by ulcerogenic agents, probably aiding early mucosal restoration (Konturek et al., 1992). The increase in COX-2 (Figure 1A) and EGF (Figure 1B) expression in rats treated with BB may indicate a participation of this protein in restoring the gastric mucosa.

Acetic acid induces gastric ulcers by a perforative nature, spread over a large area that does not heal with time, the application of glacial acetic acid to the gastric serous membrane caused ulcer with

wall-encircled deep craters (Hiruma-Lima et al., 2006). Postoperative treatment with BB (100 mg/kg) for fourteen consecutive days demonstrated, for the first time, that BB accelerated ulcer healing. On the day 14 after surgery, the percentage of rats with cicatrized ulcers in both experimental groups was significantly higher than that of the control group. In addition, BB (100 mg/kg) significantly decreased the mean area of chronic ulcer (Figure 2).

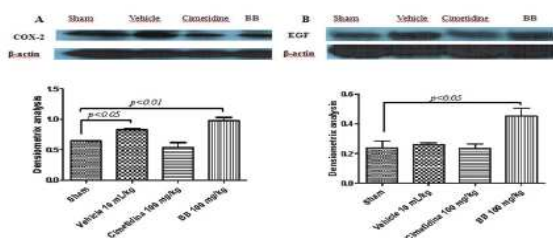


Figure 1. Representative Western blot analysis COX-2 (A) and EGF (B) proteins. Densitometric data were studied following normalization to the control (β -actin house-keeping gene). The results are representative of three experiments performed on different samples and data are expressed as mean $\pm$ SEM.

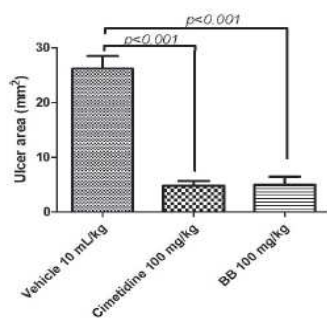


Figure 2. Effects of chronic administration of BB 100 mg/kg on ulcer healing in rats with chronic ulcer induced by 0.05 mL (v/v) of a 30% acetic acid solution. This dose significantly decreased the severity and extent of area damaged by acetic acid at fourteen days. Results were expressed as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and compared to vehicle.

On toxicological parameters, there were no significant differences in body weight development (data not shown) or organ weights (Figure 3) for all groups. No macroscopic abnormalities were detected in the examined organs. No mortality observed in any treatment group during the fourteen days of study.

Ligation of the pylorus model produces accumulation of gastric juice with gastric acid hypersecretion which generates the wound in the mucosa. The hypersecretion of gastric acid is one of the major pathogenic factors of gastric ulcer (Hiruma-Lima et

al., 2009; Tuorkey & Karolin, 2009). The gastric juice obtained from pylorus-ligated rats was used to analyze the gastric biochemical parameters by oral or intraduodenal BB administration. Administration of BB (100 mg/kg) by different routes (oral and intraduodenal) showed no significant difference in the assessed parameters of the gastric juice (data not shown). Thus, an antisecretory activity may not be involved in this protection.

Intracellular antioxidant, such as GR is critical for cellular protection in gastric tissues, GSH and GR have a prominent role in tissue repairing when reactive oxygen species (ROS) are involved, it was reported that, in humans, a reduction in gastric GR can occur following ethanol consumption and GR pretreatment could subside the gastric damage (Morais et al., 2010). It was also reported that an increase in GSH levels show a parallel to the adaptation phenomenon, the higher the GSH level, the less the damage occurred, GSH and other antioxidants prevented tissue damage by keeping ROS at physiological levels (Polat et al., 2010). The results indicated that GSH (Figure 4) and GR (Table 3) levels increased if compared to the control group, demonstrating a possible antioxidant capacity of BB.

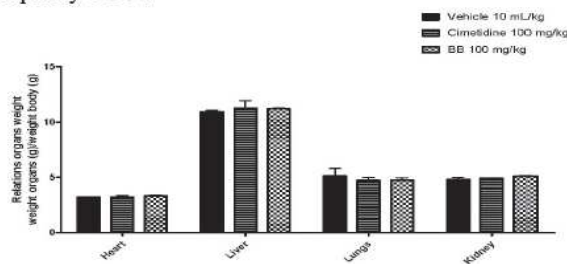


Figure 3. Organs weight in rats treated orally with vehicle, lansoprazole (30 mg/kg) or BB (100 mg/kg) for fourteen days after ulcer formation by acetic acid solution injected into the stomach.

MPO exists in polymorphnuclear leukocyte cells (PNL) and catalyses the formation of toxic hypochlorous acid (HOCl) from hydrogen peroxide, in addition, PNL excessively produce superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl radical ($OH^\cdot$), which are free oxygen radicals, excessive production of MPO and other reactive radicals cause oxidative damage; which is represented by measuring lipid peroxidation levels, an important reason for cell membrane damage; MDA is the final product of lipid peroxidation and is used to determine lipid peroxidation levels (Dursun et al., 2009). Gastric MPO (Figure 5) and MDA (Figure 6) were increased by indomethacin application and decreased by BB (100 mg/kg) administration, another indicator of a possible antioxidant activity of the oil, which still needs deeper studies for a complete understanding.

Ethanol may enhance the damage associated with the increased steady-state levels of ROS and could act by increasing the activity of SOD. Previous studies have shown SOD activity increased values in the ethanol treated group compared to control rats, suggesting that oxidative stress condition can increase the levels of O_2^- or induce the activity of the enzyme (Repetto et al., 2003). Some researchers reported that ethanol increases GPx activity (Suleyman et al., 2010). The BB maintained the same levels of SOD (Table 3) and GPx (Table 3) of the sham group, this effect suggests that BB could decrease the oxidative stress condition generated by ethanol.

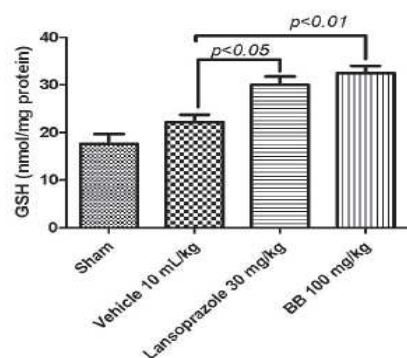


Figure 4. Sulfhydryl contents in the gastric mucosa of rats pretreated with BB (100 mg/kg) and submitted to absolute ethanol-induced ulcerative lesions. Results were expressed as mean±SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and compared to vehicle.

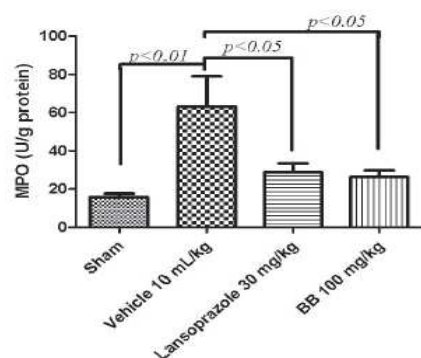


Figure 5. Effect of BB (100 mg/kg) on MPO activity in the gastric mucosa of rats submitted to ethanol. Results were expressed as mean±SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and compared to vehicle.

Conclusion

In conclusion, all these results taken, together, show, for the first time, that BB exerts gastroprotective activity, as evidenced by the significant inhibition of the

formation of ulcers induced by different models, these protection could be attributed to an increased COX-2 and EGF expression and to the antioxidant properties. This antioxidant activity could be influenced by the presence of monoterpenes in the chemical structure of BB. However, further studies are required to investigate the active compounds and elucidate the mechanisms involved in the effects.

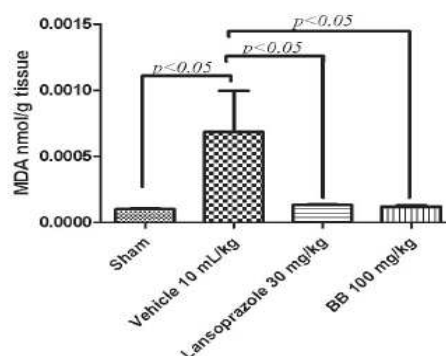


Figure 6. Effect of BB (100 mg/kg) on levels of MDA in ethanol-treated rats. Results were expressed as mean±SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and compared to vehicle.

Table 3. Effect of BB (100 mg/kg) on stomach antioxidants enzymes and the levels of MDA in ethanol-treated rats. Results were expressed as mean±SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and compared to vehicle. * $p < 0.05$.

Treatments	SOD (U/mg protein)	GPx (nmol/min/mg of protein)	GR (mmol/min/mg of protein)
Sham	1.9±0.2	1.8±0.3	0.9±0.1
Vehicle	3.4±0.5	3.1±0.3	0.9±0.1
Lansoprazole	2.2±0.1*	1.9±0.2*	1.5±0.1*
BB (100 mg/kg)	2.0±0.1*	1.8±0.2*	1.6±0.1*

References

- Abdel-Salam OM, Czimmer J, Debreceni A, Szolcsanyi J, Mozsik G 2001. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J Physiol Paris* 95: 105-127.
- Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol* 48: 1362-1370.
- Aragão GF, Carneiro LMV, Junior APF, Vieira LC, Bandeira PN, Lemos TL, Viana GS 2006. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacol Biochem Be* 85: 827-834.
- Barbastefano V, Cola M, Luiz-Ferreira A, Farias-Silva E, Hiruma-Lima CA, Rinaldo D, Vilegas W, Souza-Brito AR 2007.

- Vernonia polyanthes as a new source of antiulcer drugs. *Fitoterapia* 78: 545-551.
- Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK 2001. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species, protection by melatonin. *Curr Mol Med* 1: 501-513.
- Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK 2002. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration, protection by melatonin. *Indian J Exp Biol* 40: 693-705.
- Bhattacharjee M, Bhattacharjee S, Gupta A, Banerjee RK 2002. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H. pylori*-mediated and non-mediated gastric ulcer. *Free Radical Biol Med* 32: 731-743.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Carlberg I, Mannervik B 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113: 484-499.
- Cechinel-Filho V, Yunes RA 2001. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In Yunes RA, Calixto JB (eds.) *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos Editora Universitária.
- Dursun H, Bilici M, Albayrak F, Ozturk C, Saglam MB, Alp HH, Suleyman H 2009. Antiulcer activity of fluvoxamine in rats and its effect on oxidant and antioxidant parameters in stomach tissue. *BMC Gastroenterol* 20: 9-36.
- Faure P, Lafond JL 1995. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In *Analysis of free radicals in biological systems*. Boston: Verla.
- Franke A, Teyssen S, Singer MV 2005. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. *Dig Dis* 25: 204-213.
- Hiruma-Lima CA, Batista LM, de Almeida AB, de Pietro Magri L, dos Santos LC, Vilegas W, Souza Brito AR 2009. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). *J Ethnopharmacol* 122: 406-409.
- Hiruma-Lima CA, Calvo TR, Rodrigues CM, Andrade FD, Vilegas W, Brito AR 2005. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneafolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. *J Ethnopharmacol* 104: 215-224.
- Hiruma-Lima CA, Santos LC, Kushima H, Pellizzon CH, Silveira GG, Vasconcelos PCP 2005. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. *J Ethnopharmacol* 104: 207-214.
- Khan HA 2004. Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats. *J Pharmacol Toxicol* 49: 89-95.
- Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Dembinski A, Slomiany A, Slomiany BL 1992. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in protection and healing of gastric mucosal injury. *Scand J Gastroenterol* 27: 649-655.
- Laciar A, Ruiz ML, Flores RC, Saad JR A 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae). *Rev Argent Microbiol* 41: 226-231.
- Lehne RA 1998. *Pharmacology for Nursing Care*. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Luiz-Ferreira A, Almeida AC, Cola M, Barbastefano V, Almeida AB, Batista LM, Farias-Silva E, Pellizzon CH, Hiruma-Lima CA, Santos LC, Vilegas W, Brito AR 2003. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Molecules* 15: 7153-7166.
- Mayty P, Biswas K, Roy S, Barnergee RK, Bandyopadhyay U 2003. Smoking and pathogenesis of gastroduodenal ulcer-recent mechanistic update. *Mol Cell Biochem* 253: 329-338.
- Miura S, Tatsuguchi A, Wada K, Takeyama H, Shinji Y, Hiratsuka T, Futagami S, Miyake K, Gudis K, Mizokami Y, Matsuoka T, Sakamoto C 2004. Cyclooxygenase-2-regulated vascular endothelial growth factor release in gastric fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: 444-451.
- Moleiro FC, Andreo MA, Santos R de C, Moraes T de M, Rodrigues CM, Carli CB, Lopes FC, Pellizzon CH, Carlos IZ, Bauab TM, Vilegas W, Hiruma-Lima CA 2009. *Mouriri elliptica*: Validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. *J Ethnopharmacol* 123: 359-368.
- Morais TC, Pinto NB, Carvalho KM, Rios JB, Ricardo NM, Trevisan MT, Rao VS, Santos FA 2010. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chem Biol Interact* 183: 264-269.
- Morimoto Y, Oshima S, Hara H, Sukamoto T 1991. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jpn J Pharmacol* 57: 495-505.
- Mota KS, Dias GE, Pinto ME, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR, Hiruma-Lima CA, Barbosa-Filho JM, Batista LM 2009. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 14: 979-1012.
- Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 103: 59-65.
- Ohkawa H, Nobuko O, Yagi K 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochemical* 95: 351-358.
- Okabe S, Amagase K 2005. An overview of acetic acid ulcer models -the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biol Pharm Bull* 28: 1321-1341.
- Oliveira FA, Costa CL, Chaves MH, Almeida FR, Cavalcante IJ, Lima AF, Lima RC Jr, Silva RM, Campos AR, Santos FA, Rao VS 2005. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α and β amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sci* 77: 2942-2952.
- Polat B, Suleyman H, Alp HH 2010. Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. *Chem Biol Interact* 186: 82-89.
- Puscas I, Puscas C, Coltau M, Pasca R, Torres J, Márquez M, et al 1997. Comparative study of the safety and efficacy

- of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung* 47: 568-572.
- Rao CHV, Ojha SK, Radhakrishnan K, Govindarajan R, Rastogi S, Mehrotra S, Pushpangadan P 2004. Antiulcer activity of *Urtica salicifolia* rhizome extract. *J Ethnopharmacol* 91: 243-249.
- Repetto M, Maria A, Guzmán J, Giordano O, Llesuy S 2003. Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. *J Pharm Pharmacol* 55: 551-557.
- Schmeda-Hirschmann G, Yesilada E 2005. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *J Ethnopharmacol* 22: 61-66.
- Shay H, Komarov SA, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *J Gastroenterol* 5: 43-61.
- Singh P, Shukla R, Prakash B, Kumar A, Singh S, Mishra PK, Dubey NK 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem Toxicol* 48: 1734-1740.
- Souza-Brito ARM 1994. *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Campinas: Editora da Unicamp.
- Suleyman H, Albayrak A, Bilici M, Cadirci E, Halici Z 2010. Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. *Inflammation* 33: 224-234.
- Takagi K, Okabe S, Saziki R 1969. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *Jpn J Pharmacol* 19: 418-426.
- Tarnawski AS 2005. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 50: 24-33.
- Tuorkey M, Karolin K 2009. Antiulcer activity of curcumin on experimental gastric ulcer in rats and its effect on oxidative stress/antioxidant, IL6 and enzyme activities. *Biomed Environ Sci* 22: 488-495.
- Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Iinuma S, Ichikawa H, Yasuda M, Takahashi S, Kondo M 1993. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 34: 732-737.
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrel RW 1995. The stimulation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85: 337-341.

*Correspondence

Deborah A. O. Valim Araujo
Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas, 13084-971 Campinas-SP,
Brazil
abrto@unicamp.br
Tel.: +55 19 3521 6192
Fax: +55-19 3521 6184