

Débora Christian Fachim Nogueira

Atividade antiulcerogênica do óleo
essencial e da fração rica em
 α -bisabolol, obtidos de espécies do
gênero *Eremanthus*

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Débora Christian Fachim Nogueira.

Campinas, 10 de novembro de 2000.



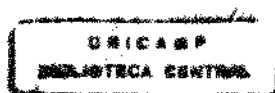
Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
- Orientador -

Atividade Antiulcerogência do óleo essencial e da fração rica em α -bisabolol, obtidos de espécies do gênero *Eremanthus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós - Graduação em
Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.

Orientação
Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
CPQBA / Unicamp

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE BC
 1ª CHAMADA:
UNICAMP
N689a
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 44032
 PROC. 16-392/01
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 29/04/01
 N.º CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP

CM-00154006-6

N689a Nogueira, Débora Christian Fachim
 Atividade antiulcerogênica do óleo essencial e da fração rica em
 alfa – bisabolol, obtidos de espécies do gênero *Eremanthus* / Débora
 Christian Fachim Nogueira. Campinas, SP : [s.n.], 2000.
 Orientador : João Ernesto de Carvalho
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.
 1. Cerrado. 2. Mucosa gástrica . 3. Prostaglandina. I. João
 Ernesto de Carvalho. II, Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Membros:

1. Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

2. Prof. Dr. Edson Antunes

3. Prof. Dr. Fernando de Oliveira

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

Data: 10/11/2000

”...Porque tudo que é nascido de Deus vence o Mundo...”
I João 5:4

Aos meus pais:

Luiz Carlos Aparecido Nogueira e Maria Dirce Fachim Nogueira

Quem espera que a vida seja feita de ilusão.

Pode até ficar maluco ou morrer na solidão

É preciso ter cuidado prá mais tarde não sofrer

É preciso saber viver!

Toda pedra no caminho você pode retirar

Uma flor que tem espinho você pode se arranhar

Se o bem e o mal existe você pode escolher

É preciso saber viver!

Obrigada por entenderem meus limites!

Aceitem minhas escolhas!

Apoiarem meus atos!

Fazer deste trabalho um sonho realizado!

Obrigada por tudo!

Por vocês existirem dentro do meu coração,

Por terem me permitido ser parte de vocês.

Pelo primeiro incentivo a ciência.

Este trabalho é dedicado a vocês.

Aos maninhos:
Luazinha (Luanda Yonara Fachim Nogueira)
e Mazão (Marcelo Marcel Fachim Nogueira)

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

O professor sempre afeta a eternidade, ele nunca sabe onde sua influência termina!

Harry Adams

É Joãozinho...

até que enfim conseguimos! Obrigada por tudo!

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Fernando de Oliveira, pela identificação botânica da espécie vegetal, e especialmente pelo incentivo, amizade a mim dedicado.

Ao Ms. Joaquim e ao Dr Nelson Friguetto pela oportunidade de trabalhar com o óleo essencial de candeias, bem como pelo acompanhamento químico.

A Bióloga Ana Possenti, pela colaboração indispensável na realização dos experimentos e pelo grande afeto com que sempre me tratou.

A Ms. Patrícia Corrêa Dias, contemporânea, amiga querida. Pela sua presença, pela sua colaboração na realização dos experimentos pela sua amizade que tanto estimo.

A Dra. Mary Ann Foglio, pela amizade conquistada e apoio a mim dedicado

A Ms. Patrícia Maria Ferreira, pela indispensável realização dos experimentos em Câmara de Ussing e pela amizade cultivada de maneira tão singular.

Ao Prof. Ms. Elson Costa Alves, pela acolhida no laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Goiás, bem como pelas orientações, ensinamentos, oportunidades, e acima de tudo a amizade a mim dedicada.

A Ms. Márcia Aparecida Antônio pelo ensinamento técnico, apoio certo nas horas incertas e pela amizade.

A Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes Araujo, pelo primeira orientação científica.

Ao Sandro Abel de Resende e Silva, a parte nova da minha família, pela amizade conquistada.

A Soraya Maria Ribeiro Vilella e Simone Donizete de Oliveira, amigas de fé...

Aos amigos Cáritas de Jesus Silva Mendonça, Erica Aparecida Bighetti, Cláudia Picolli, Carina Denny, Luciana Konecny Kohn, Mirtes Costa, Maria Susana Corrêa Alves da Cunha e Paulo Eduardo Pizão, Alik Teixeira Fernandes e Maria Carolina Bayeux Leme Oliveira pela agradável convivência do dia a dia

Aos colegas do CPQBA – Unicamp pela convivência tão agradável e pela amizade a mim dedicada.

Ao animal de laboratório, indispensável para realização dos experimentos.

A Direção, funcionários e professores da Faculdade de Farmácia da UFG, pela acolhida e amizade.

Aos professores e funcionários do departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, que de alguma forma colaboraram para obtenção deste título.

A Vanderley C. Claro e Gislaine E. Alípio, secretários do Curso de Pós Graduação de Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela atenção dispensada a mim e a todos os alunos deste departamento.

Ao CPQBA pelo oferecimento de sua infra-estrutura o que proporcionou a plena execução deste trabalho.

A Purita pelo fornecimento do óleo essencial de Candeias

A Capes pelo apoio financeiro.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

...Rio que sou em busca do mar que me apavora...

Vinícius de Moraes.

I. Índice

	Páginas
I. Lista de Tabelas	xv
II. Lista de Figuras	xvii
III. Lista de Abreviaturas	xxi
IV. Resumo	xxii
1. Introdução	1
2. Objetivos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1. Animais	12
3.2. Material Vegetal	12
3.2.1. Identificação das espécies	12
3.2.2. Obtenção do óleo essencial	13
3.2.3. Purificação do óleo essencial	13
3.2.3.1. Análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	14
3.3. Atividade Farmacológica geral	16
3.3.1. Efeitos gerais em camundongos e determinação da DL ₅₀	16
3.4. Avaliação da atividade antiulcerogênica do óleo essencial de candeias.	16
3.4.1. Úlcera induzida por indometacina	16

3.4.2. Úlcera induzida por etanol absoluto	18
3.4.3. Úlcera induzida por estresse	18
3.4.4. Úlcera induzida por reserpina	19
3.5. Avaliação do mecanismo de ação antiulcerogênico.	19
3.5.1. Preparação da mucosa gástrica de rã para incubação em câmara de Ussing	19
3.5.1.1. Preparo da solução de Ringer para anfíbios	20
3.5.2. Reversão de efeitos citoprotetores pela indometacina	21
3.5.3. Avaliação da participação de grupos SH não protéicos	22
3.5.4. Citoproteção em animais tratados com L-NAME	22
3.5.5. Dosagem de muco aderido à parede gástrica	23
3.6. Análise Estatística	24
4. Resultados	26
4.1. Avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de candeias	26
4.1.1. Administração em camundongos	26
4.2. Avaliação da atividade antiulcerogênica do óleo essencial de candeias.	27
4.2.1. Úlcera induzida por Indometacina	27
4.2.2. Úlcera Induzida por Etanol Absoluto	29
4.2.3. Úlcera Induzida por Imobilização e Frio (Estresse)	31



ÍNDICE

4.2.4. Úlcera Induzida por Reserpina	33
4.3. Atividade do α -bisabolol e dos terpenos, isolados do óleo essencial de candeias, em modelo de indução de úlcera	35
4.3.1. Úlcera induzida por Indometacina	35
4.3.2. Úlcera Induzida por Etanol Absoluto	37
4.3.3. Úlcera Induzida por Reserpina	41
4.4.1. Atividade antiulcerogênica do óleo essencial de candeias administrado por via parenteral.	43
4.4.2. Atividade do α -bisabolol sobre a secreção gástrica.	45
4.4.3. Reversão de efeitos citoprotetores pela indometacina	47
4.4.4. Atividade do óleo essencial de candeias e frações sobre grupos SH não protéicos na citoproteção.	49
4.4.5. Influência do óleo essencial de candeias e frações sobre a atividade do óxido nítrico.	51
4.4.6. Atividade do óleo essencial de candeias e da fração rica em alfa-bisabolol sobre a produção de muco aderido à parede gástrica.	53
5. Discussão	57
6. Conclusão	68
7. Summary	69
8. Referências bibliográficas	71

I. Lista de tabelas

Página

Tabela 01.	Efeito do óleo essencial de candeias e da cimetidina em modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos.	27
Tabela 02.	Efeito do óleo essencial de candeias e da carbenoxolona em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.	29
Tabela 03.	Efeito do óleo essencial de candeias e da carbenoxolona em úlcera induzida por imobilização e frio (estresse) em ratos.	31
Tabela 04.	Efeito do óleo essencial de candeias e da atropina em úlcera induzida por reserpina em ratos.	33
Tabela 05.	Efeito da fração terpênica, da fração rica em α -bisabolol e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	35

Tabela 06.	Efeito da fração de terpenos e α -bisabolol e da carbenoxolona em modelo de úlcera induzida por álcool.	37
Tabela 07.	Efeito do alfa-bisabolol administrado por via oral em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.	39
Tabela 08.	Efeito da fração terpênica e da fração rica em α -bisabolol, no modelo de úlcera induzida por reserpina.	41
Tabela 09.	Efeito do óleo essencial de candeias e da carbenoxolona, administrados por via parenteral (sc) em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto	43
Tabela 10.	Atividade da fração rica α - bisabolol na secreção ácida da mucosa gástrica de rã.	45
Tabela 11.	Efeito do óleo essencial de candeias e α -bisabolol, sobre o ILU no modelo de úlcera induzida por álcool + indometacina.	47

Tabela 12.	Atividade do óleo essencial de candeias e frações sobre os grupos SH não protéicos na citoproteção.	49
Tabela 13.	Efeito do óleo essencial de candeias, da fração de α -bisabolol e do nitroprussiato, em modelo de úlcera induzida por etanol em animais pré tratados com L-NAME.	51
Tabela 14.	Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com do óleo essencial de candeias e carbenoxolona.	53
Tabela 15.	Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com a fração rica em alfa-bisabolol com carbenoxolona.	55

II. Lista de Figuras

	Página
Figura 01. Efeito do óleo essencial de candeias, 1000 mg/kg, vo e da cimetidina 100 mg/kg, vo em úlcera induzida por indometacina.	28
Figura 02. Efeito do óleo essencial de candeias, 1000 mg/kg, vo e da carbenoxolona 200 mg/kg, vo em modelo úlcera induzida por etanol em ratos.	30
Figura 03. Efeito do óleo essencial de candeias, 1000mg/kg,vo e da carbenoxolona 200mg/kg, vo em modelo de úlcera induzida por imobilização e frio (estresse) em ratos.	32
Figura 04. Efeito do óleo essencial de candeias 1000 mg/kg, vo e da atropina 200 mg/kg,vo em modelo de úlcera induzida por reserpina em ratos.	34

Figura 05.	Efeito da fração de terpenos e α -bisabolol, em modelo de úlcera induzida por indometacina	36
Figura 06.	Efeito da fração de terpenos e α -bisabolol, em modelo de úlcera induzida por álcool	38
Figura 07.	Efeito da fração α -bisabolol, em modelo de úlcera induzida por álcool.	40
Figura 08.	Efeito da fração Terpenica, da fração rica em α -bisabolol e da atropina, em modelo de úlcera induzida por reserpina.	41
Figura 09.	Efeito do óleo essencial de candeias administrado por via parenteral (sc) em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.	44
Figura 10.	Atividade da fração α - bisabolol na secreção ácida da mucosa gástrica de rã.	46

Figura 11.	Efeito do óleo essencial de candeias e α -bisabolol, sobre o ILU no modelo de úlcera induzida por álcool em animais pré tratados com indometacina.	48
Figura 12.	Atividade do óleo essencial de candeias e frações sobre os grupos SH não protéicos na citoproteção.	50
Figura 13.	Efeito do óleo essencial de candeias e da fração de α -bisabolol, em modelo de úlcera induzida por etanol em animais pré tratados com L-NAME.	52
Figura 14.	Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com do óleo essencial de candeias e carbenoxolona.	54
Figura 15.	Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com α -bisabolol e com carbenoxolona.	56

III. Lista de Abreviaturas

H ₂	Receptor Histaminico
M	Receptor muscarinico (acetilcolina)
H ⁺ K ⁺ ATPase	Bomba hidrogênica
HCl	Ácido clorídrico
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
PGE1	Prostaglandina - 1
PGE2	Prostaglandina - 2
NO	Óxido Nítrico
CCK	Colecistocinina
CEMIB	Centro de Bioterismo da Unicamp
DL ₅₀	Dose letal 50%
vo	Via oral
ip	Via intraperitoneal
sc	Via subcutânea
L-NAME	Éster dimetílico de N(G)-nitro-L-arginina

IV. RESUMO

As espécies do gênero *Eremanthus*, são conhecidas popularmente como candeias e pau candeias e encontradas nas diversas áreas de cerrado. Seu óleo essencial é muito utilizado pela indústria de cosméticos, sendo produzido no Brasil e exportado para diversos países. Por ser utilizado como cicatrizante pelos trabalhadores envolvidos na sua produção, esse óleo foi selecionado para estudos de atividade antiulcerogênica. O trabalho teve início com o óleo essencial, fornecido pela Purita Óleos Essenciais Indústria e Comércio Ltda, obtido por arraste a vapor. O óleo foi então submetido aos modelos clássicos de indução de úlcera para verificação do seu possível potencial antiulcerogênico. Em todos os modelos testados, úlcera induzida por anti-inflamatório, etanol absoluto e imobilização e frio (estresse) o óleo essencial de candeias apresentou inibição das lesões ulcerativas indicando atividade antiulcerogênica. O óleo essencial de candeias foi então saponificado dando origem a duas frações, uma aquosa e outra orgânica. Após a acidificação a fração aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 originando a fração rica em ácido isso-valérico. A fração orgânica foi submetida a um processo de destilação fracionada dando origem as frações: α -bisabolol, terpenos, fração C7, C8 e resíduos, estas três últimas ricas em α -bisabolol e terpenos como revelou a cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas. Destas frações, duas (α -bisabolol e terpenos) foram selecionadas para avaliação da atividade antiulcerogênica. Os mesmos modelos para triagem da atividade antiulcerogênica

foram utilizados. Duas características eram necessárias para que as frações acima testadas continuassem a ser estudadas, que fossem ativas no modelo de triagem e ter quantidade suficiente. Das duas frações, a rica em α -bisabolol foi escolhida para a continuidade do trabalho. A fração rica em α -bisabolol apresentou efeito nos modelos de úlcera induzida por álcool, reserpina e úlcera induzida por indometacina. Tanto o óleo essencial bruto como a fração rica em α -bisabolol apresentaram atividade sistêmica, caracterizada no modelo de úlcera induzida por etanol. A atividade antissecretora foi estudada em mucosa de rã isolada em câmara de *Ussing* onde o óleo essencial bruto não apresentou atividade. Em animais pré-tratados com histamina a atividade antissecretora não foi observada. Tanto o óleo essencial bruto como fração rica em α -bisabolol foram avaliados em modelos que envolvem fatores de citoproteção, sendo que os resultados descartaram a participação de grupos sulfidrilas não protéicos, de óxido nítrico, e de prostaglandinas. Um aumento na produção de muco protetor aderido a parede gástrica foi observado. Os resultados sugerem que o α -bisabolol é o principal responsável pela atividade antiulcerogênica do óleo essencial de candeias e esta atividade pode estar relacionada com ligação aos receptores de prostaglandinas do tipo E1, ou semelhante a substâncias como sucralfato e subcitrato de bismuto coloidal.

1. Introdução

A mucosa gástrica é constituída de uma série de depressões e glândulas podendo ser dividida em quatro regiões anatômicas: cárdia, fundo, corpo e antro. Nas depressões estão as células epiteliais superficiais, enquanto que as glândulas localizadas no fundo e no corpo são compostas de células parietais e principais, as glândulas localizadas no antro são compostas de células G, responsáveis pela secreção de gastrina (Wingate, 1986).

As células parietais são responsáveis pela secreção de ácido clorídrico e fator intrínseco, as células principais pela secreção de bicarbonato e pepsinogênio, enquanto as células gástricas secretam muco protetor (Guyton and Hall, 1996). Desta forma o suco gástrico se constitui numa mistura de secreções parietais (ácido e fator intrínseco) e de secreções não parietais: muco, bicarbonato, Na^+ , K^+ e pepsinogênio. (Schubert, 1994).

No sistema nervoso central, a regulação destas secreções é realizada por fibras parassimpáticas vagais e, periféricamente, pela liberação de histamina das células enterocromafins, e de gastrina pelas células G do antro gástrico (Prinz et al., 1992). Estes secretagogos poderiam interagir entre si modulando a secreção ácida, existindo pelo menos dois mecanismos de interação entre os mesmos:

De acordo com uma das hipóteses, as células parietais possuem receptores para a histamina (H_2), acetilcolina (M) e gastrina. A estimulação dos receptores pela histamina provocaria aumento intracelular de AMPc, enquanto que a estimulação pela acetilcolina e gastrina aumentaria a concentração de cálcio. Esses mensageiros intracelulares agem sinergicamente, estimulando a produção e secreção de ácido. A segunda hipótese sugere que a membrana da célula parietal possuiria receptores somente para a histamina. Assim a acetilcolina, e a gastrina, através da interação com seus respectivos receptores, estimulariam a secreção gástrica através da liberação de histamina armazenada nos mastócitos ou nas células endócrinas. A histamina, por sua vez, estimularia os receptores H_2 nas células parietais produzindo o aumento do AMPc intracelular, que finalmente, ativaria a bomba $H^+ K^+ ATPase$ (Sandvik and Waldrum, 1991; Soll, 1983; Brunton, 1996). Esta bomba é uma ATPase de membrana que catalisa a troca de íons H^+ do meio intracelular por íons K^+ do extracelular (Schubert, 1990; Brunton, 1996).

Uma parte da estimulação nervosa responsável pela secreção gástrica tem origem nos núcleos motores dorsais do vago, no hipotálamo e no núcleo do trato solitário. Os sinais nervosos, originados nessas estruturas chegam, através do vago, até o sistema nervoso entérico que inerva as glândulas secretoras. A outra parte é gerada por reflexos locais que ocorrem no próprio sistema nervoso entérico (Surprenant, 1994; Schubert, 1994).

A secreção ácida excessiva tem sido responsabilizada por iniciar as lesões no tecido gástrico. No entanto a infecção por *Helicobacter pylori*, a hiperosmolaridade de alimentos, a ingestão de álcool e drogas antiinflamatórias podem ter um papel fundamental no desenvolvimento dessas lesões. Para manter a sua integridade a mucosa possui alguns mecanismos, denominados citoprotetores (Wallace, 1994; Allen 1993).

Um dos fatores envolvidos na citoproteção é a produção de muco e bicarbonato, que neutraliza o excesso de ácido e fornece uma barreira física que impede o contato do HCl com a mucosa. Na produção do muco e bicarbonato, a participação das prostaglandinas, da colecistocinina e do fluxo sanguíneo local, são fundamentais (Allen, 1993, Eberhart et al 1995). A secreção de bicarbonato, tanto em repouso como estimulada, é realizada pelas células do epitélio gástrico e duodenal, que neutralizam o HCl antes do mesmo entrar em contato com a mucosa (Smedfors & Johansson, 1986).

Estudos em cães, gatos, ratos, rãs e no homem mostraram que a presença de ácido no lúmen gástrico e no duodeno estimula a secreção alcalina. A secreção de bicarbonato em resposta à secreção de ácido é diminuída em humanos na presença de ulcerações gástricas e duodenais. O aumento da secreção de

bicarbonato, em resposta ao ácido, é mediado pela produção local de prostaglandinas, reflexos nervosos locais e fatores hormonais (Allen et al, 1993).

A secreção de bicarbonato pode ser inibida por varias substâncias como antagonistas muscarínicos, antiinflamatórios e provavelmente pela infecção por *H. pylori*. Alguns trabalhos afirmam que usuários crônicos de drogas antiinflamatórias não esteroidais, infectados com *H. pylori* têm quase o dobro de possibilidades de desenvolver úlcera de péptica hemorrágica quando comparado com usuários de drogas antiinflamatórias não esteroidais sem *H. pylori* (Aalykke et al, 1999, Hojgaard et al, 1996).

Pertencentes à família dos eicosanoides, as prostaglandinas são sintetizadas em resposta a estímulos fisiológicos para modulação ou manutenção da homeostase. Em processos inflamatórios crônicos as prostaglandinas são produzidas no local da inflamação mediando os sintomas como edema e dor (Aboim et al, 1987).

Duas enzimas, a ciclooxigenase 1 (COX-1) e a ciclooxigenase 2 (COX-2), são responsáveis pela produção das prostaglandinas, tendo como substrato o ácido araquidônico. Estando a COX-1 envolvida na formação de prostaglandina para eventos fisiológicos, como a manutenção da mucosa gástrica, a COX-2 é mobilizada em resposta a processos inflamatórios (Eberhart and Dubois, 1995; Elliott et al, 1995).

No estômago, a administração intravenosa de prostaglandina E1 (PGE1) ou prostaglandina E2 (PGE2) inibe a secreção de ácido clorídrico, a secreção de pepsina induzida por secretagogos e a liberação histamina (Eberthart et al, 1995). A inibição da cicloxigenase e consequentemente a inibição da síntese de prostaglandinas, provoca diminuição da produção de muco e de bicarbonato resultando na diminuição da secreção de muco e de bicarbonato, favorecendo o desenvolvimento das lesões ulcerosas. (Sababi et al, 1995).

Nos últimos anos diversos estudos têm demonstrado a participação do óxido nítrico (NO) nos processos que regulam a atividade gástrica, particularmente sobre a secreção de muco, fluxo sanguíneo e resistência da mucosa aos estímulos lesivos (Wallace & Chin, 1997). Seu efeito citoprotetor é consequência da vasodilatação, que aumentando o fluxo sanguíneo local, aumenta a velocidade de retirada do ácido em excesso e ainda aumenta o suporte de nutrientes para a mucosa (Konturek et al., 1995; Kato et al., 1998).

Na mucosa gástrica encontra-se uma concentração elevada de glutathione reduzida, o maior componente de substâncias sulfidrílicas não protéicas endógenas. Tióis como a glutathione reduzida, são capazes de ligar-se aos radicais livres, impedindo sua ação nociva sobre a mucosa gástrica (Szabo, 1981). Por sua atividade antioxidante a glutathione reduzida desempenha papel importante no mecanismo de citoproteção gástrica (Martin, et al., 1998).

A colecistocinina (CCK) e a gastrina são mediadores fisiológicos, liberados no estômago e parte proximal do intestino, que participam da secreção e esvaziamento gástricos. (Walsh, 1988; Konturek et al., 1995). Há evidências de que estes peptídeos também possuam ação sobre a manutenção da integridade da mucosa gástrica através da ligação com receptores específicos (CCK-A para a colecistocinina e CCK-B para a gastrina), possivelmente localizados em fibras vagais sensíveis à capsaicina. Em animais pré-tratados com CCK-8, pentagastrina e oleato de sódio (liberador da colecistocinina endógena) houve redução do índice de lesões gástricas produzidas pela administração oral de etanol. A associação de CCK-8 e pentagastrina diminuiu ainda mais o índice de lesões, sugerindo uma interação destas duas substâncias na citoproteção. Esses efeitos foram antagonizados pelo loxiglumide e L-365,260, que bloqueiam os receptores CCK-A e CCK-B, respectivamente (Konturek et al., 1995).

O efeito protetor desses peptídeos normalmente é acompanhado por um aumento na concentração luminal de somatostatina, que inibe a secreção ácida gástrica, suprime a geração de leucotrienos da mucosa gástrica e promove a liberação da substância P ou peptídeo vasoativo intestinal (Konturek et al., 1995).

Qualquer alteração nos mecanismos de citoproteção citados acima pode levar à gastrite, que poderá evoluir para lesões ulcerativas.

A história de uma doença pode ser conhecida através da evolução de sua terapêutica. Observando a evolução do tratamento da úlcera por este ponto de vista, podemos identificar três fases distintas: a primeira, em que predominava o tratamento clínico, com base no aspecto higieno – dietético; a segunda, com ênfase no tratamento cirúrgico, quando predominava os conceitos anatomopatológicos; e a terceira, com o retorno ao tratamento medicamentoso, com o desenvolvimento da fisiologia e da síntese de medicamentos (Cordeiro, 1999).

Antes da descoberta e caracterização dos receptores H_2 da histamina e a síntese de seus antagonistas seletivos (Black et al., 1972), os casos mais graves recebiam tratamento cirúrgico, enquanto os mais brandos eram tratados com antiácidos. Além dos anti-histaminicos as prostaglandinas começaram a ser utilizadas por seu efeito citoprotetor, inibindo a secreção ácida e estimulando a produção de muco e bicarbonato. O misoprostol, análogo da PGE_1 , foi o principal representante desse grupo de drogas (Monk and Clissold, 1987; Schubert and Shamburek, 1990).

Além dos antagonistas do receptor H_2 da histamina, a ativação dos receptores H_3 , presentes na mucosa, promove a redução da secreção gástrica ácida, embora os possíveis efeitos inespecíficos do agonista destes receptores, a metil-histamina, não estejam descartados (Lewin et al., 1992; Soldani et al., 1993)

Hoje a terapêutica conta com drogas como os inibidores da bomba hidrogênica ou H^+, K^+ ATPase, responsáveis pela secreção ácida. A droga padrão deste grupo é o omeprazol, que é capaz de inibir a secreção ácida por inativação dessa enzima, através de ligações dissulfeto (Sachs et al., 1988; Lindberg et al., 1987). Outra substância desenvolvida concomitantemente ao omeprazol foi a pirenzepina, um antagonista seletivo do receptor muscarínico M_1 , que também contribuiu na terapêutica da úlcera péptica (Texter and Reylly, 1982).

A infecção do trato gastroduodenal pelo *Helicobacter pylori*, inicialmente classificada como *Campylobacter pylori*, foi associada à gastrite e à doença ulcerosa péptica. A *Helicobacter pylori* adere às células epiteliais gástricas, ativa o fator nuclear κB (NF- κB) e estimula a produção de interleucina 8 (IL-8). Os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo, ainda, são desconhecidos (Masamune et al, 1999). O índice de recidiva da úlcera duodenal parece ser muito menor nos pacientes cuja infecção pelo *H. pylori* foi erradicada (Barbosa et al., 1988; Queiroz et al., 1988; Tytgat and Rauws, 1990). Assim, surgiram mudanças na conduta terapêutica, com a utilização de colóides ou compostos de bismuto e de quimioterápicos antimicrobianos, concomitantemente ao controle da secreção ácida (Talley and Ormand, 1989; Rang et al., 1995; Brunton, 1996).

Várias espécies vegetais demonstraram grande valor terapêutico no tratamento de males que acometem o trato gastrointestinal. A *Maytenus ilicifolia* Martius, popularmente conhecida como Espíneira Santa, é considerada popularmente eficiente no combate a hiperacidez e às ulcerações gástricas e duodenais (Ferreira, 1995). A *Vaccinium myrtillus* apresenta atividade antiulcerogênica em diferentes modelos de úlceras induzidas em ratos (Magistrelli et al., 1988). A *Artemisia annua*, com mecanismo de ação citoprotetor, através das protaglandinas (Dias e tal, 2000)

Outro exemplo de espécie vegetal estudada e com princípio ativo isolado é a *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz). A carbenoxolona, obtida a partir das raízes e rizomas dessa planta, é utilizada como droga padrão em diversos modelos experimentais, utilizados no estudo de drogas com atividade antiulcerogênica (Lewis & Hanson, 1991a, Lewis & Hanson, 1991b).

As espécies do gênero *Eremanthus*, são conhecidas popularmente como candeias e pau candeias e encontradas nas diversas áreas de cerrado. Seu óleo essencial é muito utilizado pela indústria de cosméticos, sendo produzido no Brasil e exportado para diversos países.

Garcia e colaboradores em 1975, relataram a presença de lactonas sesquiterpênicas (eremantina), isoladas da *Eremanthus elaeagnus*, com ação

profiláctica ao *Schistosoma mansoni*. Extratos de várias espécies da família das *Compositae* têm demonstrado ação anti – parasitária. Além da eremantina, a heliangolida e a guayazensolida foram isoladas do óleo extraído da madeira da *Eremanthus goyazensis* (Vichnewski, et al 1976). Vários autores relatam a existência de substâncias com ação anti – parasitária em espécies deste gênero. (Vichnewski, et al 1977; Herz e Kumar, 1980; Asakawa, et al 1981; Vichnewski, et al 1988 e Lunardello, et al 1995).

Além desta atividade a literatura nos descreve ação citotóxica com grande potencial antitumoral, provavelmente pela presença de triterpenoides, germacranolideos e alguns flavonoides (Quesne et al, 1977).

2. Objetivos

Popularmente utilizado como cicatrizante, pelos trabalhadores envolvidos na sua produção, esse óleo foi selecionado para estudos de atividade antiulcerogênica. O trabalho teve início com o óleo essencial, fornecido pela Purita Óleos Essenciais Indústria e Comércio Ltda. Este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antiulcerogênica desse óleo. Identificar as frações e princípios ativos e estudar o possível mecanismo de ação

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($19 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e ração (Nuvilab®) "ad libitum". Foram utilizados camundongos albinos swiss machos, com peso corporal variando entre 25 a 30 g e ratos Wistar machos, com peso corporal variando entre 200 a 250 g, aclimatados às condições do laboratório por 07 dias, sendo agrupados, ao acaso, em grupos de 10 animais, submetidos a jejum de 12, 24 ou 48 horas antes do início dos experimentos.

3.2. Material Vegetal

3.2.1. Identificação da espécie

As espécies do gênero *Eremanthus* estudadas neste trabalho foram identificadas pelo Prof. Dr. Fernando de Oliveira e suas exsicatas estão depositadas no herbário Frei Velloso da Universidade São Francisco em Bragança Paulista.

Espécie	Número da exsicata
<i>Eremanthus glomerulatus</i> Less.	VELL 00830; VELL 00831
<i>Eremanthus erythropappus</i> (Sch. Bip) Macleish Schumaker	VELL 00832; VELL 00833

3.2.2. Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial, fornecido pela Purita Óleos Essenciais Indústria e Comércio Ltda, foi obtido por arraste a vapor. Dessa forma, o caule foi colocado em uma dorna de destilação, onde seu óleo essencial foi extraído pelo vapor produzido pela caldeira. Após condensação desse vapor, o óleo essencial foi separado da água por diferença de densidade (fluxograma1).

3.2.3. Purificação do óleo essencial

O processo de purificação foi realizado pelo Dr. Nélson Frighetto, pesquisador da divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA-Unicamp

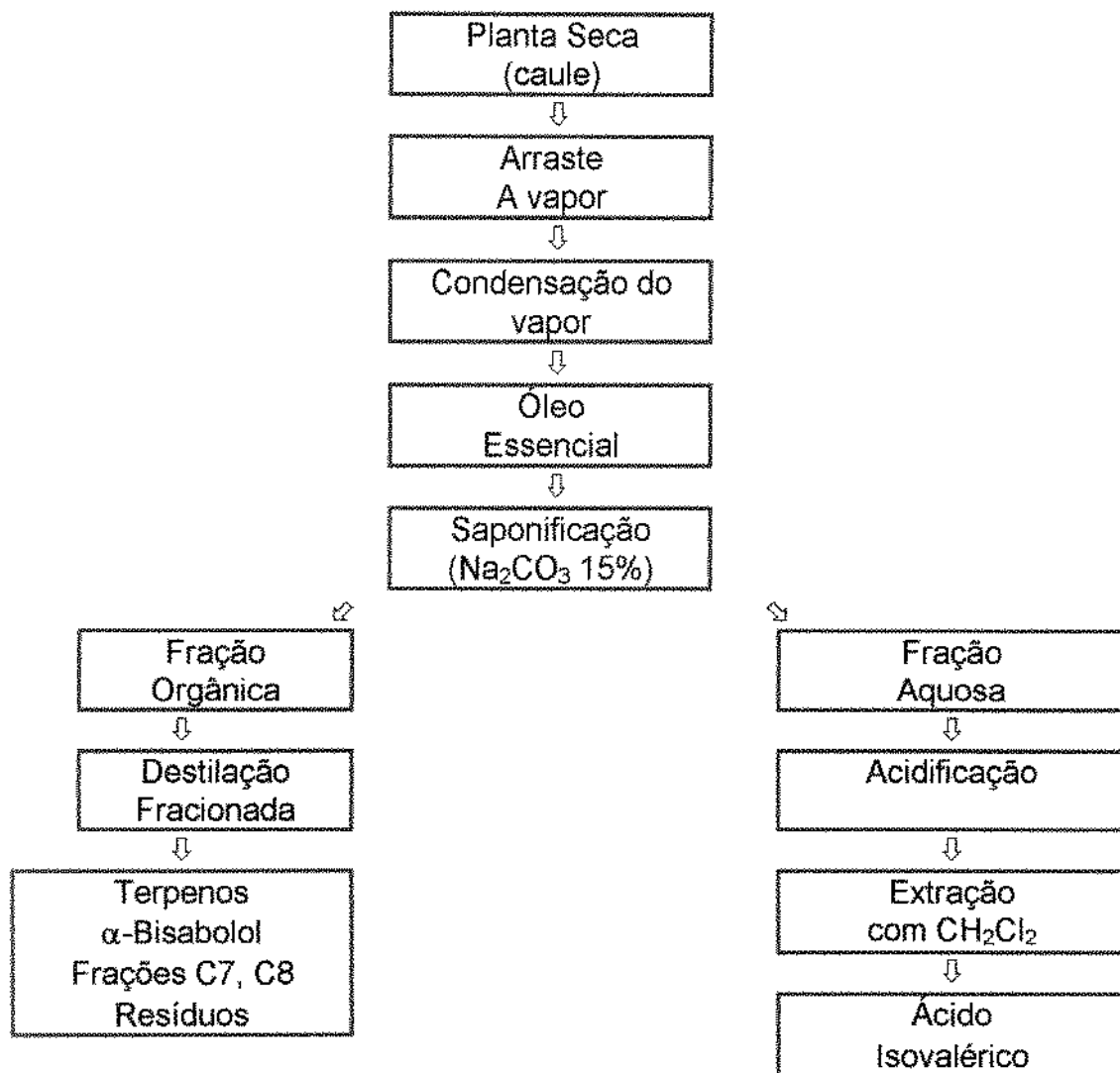
Para purificação, o óleo essencial foi saponificado com Na_2CO_3 15% dando origem a duas frações, uma aquosa e outra orgânica. Após acidificação, a fração aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 dando origem a uma fração rica em ácido isovalérico.

A fração orgânica foi submetida a um processo de destilação fracionada dando origem a três frações: C7, C8 e resíduos. A análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas revelou que as frações C7 e C8 eram compostas de terpenos e α -bisabolol. Dessa forma, através de uma nova destilação fracionada, a fração rica em terpenos (Ftp) foi separada daquela rica em α -bisabolol (fluxograma 1).

3.2.3.1 Análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

As frações e substâncias puras foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG Hewlett Packard 5890, série II, diretamente acoplado a um detector seletivo de massas Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna fundida WCOT, 30m x 0,25mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). Nas análises das amostras, foram coinjetadas n-alcanos de cadeia linear para o cálculo do índice de retenção de van den Dool & Kratz, 1967. As condições de análise foram as seguintes: temperatura de injeção: 250°C; temperatura do detector: 280°C; programa de temperatura 60 (2min)–3°C/min–240°C (10min); com ou sem razão de split 1:100 (dependendo da concentração da amostra); gás de arraste He 0,7 bar, 1ml/min; volume da amostra 1-2 µl.

Fluxograma 1



3.3. Atividade Farmacológica geral

3.3.1. Efeitos gerais em camundongos e determinação da DL₅₀

Foram utilizados camundongos albinos swiss, machos, com peso entre 20-30 g, submetidos a jejum de 24 horas com água *ad libitum* divididos em grupos de dez animais.

Um dos grupos foi tratado com o veículo no volume de 10 ml/kg (vo), os outros com a amostra a ser testada em doses crescentes pelas vias intraperitoneal e oral. Após a administração os animais foram analisados sobre: I-estado de consciência e disposição, II- atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, III- reflexos, IV- atividade do sistema nervoso central e V- atividade sobre o sistema nervoso autônomo nos tempo de 30, 60, 120 min, 24, 72h e 14 dias. Ao longo dos 14 dias o número de mortes foi anotado e a DL₅₀ calculada pelo método Litchifield e Wilcoxon.

3.4. Avaliação da atividade antiulcerogênica do óleo essencial de candeias.

3.4.1. Úlcera induzida por indometacina (Hayden et al., 1978)

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso entre 200-300 g, submetidos a jejum de 24 horas com água *ad libitum* divididos em grupos de sete animais.

Um dos grupos foi tratado com o veículo no volume de 10 ml/kg (vo), outro com cimetidina, 100 mg/kg (vo) e o terceiro com a amostra a ser testada, em dose previamente estabelecida (vo). Após 60 minutos do tratamento, cada animal recebeu uma injeção subcutânea de indometacina na dose de 30 mg/kg.

Após uma latência de 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura maior para a realização de análise e contagem das lesões ulcerativas, de acordo com o esquema a seguir (Gamberini et al, 1991):

Até 10 petéquias: 1 ponto.

Até 20 petéquias: 2 pontos.

Até 30 petéquias: 3 pontos.

Úlceras de até 1 mm: resultado da contagem multiplicado por dois.

Úlceras maiores que 1 mm: resultado da contagem multiplicado por três.

Hemorragia: 1 ponto.

Perda das pregas: 1 ponto.

Perda da coloração: 1 ponto.

O índice de lesões ulcerativas (ILU) de cada animal foi obtido através da soma dos parâmetros acima. Posteriormente, foi feita uma média destes índices para cada grupo experimental e calculada a porcentagem de inibição do aparecimento das lesões.

3.4.2. Úlcera induzida por etanol absoluto (Robert, 1979)

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com pesos entre 200-300g, submetidos a um período de jejum de 12 horas, com água *ad libitum*, divididos em grupos de sete animais. Um grupo foi tratado com carbenoxolona na dose de 200 mg/kg (vo), outro com o veículo (10 ml/kg, vo) e o terceiro com a amostra a ser testada, em dose previamente estabelecida (vo). Após trinta minutos, cada animal recebeu 1ml de etanol absoluto pela via oral ou parenteral (subcutânea)

Após 1 hora da indução de úlcera, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. As lesões ulcerativas foram contadas e classificadas de acordo com o esquema apresentado anteriormente.

3.4.3. Úlcera induzida por estresse (Levine, 1971)

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso entre 250-300 g, submetidos a jejum de 24 horas com água *ad libitum*, divididos em grupos de sete animais.

Um dos grupos foi tratado com carbenoxolona 200 mg/kg, (vo), outro com o veículo 10 ml/kg, (vo) e o terceiro com a amostra a ser testada, em dose previamente estabelecida (vo).

Após 30 minutos do tratamento, os animais foram imobilizados em contêntores especiais e mantidos em câmara fria a uma temperatura de 4° C por um período de duas horas.

Após esse período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. O ILU ou a extensão das lesões foram determinados como descrito anteriormente.

3.4.4. Úlcera induzida por reserpina (Gupta et al, 1974)

Após jejum de 24 horas, um grupo de ratos foi tratado com atropina na dose de 2 mg/Kg (vo), outro com o veículo utilizado para a dissolução da amostra 10 ml/kg (vo) e o terceiro com a amostra a ser testada, em dose previamente estabelecida (vo), 1 hora antes da administração intraperitoneal de reserpina na dose 5 mg/Kg.

Após 12 horas da indução, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram retirados e abertos no sentido da maior curvatura.

As lesões ulcerativas foram contadas e classificadas, recebendo um "escore" de acordo com sua área extensiva.

3.5. Avaliação do mecanismo de ação antiulcerogênico.

3.5.1. Preparação da mucosa gástrica de rã para incubação em câmara de *Ussing* (Villegas, 1968)

Foram utilizados *Rana castesbiana* adultas, submetidos a um período de jejum de 12 horas. Após a destruição do sistema nervoso central das rãs, o abdômen foi aberto, o estômago foi removido e a camada muscular é separada da mucosa por

divulsão. Após lavagem com solução de ringer, a mucosa foi aberta ao longo da pequena curvatura e colocada sobre um papel de filtro com 2,5 cm de diâmetro com o lado luminal voltado para cima, para evitar o seu rompimento durante o esvaziamento da câmara de *Ussing*. A mucosa é então adaptada à câmara, sendo o lado luminal preenchido com solução de Ringer sem tampão e o lado seroso com Ringer tamponado. A oxigenação é feita com oxigênio comercial. As substâncias a serem testadas foram adicionadas ao Ringer em contato com o lado luminal ou seroso. O pH do conteúdo gástrico foi monitorado em pHmêtro acoplado ao lado luminal da mucosa incubada na câmara de *Ussing*. O pH é constantemente ajustado para 6,5 (pH inicial) com NaOH 0,005N, ao longo de todo experimento. Os resultados foram expressos em microequivalente grama de H⁺ por grama de peso seco da mucosa e por período de incubação em minutos (uEq/g/min).

3.5.1.1. Preparo da solução de ringer para anfíbios

esta solução, utilizada para incubação das mucosas gástricas isoladas de rãs é obtida a partir da diluição adequada de duas soluções estoques A e B, previamente preparadas e mantidas a 4°C. Essas soluções estoque possuem a seguinte composição:

Solução A: NaCl 21,50g; KCl 2,38g; KH₂PO₄ 0,50g; CaCl₂ · 2 H₂O 0,56g; MgSO₄ · 7H₂O 1,16g e H₂O q.s.p. 1000ml.

Solução B: Na₂HPO₄ · 7H₂O 67,2g/l

Para o preparo de 250ml da solução B, 16,8 gramas de Na_2HPO_4 são dissolvidos em aproximadamente 200ml de água destilada e o pH ajustado para ,6 com NaOH 1N. Em seguida, o volume é completado para 250ml com água destilada.

A partir das soluções estoques A e B, a solução de Ringer de uso é preparada antes de cada experimento, conforme a seguinte ordem de adição:

Glicose 1g; Solução A 125ml; H_2O destilada 200ml; Solução B 25ml H_2O destilada q.s.p. 500ml. Não adicionar KH_2PO_4 e o NaHPO_4 não são adicionados à solução de Ringer a ser incubada com o lado luminal.

3.5.2. Reversão de efeitos citoprotetores pela indometacina

(Konturek et al., 1995)

Neste ensaio, são utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água. Após 30 minutos da administração intraperitoneal de indometacina (5 mg/kg), cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento, ou seja, controle 10ml/kg, carbenoxolona 200 mg/kg, e o terceiro com a amostra a ser testada, em dose previamente estabelecida (vo). Após 30 minutos, cada animal recebeu por via oral, 1 ml de etanol absoluto. Ao final de 1 hora, os animais são sacrificados por deslocamento cervical, tiveram seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0.9%, para posterior contagem e avaliação das lesões produzidas. O índice de lesões

ulcerativas foi então calculado através da metodologia proposta por Gamberini et al., 1991.

3.5.3. Avaliação da participação de grupos SH não protéicos

(Konturek et al., 1995)

Neste ensaio, são utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água. Cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento, controle (10ml/kg, vo), carbenoxolona (200 mg/kg, vo), e a amostra a ser testada, em dose previamente determinada. Depois de 30 minutos, foi administrado por via subcutânea para todos os grupos N-Etilmaleimide (10 mg/kg). Após 30 minutos, cada animal recebeu por via oral, 1 ml de etanol absoluto. Ao final de 1 hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tiveram seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0.9%, para posterior contagem e avaliação das lesões produzidas. O índice de lesões ulcerativas foi então calculado através da metodologia proposta por Gamberini et al., 1991.

3.5.4. Citoproteção em animais tratados com L-NAME (Konturek et al., 1995)

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com pesos entre 200-300g, submetidos a um período de jejum de 12 horas, com água *ad libitum*, divididos em grupos de sete

animais. Um grupo foi tratado com carbenoxolona na dose de 200 mg/kg (vo), outro com o veículo (10 ml/kg, vo) e o terceiro com a amostra a ser testada, em dose previamente estabelecida (vo). Após trinta minutos, cada animal recebeu 5mg/kg de L-NAME, pela via endovenosa. Decorridos mais trinta minutos todos os grupos foram tratados com 1ml de etanol absoluto (vo).

Após 1 hora da indução de úlcera, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. As lesões ulcerativas foram contadas e classificadas, recebendo um "score" de acordo com sua área extensiva.

3.5.5. Dosagem de muco aderido à parede gástrica (Rafatullah e tal., 1990)

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso entre 250-300 g, submetidos a jejum de 24 horas com água *ad libitum*, divididos em grupos de sete animais.

Um dos grupos foi tratado com carbenoxolona (200 mg/kg, vo), outro com o veículo (10 ml/kg, vo) e o terceiro com a amostra a ser testada, em dose previamente estabelecida.

Após 30 minutos do tratamento, os animais foram imobilizados em contensores especiais e mantidos em câmara fria a uma temperatura de 4° C por um período de quatro horas de acordo com a metodologia utilizada para indução de úlcera por estresse (Levine, 1971).

Após esse período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. A porção glandular foi separada, pesada e imersa por duas horas em 10 ml de solução de Alcian Blue (Alcian Blue 0,1% w/v em tampão sacarose 0,16mol/L + acetato de sódio 0,05mol/L com pH ajustado com HCl 0,1mol/L). O excesso de Alcian Blue foi removido, lavando-se o estômago por duas vezes sucessivas com 7 ml de sacarose 0,25 mol/l. A primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos.

O corante complexado ao muco aderido a parede gástrica foi extraído com 10 ml de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, agitando-se intermitentemente por um minuto a cada trinta minutos durante duas horas. A essa mistura, foi adicionado éter etílico e posteriormente, foi realizada a centrifugação a 3600 rpm por 10 minutos. O precipitado foi descartado.

As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de UV a 598 nm (Modelo Beekman DU70). Os resultados foram expressos em média $\pm$ epm. Os valores individuais interpolados na curva padrão foram expressos em μ g de Alcian Blue/ml/g de tecido.

A curva padrão de Alcian Blue foi obtida com soluções de 6,25; 12,5 25; 50; 100 ug/ml. (absorbância 598nm).

3.6. Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, com nível crítico igual ou menor a 0,05 para rejeição

da hipótese de nulidade. Na presença de significância no teste de ANOVA, procedeu-se à análise de contraste entre as médias aplicando-se o teste a *posteriori* de Duncan, com nível crítico igual ou menor a 0,05.

4. Resultados

4.1. Avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de candeias

4.1.1. Administração em camundongos

Quando administrado pela via intraperitoneal em camundongos o óleo essencial de candeias, nas doses de 0,5 a 4,0 g/kg, produziu hiperemia de extremidades, salivação, sudorese, piloereção, efeito *Straub*, perda do reflexo postural, aumento do tônus muscular do trem posterior e dificuldade respiratória. A intensidade desses efeitos foi proporcional às doses administradas com DL_{50} de 0,75 g. No entanto, quando administrado pela via oral em doses de até 4 g/kg, o óleo essencial de candeias não apresentou sinais de toxicidade.

4.2. Avaliação da atividade antiulcerogênica do óleo essencial de candeias.

4.2.1. Úlcera induzida por Indometacina

No modelo de úlcera induzida por indometacina o óleo essencial de candeias na dose de 1000 mg/Kg (vo), reduziu em 71,4 % o índice de lesões ulcerativas (ILU) produzido pela injeção de indometacina (30 mg/kg, sc). A cimetidina (100 mg/kg, vo), utilizada como padrão, reduziu o ILU em 79,3%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 01 e na Tabela 01.

Tabela 01. Efeito do óleo essencial de candeias e da cimetidina em modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos.

Tratamento	n	Dose	ILU	Redução do
Via oral		(__Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	8	10 ml	$51,1 \pm 6,0$	
Cimetidina	7	100 mg	$10,6 \pm 3,7^*$	79,3
Candeias	8	1000 mg	$14,6 \pm 5,9^*$	71,4

ANOVA, $F_{(2,20)} = 17,8$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$

RESULTADOS

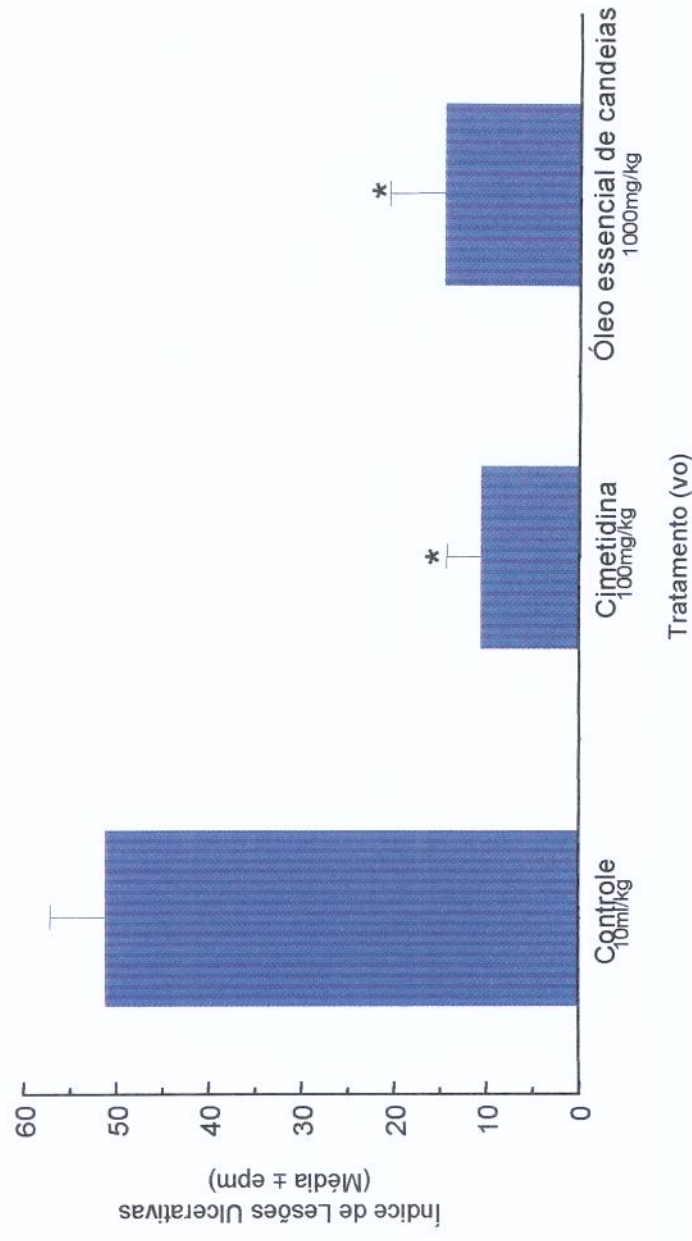


Figura 01. Efeito do óleo essencial de candeias, 1000 mg/kg, vo e da cimetidina 100 mg/kg, vo em úlcera induzida por indometacina. ANOVA, $F_{(2,20)} = 17,8$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $p < 0,01$

4.2.2. Úlcera Induzida por Etanol Absoluto

No modelo de úlcera induzida pela administração de 1,0 ml de etanol absoluto (vo), o óleo essencial de candeias na dose de 1000 mg/Kg (vo), reduziu o ILU em 82,5%. A carbenoxolona na dose de 200 mg/kg (vo), utilizada como padrão, reduziu o ILU em 74,9%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 02 e na Tabela 02.

Tabela 02. Efeito do óleo essencial de candeias e da carbenoxolona em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.

Tratamento	n	Dose	ILU	Redução do
Via oral		(__Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	8	10 ml	$34,3 \pm 4,2$	
Carbenoxolona	7	200 mg	$8,6 \pm 1,6^*$	74,9
Candeias	7	1000 mg	$6,0 \pm 0,9^*$	82,5

ANOVA, $F_{(2,19)} = 31,06$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$

RESULTADOS

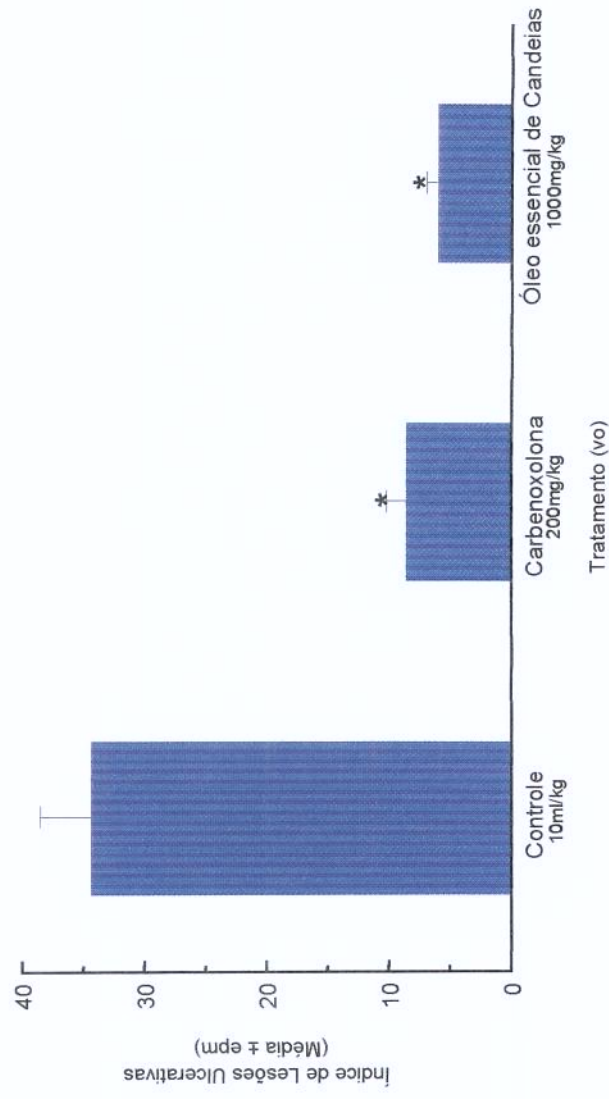


Figura 02. Efeito do óleo essencial de candeias, 1000 mg/kg, vo e da carbenoxolona 200 mg/kg, vo em modelo úlcera induzida por etanol em ratos. ANOVA, $F_{(2,19)} = 31,06$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$

4.2.3. Úlcera Induzida por Imobilização e Frio (Estresse)

No modelo de úlcera induzida por imobilização e frio (estresse), o óleo essencial de candeias na dose de 1000 mg/Kg (vo), reduziu o ILU em 72%. A carbenoxolona na dose de 200 mg/kg (vo), utilizada como padrão, reduziu o ILU em 52%. Os resultados, expressos como média $\pm$ padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 03 e na Tabela 03.

Tabela 03. Efeito do óleo essencial de candeias e da carbenoxolona em úlcera induzida por imobilização e frio (estresse) em ratos.

Tratamento	n	Dose	ILU	Redução do
Via oral		(__Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	7	10 ml	$24,4 \pm 2,1$	
Carbenoxolona	7	20 mg	$11,6 \pm 1,6^*$	52
Candeias	7	1000 mg	$6,6 \pm 1,0^*$	72

ANOVA, $F_{(2,18)} = 31,16$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$

RESULTADOS

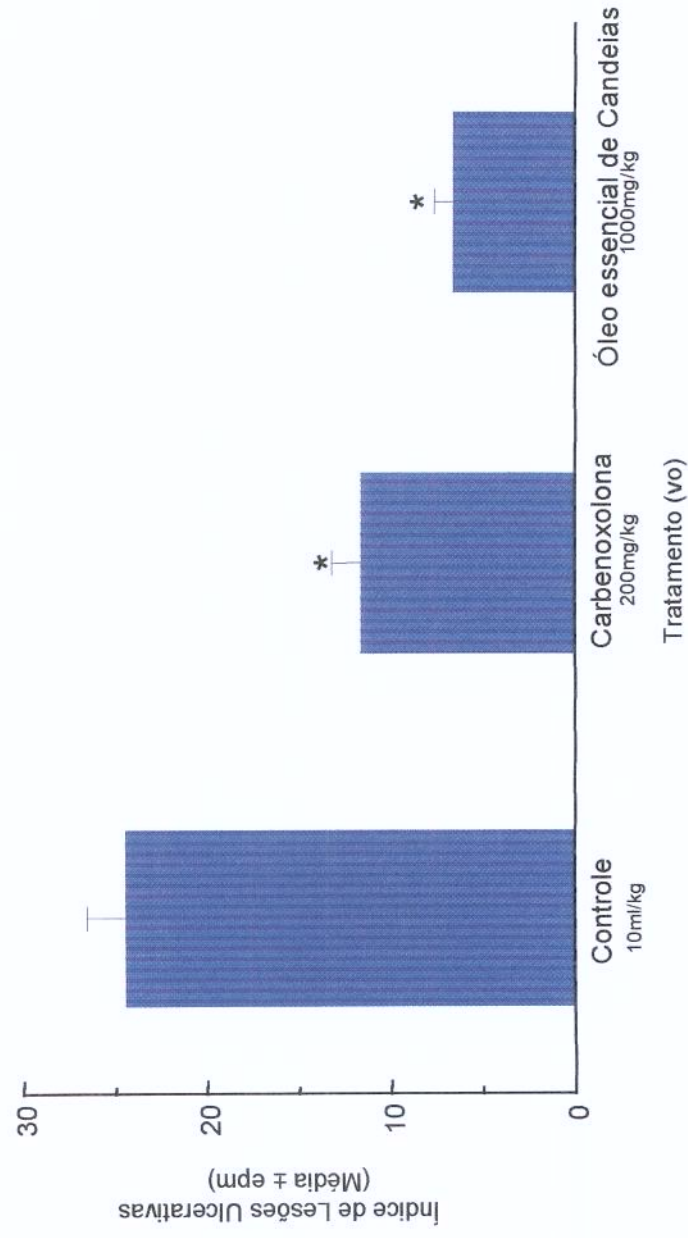


Figura 03. Efeito do óleo essencial de candeias, 1000mg/kg, vo e da carbenoxolona 200mg/kg, vo em modelo de úlcera induzida por imobilização e frio (estresse) em ratos. ANOVA, $F_{(2,18)} = 31,16$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$

4.2.4. Úlcera Induzida por Reserpina

No modelo de úlcera induzida pela reserpina (5 mg/kg, ip) o óleo essencial de candeias na dose de 1000 mg/kg (vo), reduziu o ILU em 45,6%. A atropina na dose de 2 mg/kg (vo), utilizada como padrão, reduziu o ILU em 46,3%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 04 e na Tabela 04.

Tabela 4. Efeito do óleo essencial de candeias e da atropina em úlcera induzida por reserpina em ratos.

Tratamento	n	Dose	ILU	Redução do
Subcutâneo		(__Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	6	10 ml	$30,5 \pm 4,8$	
Atropina	5	2 mg	$16,4 \pm 4,9^*$	45,6
Candeias	6	1000 mg	$16,6 \pm 2,5^*$	46,3

ANOVA, $F_{(2,14)} = 3,29$ $p < 0,05$ * $p < 0,05$

RESULTADOS

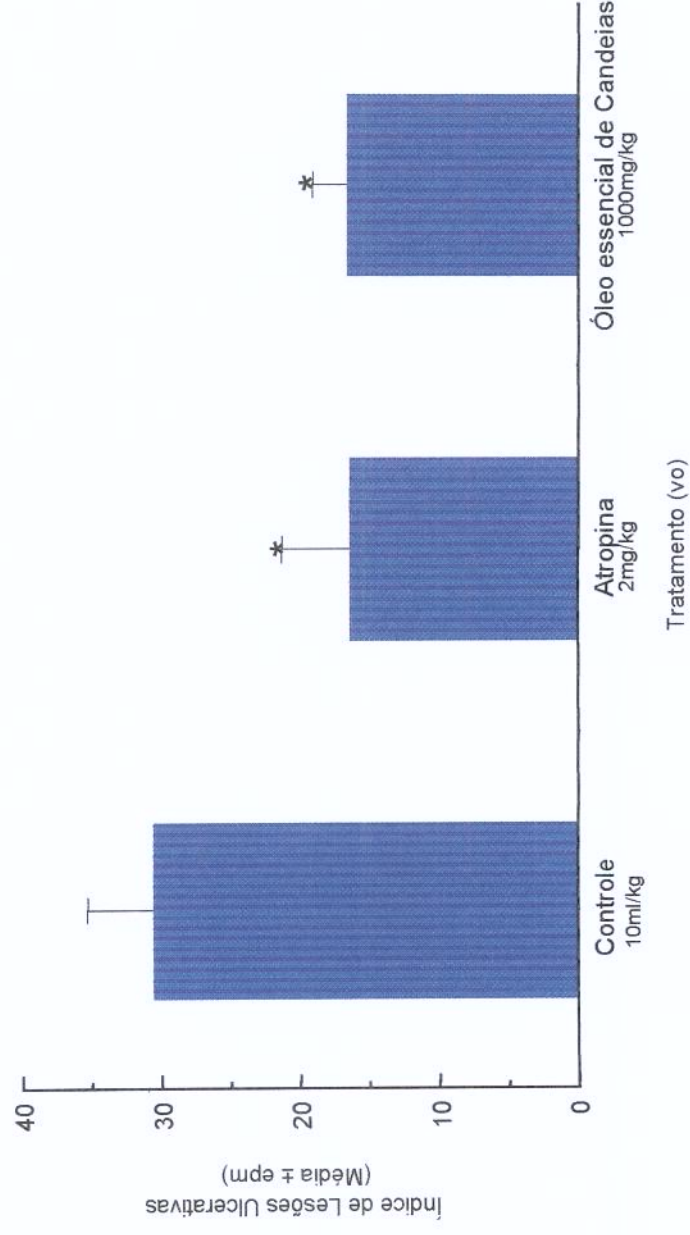


Figura 04. Efeito do óleo essencial de candeias 1000 mg/kg, vo e da atropina 200 mg/kg, vo em modelo de úlcera induzida por reserpina em ratos. ANOVA, $F_{(2,14)} = 3,29$ $p < 0,05$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$

4.3. Atividade do α -bisabolol e dos terpenos, isolados do óleo essencial de candeias, em modelos de indução de úlcera

4.3.1. Úlcera induzida por Indometacina

No modelo de úlcera induzida por indometacina, a fração rica em α -bisabolol na dose de 1000 mg/kg (vo), reduziu ILU em 90%. Já a fração terpênica na mesma dose, aumentou em 142% o ILU. A cimetidina, 100 mg/kg (vo), utilizada como padrão, reduziu o ILU em 92%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 05 e na Tabela 05.

Tabela 05. Efeito da fração terpênica, da fração rica em α -bisabolol e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina

Tratamento	n	Dose	ILU	
Via oral		(___Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU
Controle	7	10 ml	$49,8 \pm 5,9$	
Cimetidina	7	100 mg	$4 \pm 0,7^{**}$	Inibição 92%
Terpenos	7	1000 mg	$120,5 \pm 25,5^{**}$	Exacerbação 142%
α -bisabolol	7	1000 mg	$5,3 \pm 2,5^*$	Inibição 90%

ANOVA $F_{(3,24)} = 23,21$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $^*p < 0,01$ $^{**}0,001$

RESULTADOS

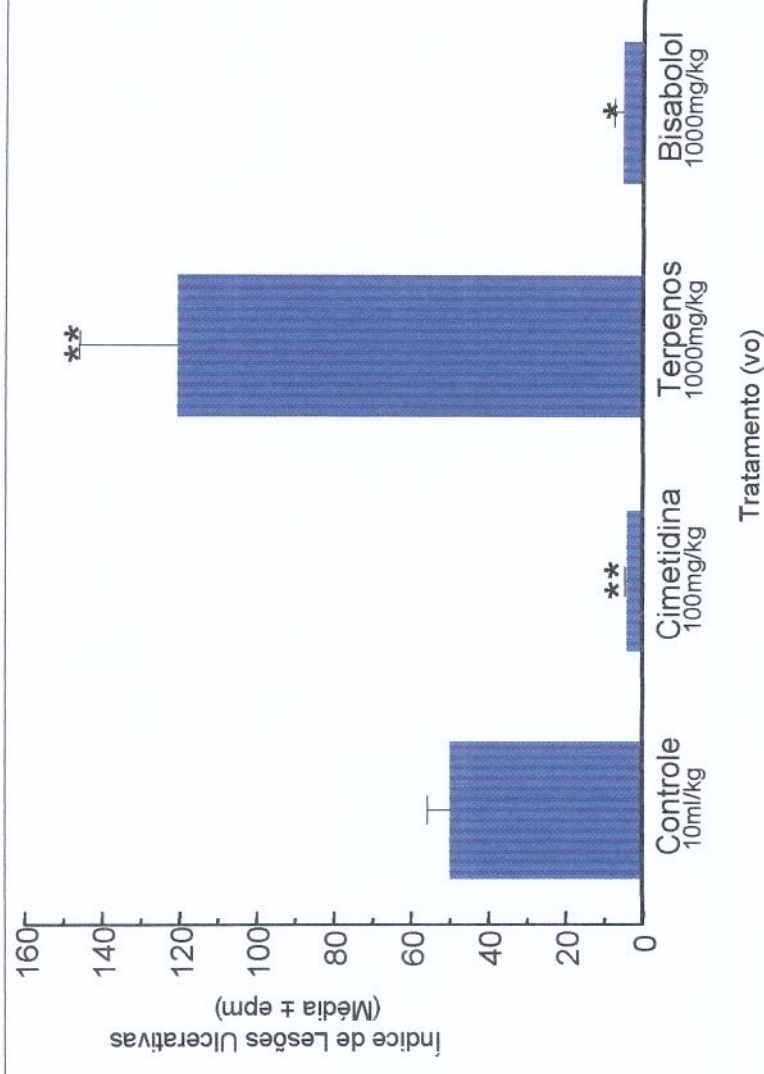


Figura 05. Efeito da fração terpênica, da fração rica em α -bisabolol e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina. ANOVA F (3,24) = 23,21 $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$

4.3.2. Úlcera Induzida por Etanol Absoluto

No modelo de úlcera induzida pela administração de 1,0 ml de etanol absoluto, a fração terpênica, (1000mg/kg, vo) reduziu o ILU em 90%. Já a fração rica em α -bisabolol, (1000 mg/kg, vo) reduziu o ILU em 80%. A carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, vo utilizada como padrão, reduziu o ILU em 86%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 06 e na Tabela 06.

Tabela 06. Efeito da fração de terpenos e α -bisabolol e da carbenoxolona em modelo de úlcera induzida por álcool.

Tratamento	n	Dose	ILU	Redução do
Via oral		(__Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	7	10 ml	$40,4 \pm 4,5$	
Carbenoxolona	7	200 mg	$5,6 \pm 0,9^*$	86
Terpenos	7	1000 mg	$4,1 \pm 0,9^*$	90
α -bisabolol	7	1000 mg	$8,1 \pm 3,7^*$	80

ANOVA $F_{(3,24)} = 36,42$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$

RESULTADOS

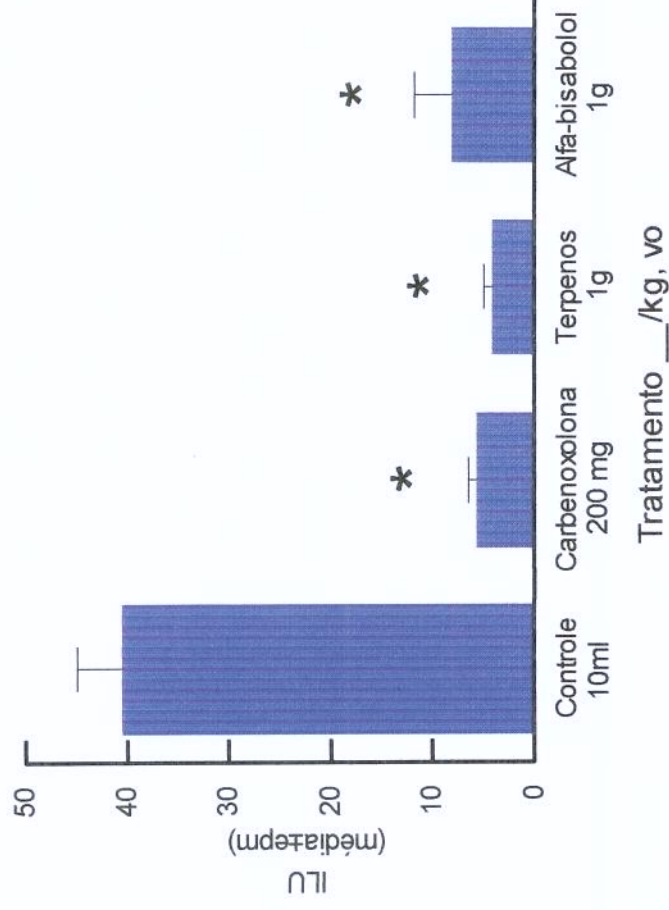


Figura 06. Efeito da fração de terpenos e α -bisabolol, em modelo de úlcera induzida por álcool. ANOVA F_(3,24) = 36,42 p < 0,001. Teste de Duncan * p < 0,001

No mesmo modelo de úlcera induzida pela administração de 1,0 ml de etanol absoluto, o α -bisabolol nas doses de 100; 50; 10mg/kg via oral, reduziu o ILU em 88; 73 e 52% respectivamente. (Figura 07). A carbenoxolona na dose de 200mg/kg (vo), utilizada como padrão, reduziu o ILU em 82%

Tabela 07. Efeito da fração rica em α -bisabolol, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

Tratamento	n	Dose	ILU	Inibição do
Via oral		(___Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	6	10 ml	$47,8 \pm 7,3$	
Carbenoxolona	5	200	$8,6 \pm 1,6^*$	82
α -bisabolol	5	10 mg	$22,5 \pm 6,6^*$	52
α -bisabolol	6	50mg	$12,8 \pm 3,6^*$	73
α -bisabolol	6	100 mg	$5,5 \pm 0,2^*$	88

ANOVA $F_{(4,23)} = 13,48$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$

RESULTADOS

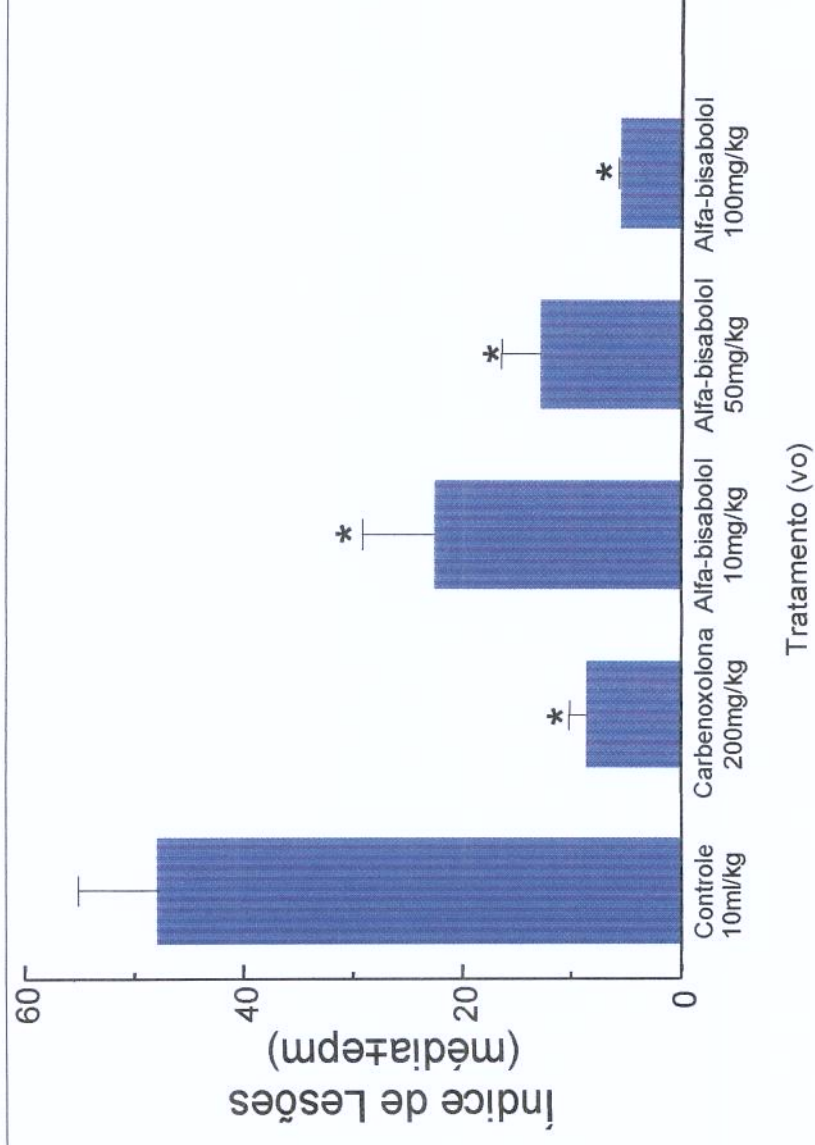


Figura 07. Efeito do α -bisabolol administrado por via oral em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto. ANOVA $F_{(4,23)} = 13,48$. Teste de Duncan * $p < 0,001$

4.3.3. Úlcera Induzida por Reserpina

No modelo de úlcera induzida pela reserpina (5 mg/kg, ip) a fração terpênica, (1000mg/kg, vo) reduziu o ILU em 70,8%. Já a fração de α -bisabolol, (1000 mg/kg, vo) reduziu o ILU em 55%. A atropina na dose de 2 mg/kg (vo), utilizada como padrão, reduziu o ILU em 62,6%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 08 e na Tabela 08.

Tabela 08. Efeito da fração terpênica e da fração rica em α -bisabolol, no modelo de úlcera induzida por reserpina.

Tratamento	n	Dose	ILU	Inibição do
Via oral		(__Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	7	10 ml	$25,7 \pm 4,3$	
Atropina	7	10 mg	$9,6 \pm 2,3^*$	62,6
Terpenos	6	1000 mg	$7,5 \pm 2,7^*$	70,8
α -bisabolol	6	1000 mg	$11,6 \pm 4,7^*$	55

ANOVA $F_{(3,22)} = 6.93$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$

RESULTADOS

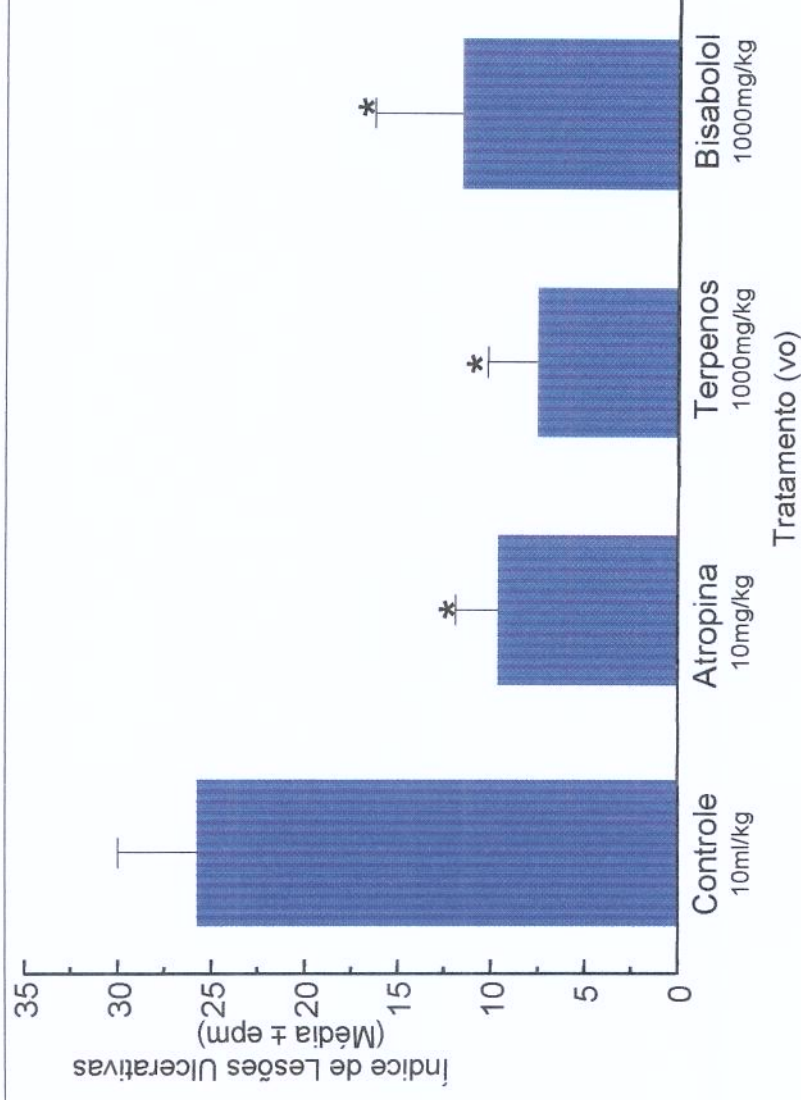


Figura 08. Efeito da fração Terpenica, da fração rica em α -bisabolol e da atropina, em modelo de úlcera induzida por reserpina.

ANOVA $F_{(3,22)} = 6,93$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,001$

4.4.1. Atividade antiulcerogênica do óleo essencial de candeias administrado por via parenteral.

No modelo de úlcera induzida pela administração de 1,0 ml de etanol absoluto, o óleo essencial de candeias nas doses de 1000, 500 e 250 mg/kg (sc), reduziu o ILU em 55, 52 e 52% respectivamente. A carbenoxolona, utilizada como padrão, reduziu o ILU em 55%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 09 e na Tabela 09.

Tabela 09. Efeito do óleo essencial de candeias e da carbenoxolona, administrados por via parenteral (sc) em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

Tratamento	n	Dose	ILU	Inibição do
Via oral		(__Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	8	10 ml	$43,8 \pm 4,8$	
Carbenoxolona	8	200 mg	$19,41 \pm 3,6^{**}$	55
OE Candeias	8	1000 mg	$19,4 \pm 2,27^*$	55
OE Candeias	8	500 mg	$20,8 \pm 4,5^*$	52
OE Candeias	8	250 mg	$20,5 \pm 3,7^{**}$	52

ANOVA, $F_{(4,35)} = 8,41$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $^{**} p < 0,001$ $^* p < 0,01$

RESULTADOS

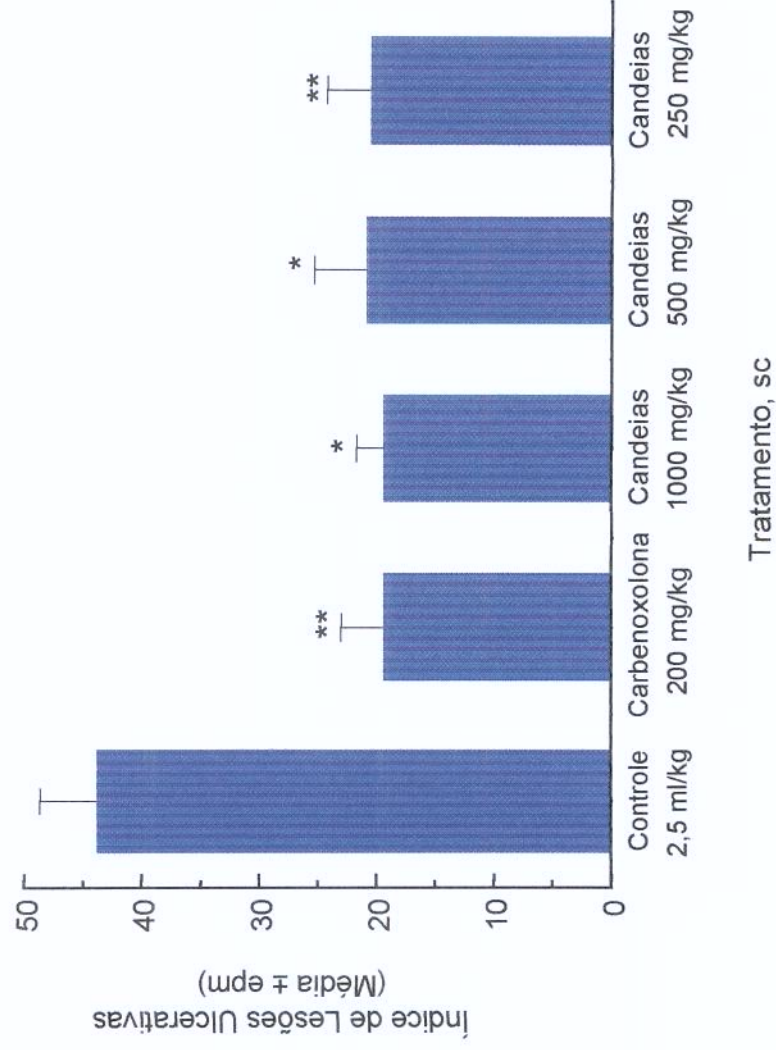


Figura 09. Efeito do óleo essencial de candeias administrado por via parenteral (sc) em modelo de úlcera induzida por etanol

absoluto. ANOVA, $F_{(4,35)} = 8,41$ $p < 0,001$. Teste de Duncan ** $p < 0,001$ 8 $p < 0,01$ p

4. 4.2. Atividade do α -bisabolol sobre a secreção ácida gástrica.

Em de secreção ácida utilizando a mucosa de rã em câmara de *Ussing* , a fração rica em α -bisabolol não alterou a quantidade de H⁺ secretado em todas as concentrações testadas. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média, estão demonstrados na Figura 10 e na Tabela 10

Tabela 10. Atividade da fração rica α - bisabolol na secreção ácida da mucosa gástrica de rã.

Tratamento	n	Concentração	H ⁺ secretado
Via oral		UL / 30 min	UEq / g / 15 min
Controle	6	Basal	8,6 $\pm$ 0,4
α -bisabolol	6	10	8 $\pm$ 0,9
α -bisabolol	6	20	8,2 $\pm$ 1,0
α -bisabolol	6	40	8,1 $\pm$ 0,9
α -bisabolol	6	80	7,6 $\pm$ 1,0
α -bisabolol	6	160	9,2 $\pm$ 0,5
α -bisabolol	6	320	9,4 $\pm$ 2

ANOVA F_(6,36) 0,3 p> 0,05

RESULTADOS

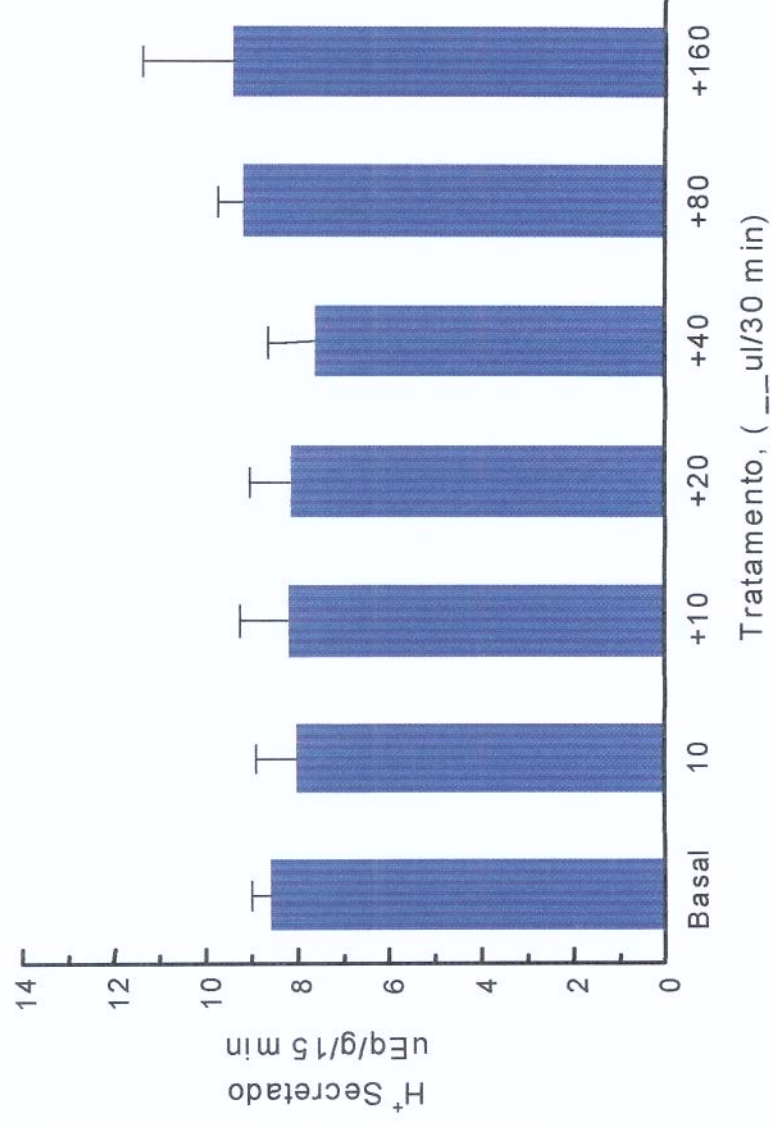


Figura 10. Atividade da fração α -bisabolol na secreção ácida da mucosa gástrica de rã. ANOVA, $F_{(6,28)} = 0,3$ $p > 0,05$

4.4.3. Reversão de efeitos citoprotetores pela indometacina.

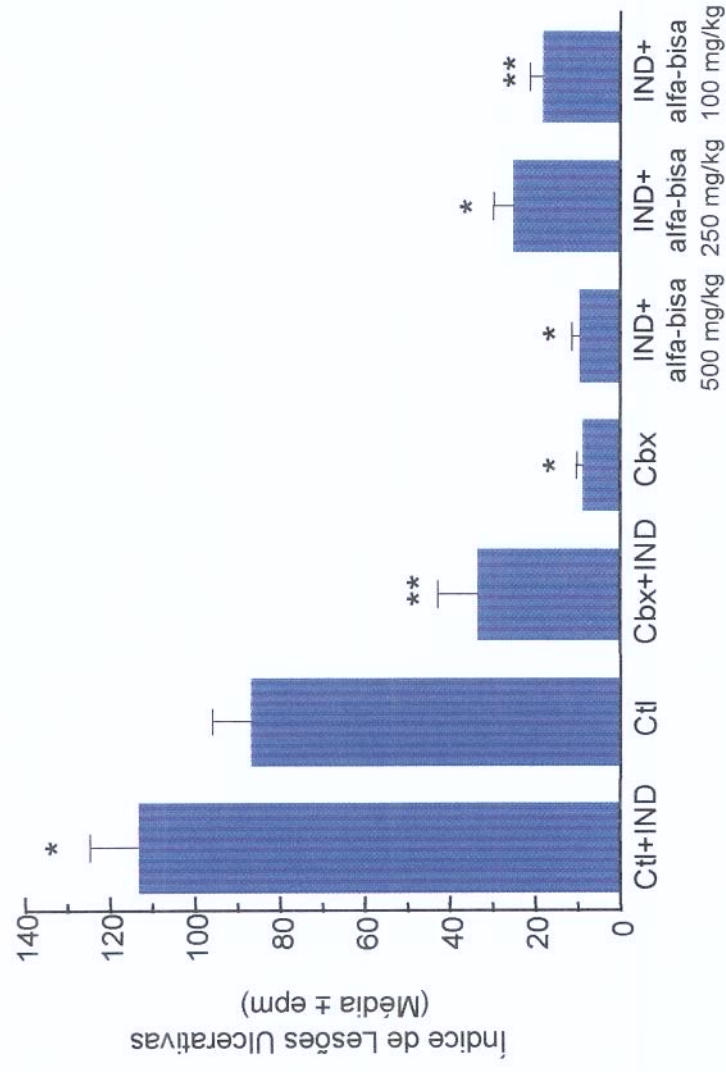
Em modelo de úlcera induzida por etanol em animais pré tratados com indometacina 5 mg/kg, ip a fração de α -bisabolol nas doses de 500, 250 e 100 mg/kg manteve a atividade antiulcerogênica, inibindo o ILU em 89, 72 e 79% respectivamente. A carbenoxolona (200 mg/kg, vo) reduziu o ILU em 61%. Em animais tratados com carbenoxolona sem administração prévia de indometacina a redução do ILU foi de 90%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 10 e na Tabela 11.

Tabela 11. Efeito do óleo essencial de candeias e α -bisabolol, sobre o ILU no modelo de úlcera induzida por álcool + indometacina.

Tratamento Via oral	n	Dose (__Kg)	ILU $\bar{x} \pm \text{epm}$	ILU %
Controle	6	10 ml	86,6 $\pm$ 9,3	100
IND + Controle	6	10 ml	113,1 $\pm$ 11,7*	130
Carbenoxolona	6	200 mg	8,6 $\pm$ 1,6*	10
IND + Carbenoxolona	5	200 mg	33,4 $\pm$ 9,4**	39
IND + α -bisabolol	6	500	9,5 $\pm$ 1,9*	11
IND + α -bisabolol	5	250	25 $\pm$ 4,8*	28
IND + α -bisabolol	5	100	17,8 $\pm$ 3,2**	21

ANOVA, F (6,33) = 39,48 p < 0,001 Teste de Duncan ** p < 0,001 * p < 0,01

RESULTADOS



Tratamento, vo

Figura 11. Efeito da fração α -bisabolol, sobre o ILU no modelo de úlcera induzida por etanol em animais pré – tratados com indometacina. ANOVA, $F_{(6,33)} = 39,48$ $p < 0,001$. Teste de Duncan ** $p < 0,001$ * $p < 0,01$

4.4.4. Atividade do óleo essencial de candeias e frações sobre os grupos SH não protéicos na citoproteção.

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de NEM (10 mg/kg, ip), o óleo essencial, a fração terpênica e a fração rica em α -bisabolol (100 mg/kg, vo) mantiveram a atividade antiulcerogênica reduzindo o ILU em 67, 51, 82% respectivamente. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 12 e Tabela 12.

Tabela 12. Atividade do óleo essencial de candeias e frações sobre os grupos SH não protéicos na citoproteção.

Tratamento	n	Dose	ILU	Inibição do
Via oral		(___Kg)	$x \pm \text{epm}$	ILU (%)
Controle	6	10 ml	$119,8 \pm 21,2$	
OE de candeias	6	100 mg	$38,5 \pm 11,7^{**}$	67
Terpenos	6	100 mg	$61,8 \pm 11,8^*$	51
α -bisabolol	6	100 mg	$20,7 \pm 3,3^{**}$	82

ANOVA $F_{(3,20)} = 12,36$ $p < 0,001$ Teste de Duncan $^{**}p < 0,001$ $^*p < 0,01$

RESULTADOS

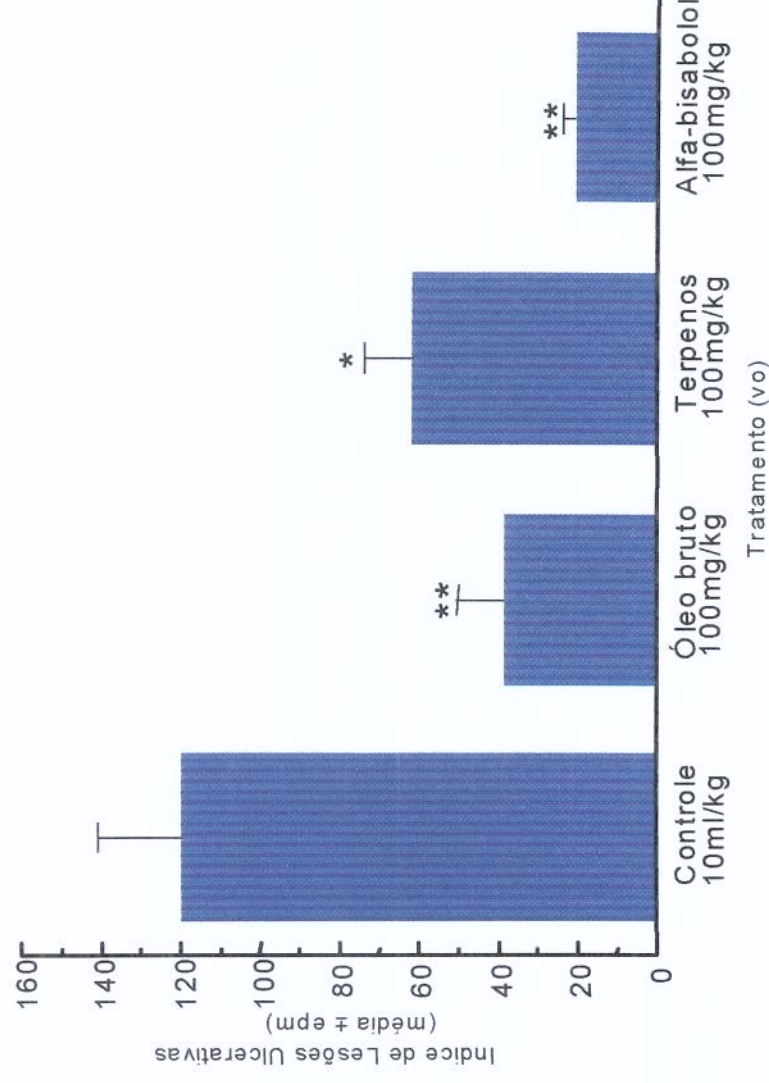


Figura 12. Atividade do óleo essencial de candeias e frações sobre os grupos SH não protéicos na citoproteção. ANOVA, $F_{(3,20)}$
 $= 12,36$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$

4.4.5. Influência do óleo essencial de candeias e frações sobre a atividade do óxido nítrico

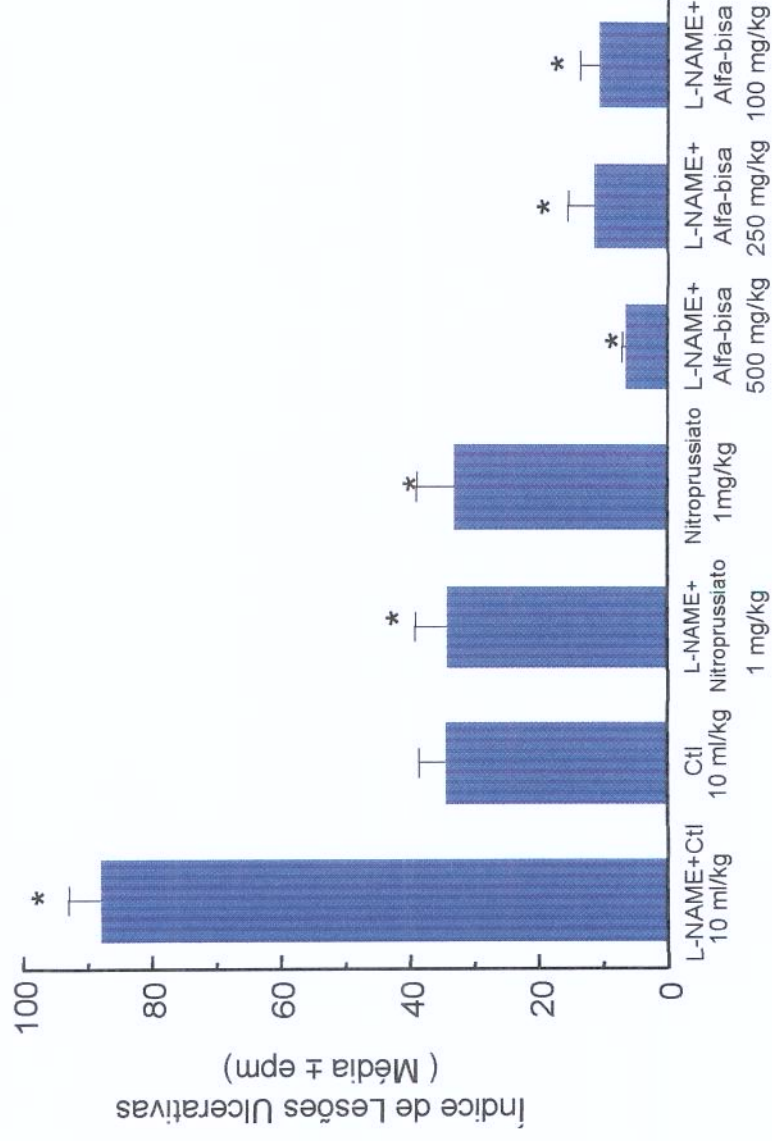
No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, em animais pré tratados com L-NAME (5mg/kg, ip) a fração de α -bisabolol 1000, 500 e 250 mg/kg reduziu o ILU em 95, 90 e 90% respectivamente. O nitroprussiato 1 mg/kg, reduziu o ILU em 60% tanto em animais pré tratados com L-NAME quanto em animais que não receberam o tratamento com L-NAME. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 13 e Tabela 13

Tabela 13. Efeito do óleo essencial de candeias, da fração de α -bisabolol e do nitroprussiato, em modelo de úlcera induzida por etanol em animais pré tratados com L-NAME.

Tratamento	N	Dose	ILU	ILU
Via oral		(__Kg)	$x \pm \text{epm}$	%
Controle	6	10 ml	$34,3 \pm 4$	100
Controle+L-NAME	5	10 ml	$87,8 \pm 5$	155
Nitroprussiato	6	1 mg	$33 \pm 5,8^*$	40
Nitroprussiato+ L-NAME	6	1 mg	$34 \pm 5^*$	40
α -bisabolol+ L-NAME	6	500 mg	$6,5 \pm 0,5^*$	5
α -bisabolol+ L-NAME	6	250 mg	$11,3 \pm 4^*$	10
α -bisabolol+ L-NAME	6	100 mg	$10,5 \pm 3^*$	10

ANOVA, $F_{(6,36)} = 33,2$ $p > 0,001$ Teste de Duncan * $p < 0,001$

RESULTADOS



Tratamento, vo

Figura 13. Efeito do óleo essencial de candeias e da fração de α -bisabolol, em modelo de úlcera induzida por etanol em animais pré tratados com L-NAME.

4.4.6. Atividade do óleo essencial de candeias e da fração rica em α -bisabolol sobre a produção de muco aderido à parede gástrica.

Em modelo para quantificação do muco aderido a parede gástrica (MAG), o óleo essencial de candeias (1000 mg/kg, vo) aumentou a quantidade de MAG em 93%. A carbenoxolona (200 mg/kg,vo), utilizada como padrão, aumentou o MAG em 41%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 14 e Tabela 14

Tabela 14. Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com do óleo essencial de candeias e carbenoxolona.

Tratamento	n	Dose	Concentração de muco	Inibição do
Intraduodenal		(__Kg)	g / tecido	ILU (%)
Controle	7	10ml	188,4 $\pm$ 32,1	
Carbenoxolona	7	200	267,3 $\pm$ 24,8*	41
OE Candeias	7	1g	365,0 $\pm$ 56.6*	93

ANOVA, $F_{(2,18)} = 4,2$ $p > 0,001$ Teste de Duncan: * $p > 0,01$

RESULTADOS

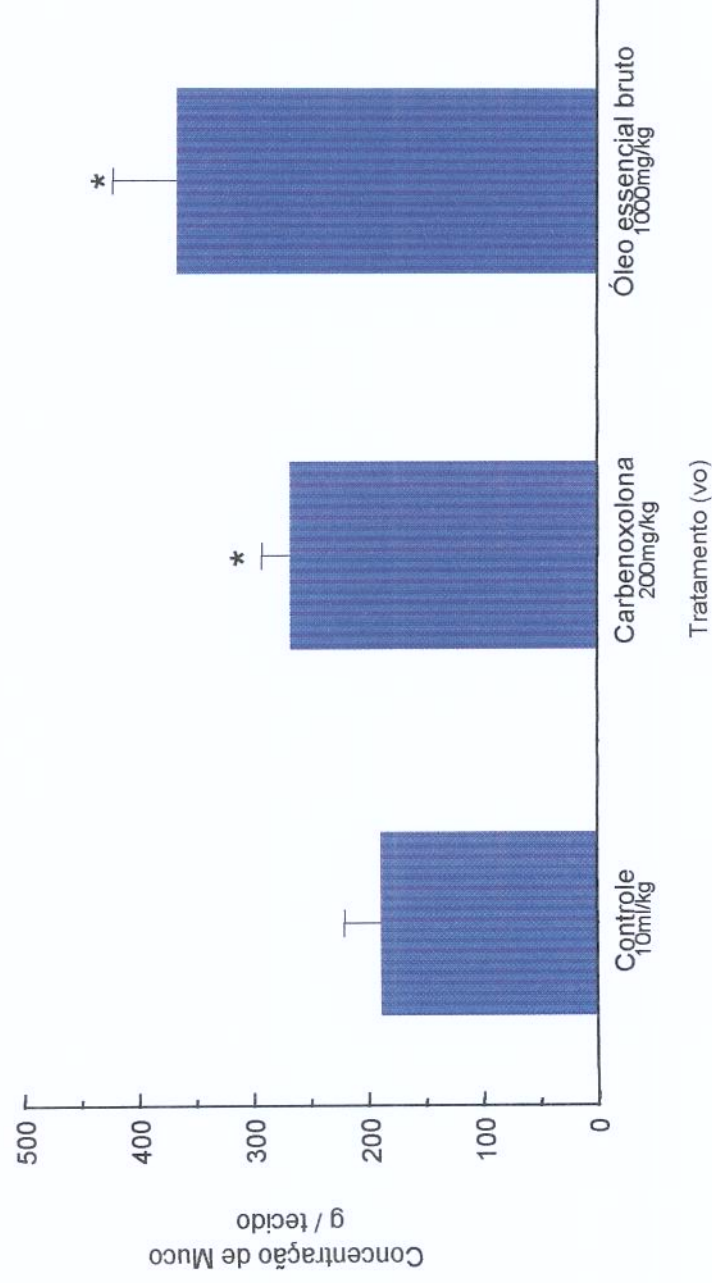


Figura 14. Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com do óleo essencial de candeias e carbenoxolona. ANOVA, $F_{(2,18)} = 4,2$ $p > 0,001$ Teste de Duncan: $*p > 0,01$

RESULTADOS

Em outro experimento a fração rica em α -bisabolol nas doses de 1000, 250 e 100 mg/kg, vo aumentou a quantidade de MAG em 82, 88 e 24% respectivamente. A carbenoxolona (200 mg/kg, vo) utilizada como padrão, aumentou o MAG em 57%. Os resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 15 e Tabela 15

Tabela 15. Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com a fração rica em α -bisabolol com carbenoxolona.

Tratamento	n	Dose	Concentração de muco	Inibição do
Intraduodenal		(___Kg)	g / tecido	ILU (%)
Controle	7	10 ml	370,0 $\pm$ 1,6	
Carbenoxolona	7	200 mg	581,8 $\pm$ 6,1*	57
α -bisabolol	6	1000mg	765,7 $\pm$ 5,9*	82
α -bisabolol	6	250mg	787,0 $\pm$ 5,7*	88
α -bisabolol	7	100 mg	459,0 $\pm$ 2,8*	24

ANOVA, $F_{(4,28)} = 7,2$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$

RESULTADOS

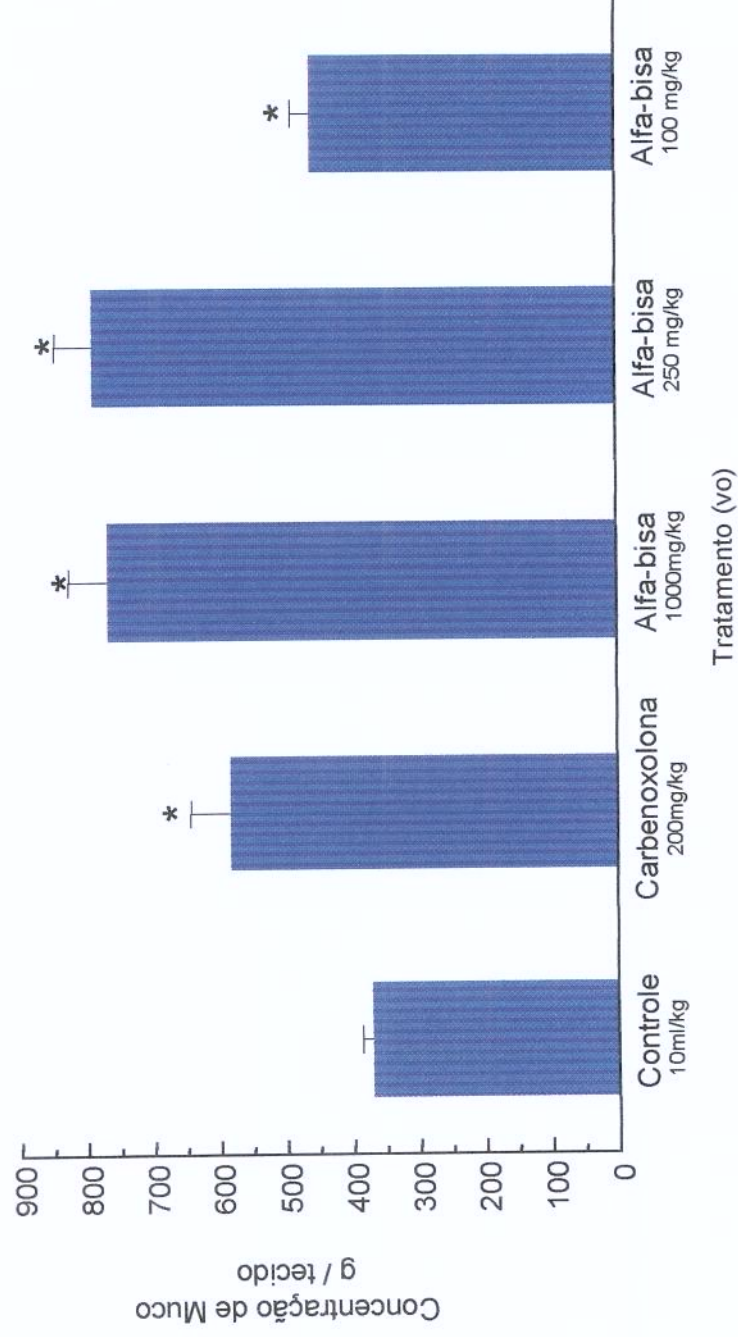


Figura 15. Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com α -bisabolol e com carbenoxolona. ANOVA,

$F_{(4,28)} = 7,2$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$

5. Discussão

A úlcera péptica geralmente é consequência de um desequilíbrio entre a produção de ácido clorídrico e os fatores responsáveis pela citoproteção da mucosa gástrica. Portanto, qualquer fator capaz de aumentar a velocidade de produção de suco gástrico e/ou bloquear os mecanismos protetores normais da mucosa gástrica podem causar lesões ulcerativas. No passado, a úlcera péptica era atribuída principalmente à ingestão de alimentos irritantes, porém, sabe-se atualmente que nenhum alimento é capaz de ser mais irritante para a mucosa gástrica do que o ácido clorídrico e a pepsina contidos no suco gástrico. Todavia, algumas substâncias freqüentemente ingeridas, como o etanol e antiinflamatórios não esteroidais podem provocar lesões graves da mucosa gástrica. (Guyton, 1996).

Nos diversos modelos experimentais utilizados para o estudo de drogas antiulcerogênicas em ratos, vários mecanismos podem estar associados à ulceração e outros a danos da mucosa gástrica (Parmar and Ghosh, 1981).

As lesões da mucosa gástrica do rato induzidas por etanol absoluto, são consequência de uma ação direta do mesmo. O contato desta substância com a

mucosa gástrica, causa necrose e alterações no epitélio, endotélio e células enterocromafins, resultando na liberação de mediadores vasoativos, como a histamina, com conseqüente vasodilatação e transudação do plasma. A dilatação das arteríolas e artérias promove hiperemia congestiva, edema e hemorragia (Oates and Hakkinen, 1988). Os resultados obtidos com o óleo essencial de candeias neste modelo, demonstraram redução das lesões induzidas por etanol absoluto. A carbenoxolona, droga de ação citoprotetora utilizada como padrão, inibiu a formação de úlceras neste modelo. Derivada do ácido glicirrético, a carbenoxolona exerce seus efeitos através da estimulação da síntese e secreção de muco pela mucosa gástrica (Brunton, 1996).

As lesões gástricas induzidas pelo etanol são pouco afetadas por agentes anti-secretores como a cimetidina (antagonista do receptor H_2 da histamina), mas sim, por agentes que intensificam os fatores de defesa da mucosa gástrica, assim como o misoprostol, um análogo da prostaglandina E_2 (Robert et al., 1979).

Várias evidências sugerem que a mucosa gástrica é capaz de sintetizar prostaglandinas através da ação da enzima cicloxigenase. A prostaglandina da série E (PGE_2) e a prostaciclina PGI_2 são potentes inibidores da secreção ácida do estômago. Além disto, estas substâncias possuem a capacidade de proteger a mucosa do trato gastrointestinal contra fatores que causam lesão celular e necrose, em doses inferiores àquelas necessárias para a inibição da secreção

ácida (Konturek and Pawlik, 1986). Esta ação tem sido denominada "citoproteção" sendo atribuída a pelo menos três fatores: aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, estabilização da membrana lisossômica e estimulação da produção de muco e bicarbonato (Aboim et al., 1987).

O ácido gástrico está envolvido na formação de lesões da mucosa induzidas por indometacina e outros antiinflamatórios não esteroidais. Essas drogas por inibirem a biossíntese de prostaglandinas reduzem a proteção da mucosa gástrica que fica exposta à ação do ácido clorídrico (Whittle, 1981; Yamamoto et al., 1984). O óleo essencial de candeias reduziu a formação das lesões ulcerativas induzidas por indometacina. Neste modelo, as drogas que atuam por mecanismos anti-secretórios, como a cimetidina e por mecanismos citoprotetores, como o misoprostol, apresentam atividade antiulcerogênica (Robert et al., 1979).

O aumento da secreção gástrica ácida pode ser considerado como um importante fator na úlcera induzida por estresse e é freqüentemente denominado "fator agressivo" (Goa and Monk, 1987).

No modelo experimental de estresse produzido por imobilização e frio, o óleo essencial de candeias, na dose de 1000 mg/kg, reduziu em 72% as lesões ulcerativas, quando comparado com o grupo controle.

A reserpina tem sido utilizada em modelos experimentais, devido à sua capacidade de promover a liberação de catecolaminas pelas terminações nervosas simpáticas, culminando na produção de lesões ulcerativas gástricas, simulando a úlcera por estresse. Além da atropina os bloqueadores dos receptores α -adrenérgicos, como a fentolamina, apresentam atividade antiulcerogênica, ao contrário daquelas que bloqueiam os receptores β -adrenérgicos (Gupta et al., 1974, Levine, 1971). Nesse modelo experimental o óleo de candeias na dose de 1000 mg/kg reduziu em 46% o índice de lesões. Resultado semelhante foi obtido pela atropina na dose de 2 mg/kg.

A análise desses resultados indicavam que a atividade antiulcerogênica poderia estar relacionada com a diminuição da secreção ácida ou ainda, com os mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica. No entanto esses efeitos, produzidos pela administração oral do óleo de candeias, poderiam ser consequência de uma ação local inespecífica, denominada citoproteção adaptativa, observada com substâncias que provocam irritação da mucosa gástrica e consequentemente estimulam a liberação de substâncias endógenas citoprotetoras (Robert et al. 1983).

Para averiguar essa possibilidade o óleo de candeias foi novamente avaliado no modelo de úlcera por etanol absoluto, mas administrado pela via subcutânea. Nessas condições, o óleo de candeias, nas doses de 250; 500 e 1000 mg/kg,

manteve a atividade antiulcerogênica eliminando um possível efeito local inespecífico.

Além da especificidade de ação o estabelecimento de uma relação dose-efeito desse óleo era importante para a determinação de uma dose média para ser utilizada nos estudos posteriores. Surpreendentemente o óleo essencial de candeias, no modelo de úlcera induzido por etanol reduziu as lesões ulcerativas em dose de até 50 mg/kg. Os resultados obtidos nesse experimento indicaram a dose de 100 mg/kg para ser utilizada nos estudos para determinar o mecanismo de ação desse óleo e de seus princípios ativos.

Com a caracterização dos efeitos do óleo de candeias, nestes diversos modelos experimentais, foi possível iniciar o processo de purificação desse óleo com o objetivo de identificar os princípios ativos responsáveis por essa atividade. A purificação, foi iniciada com a saponificação do óleo essencial que deu origem a duas frações, uma aquosa e outra orgânica. O tratamento da fração aquosa com diclorometano deu origem a uma fração rica em ácido isovalérico. Já a fração orgânica, foi submetida a uma destilação fracionada dando origem a duas frações (C7 e C8) e a um resíduo de destilação. Essas quatro frações foram testadas em modelos de úlcera induzida por etanol e indometacina.

No modelo de úlcera induzida por indometacina, as frações C7, C8, o resíduo de destilação e fração rica em ácido iso-valérico apresentaram inibição das lesões gástricas.

Até esse momento, os resultados obtidos com essas frações deixavam bem evidente que o processo de purificação não tinha separado os princípios ativos do óleo essencial. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, realizada pelo Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA, mostrou que as frações C7, C8 e o resíduo de destilação eram todos compostos por terpenos e α -bisabolol, justificando os resultados obtidos nos testes de atividade e por isso, uma nova destilação fracionada foi realizada. Essa destilação conseguiu separar a fração rica em terpenos daquela rica em α -bisabolol. A fração, rica em ácido iso-valérico foi descartada, por seu reconhecido potencial tóxico. As análises quantitativas dessas substâncias, realizadas pela Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA, revelaram que o óleo essencial de candeias possui 97% de α -bisabolol, 2% de terpenos e 1% de ácido isovalérico.

No modelo de úlcera induzida por indometacina, somente a fração rica em α -bisabolol produziu inibição das lesões ulcerativas. Já a fração rica em terpenos produziu aumento das lesões ulcerativas produzidas pela indometacina. No

entanto, no modelo de úlcera induzido pelo etanol, tanto a fração rica em terpenos com aquela rica em α -bisabolol reduziram as lesões ulcerativas.

Quando avaliadas no modelo de úlcera induzida por reserpina e no de estresse por imobilização e frio, tanto a fração rica em α -bisabolol como a fração terpênica reduziram o índice de ulceração.

Os resultados obtidos nesses modelos experimentais sugerem que os princípios ativos presentes nessas frações podem estar atuando através de mecanismos citoprotetores ou ainda, por mecanismos anti-secretórios, que diminuem a quantidade de ácido produzido. (Black et al., 1972; Monk and Clissold, 1987). A atividade da fração terpênica somente no modelo de úlcera por etanol sugere diferenças no mecanismo de ação entre as duas frações.

Após o fracionamento, o trabalho foi direcionado para a possível elucidação do mecanismo de ação do óleo essencial de candeias e da fração rica em α -bisabolol, obtida em maior quantidade. Já os estudos com a fração terpênica foram interrompidos por não haver quantidade suficiente.

Para avaliar a hipótese de uma atividade envolvendo os mecanismos de secreção ácida a fração rica em α -bisabolol foi avaliada em modelo experimental com a mucosa isolada do estômago de rã. Nesse modelo experimental a

histamina é o mediador final da secreção de H^+ em rãs, pois o aumento de sua liberação para o líquido seroso, em resposta a estimulantes da secreção gástrica, resulta em aumento da secreção de ácido (Rangachari, 1975). Nesse experimento ao contrário do observado com a histamina, a fração de α -bisabolol não alterou a secreção de H^+ quando adicionada ao lado seroso da mucosa.

Com a exclusão da atividade sobre os mecanismos de secreção ácida, a atividade do óleo essencial de candeias e da fração rica em α -bisabolol foi avaliada em modelos envolvidos com a citoproteção. Dessa forma foi avaliada a participação do óxido nítrico, das prostaglandinas e dos grupos sulfidríla não proteicos.

Substâncias sulfidrílicas não protéicas possuem ação citoprotetora por impedir a ação de radicais livres na mucosa gástrica, além de diminuir a permeabilidade vascular. A glutathione reduzida, rica em radicais sulfidríla, presente na mucosa gástrica está envolvida na citoproteção, por bloquear a ação de radicais livres tóxicos. Drogas como a N-etilmaleimida são capazes de alquilar estes grupos inibindo, dessa forma, a atividade citoprotetora da glutathione (Szabo, 1981; Takeuchi et al., 1989; Martin et al., 1998). No modelo de úlcera por etanol com animais tratados com N-etilmaleimida (10 mg/kg) a fração de α -bisabolol manteve sua atividade, excluindo a participação de grupos sulfidríla no mecanismo de ação antiulcerogênico.

O óxido nítrico liberado pela ação da pentagastrina e da colicistocinina, protege a mucosa estomacal de lesões ulcerativas causadas pelo etanol. Este efeito se dá por um aumento da vasodilatação e conseqüente maior oferta de oxigênio e nutrientes para as células. A vasodilatação também intensifica a retirada do excesso de H^+ presente na mucosa (Konturek et al., 1995).

No modelo de úlcera por etanol absoluto utilizando animais tratados com L-NAME (éster dimetílico de N(G)-nitro-L-arginina), inibidor da enzima NO-sintase responsável pela síntese de óxido nítrico, a fração de α -bisabolol, nas doses de 500, 250 e 100mg/kg (vo), manteve sua atividade antiulcerogênica. Esses resultados sugerem que a fração de α -bisabolol não atue através da liberação de óxido nítrico.

O muco aderido a parede gástrica atua como uma barreira mecânica que impede a difusão de íons H^+ para células da mucosa gástrica. (Sellers et al., 1986; Rafatullah e tal., 1990). Como já salientado as prostaglandinas participam ativamente da produção desse muco. Substâncias capazes de aumentar a síntese de prostaglandinas ou diminuir sua metabolização, como a carbenoxolona, estimulam a produção de muco e com isso a citoproteção. Da mesma forma agonistas dos receptores das prostaglandinas, como o misoprostol, podem aumentar a produção do muco (Konturek et al, 1995).

Para verificar a influência do óleo essencial na síntese de prostaglandinas, sua atividade foi avaliada em modelo de úlcera induzida por etanol, em animais previamente tratados com indometacina (5 mg/kg, ip) em dose suficiente para inibir a síntese de prostaglandinas e potencializar as úlceras induzidas por etanol. (Konturek et al., 1995). Nesse experimento, a atividade antiulcerogênica da fração de α -bisabolol não foi alterada pelo tratamento prévio com indometacina. Esses resultados sugerem que a atividade farmacológica não está envolvida com a síntese de prostaglandinas.

A quantidade de muco protetor aderido a parede gástrica é intimamente relacionada com prostaglandinas. A carbenoxolona sódica, obtida a partir das raízes e rizomas do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) aumentam os níveis de prostaglandinas na mucosa gástrica por inibir as enzimas que promovem o catabolismo das prostaglandinas (15-hidroxi-PG-dehidrogenase e Δ^{13} -PG-redutase). Além deste mecanismo, a carbenoxolona aumenta os níveis de AMPc por inibição das fosfodiesterases da mucosa e também por inibição da secreção de pepsina (Lewis & Hanson, 1991a, Lewis & Hanson, 1991b).

Drogas como o sucralfato ligam-se à superfície das úlceras, protegendo até certo ponto a mucosa gástrica de dano adicional por ácido e pepsina, ou ainda inibindo a pepsina diretamente, além de aumentar produção de prostaglandinas.

Para a quantificação de muco protetor aderido a parede gástrica foi utilizado o modelo de úlcera induzido por imobilização e frio. Nesse experimento, o óleo essencial e fração α -bisabolol produziu um aumento do muco aderido à parede gástrica. Esses resultados sugerem que os princípios ativos do óleo essencial de candeias, entre eles o α -bisabolol, podem atuar diretamente através da ligação ao receptor de prostaglandinas.

A análise dos resultados obtidos nos permite concluir que o óleo essencial de candeias possui atividade antiulcerogênica relacionada com um aumento da produção de muco protetor aderido a parede gástrica.

6. Conclusão

A análise dos resultados nos permitiram concluir que o óleo essencial de candeias, possui atividade antiulcerogênica, nos modelos propostos, é que o α -bisabolol é provavelmente o princípio ativo responsável pela atividade antiulcerogênica.

Podemos ainda concluir que o mecanismo de ação antiulcerogênico está relacionado com aumento do muco protetor aderido parede gástrica.

7. Summary

The species of the gender *Eremanthus*, are known popularly as lamps and wood lamps and found in several savannah areas. Your essential oil is very used by the industry of cosmetics, being produced in Brazil and exported for several countries. For being used as cicatrizant by workers involved in your production, this oil was selected for studies of antiulcerogenic activity. The work had beginning with the essential oil, supplied by Purita Oils Essential Industria e Comércio Ltda, obtained by it drags to vapor. The oil was then submitted to the classic models of ulcer induction for verification of your possible antiulcerogenic potential. In all the tested models, ulcer induced for anti-inflammatory, absolute ethanol and immobilization and cold (stresses) the essential oil of lamps presented inhibition of the ulcerative lesions indicating antiulcerogenic activity. The essential oil of lamps was then submitted to a purification process being obtained then: acid iso-valérico, alpha-bisabolol, terpenos, fraction C7, C8 and residues, these three last rich in alpha-bisabolol and terpenos as revealed the chromatografic coupled gaseous mass espectrometria. Of these fractions two (alpha-bisabolol and terpenos) they were selected for evaluation of the activity antiulcerogenic. The same models for screen of the activity antiulcerogenic were used. Two characteristics were necessary so that the fractions above tested continued to be studied, that go active in the screen model and in enough amount. Of the two fractions, the rich in alpha-

bisabolol was chosen for the continuity of the work. The rich fraction in alpha-bisabolol it presented effect in the ulcer models induced by alcohol and ulcer induced by immobilization and cold. As much the rude essential oil as the rich fraction in alpha-bisabolol presented systemic activity, characterized in the ulcer model induced by ethanol. The activity antisecretory was studied in model camera of *Ussing* where the rude essential oil and the rich fraction in alpha-bisabolol didn't present activity. In animals previously treated with histamina activity antisecretory was not observed also. As much the rude essential oil as rich fraction in alpha-bisabolol were evaluated in models that involve citoprotection factors, and the results discarded the participation of sulfhydryl groups, NO, and prostaglandins. An increase in the production of stuck protecting mucus in the gastric wall was observed. The results suggest the composition alpha-bisabolol it is the possible responsible for the activity antiulcerogenic of the essential oil of *Lamproloma* and this activity is it can be directly in receivers of prostaglandins of the type E1, or similar to substances as sucralfato and subcitrate of colloidal bismuth.

8. Referências Bibliográficas

- Aalykke, C., Lauritsen, J.M., Hallas, J., Reinholdt, S., Krogfelt & Lauritsen, K.,
Helicobacter pylori and risk of ulcer bleeding among users of nonsteroidal anti-
inflammatory drugs. A case-control study **Gastroenterology** **116**: 1305-1309,
1994.
- Aboim, E., Arquero, P., Balboa, V., Porstaglandina PGE1, análogo sintético
(misoprostol) no manuseio de lesões da mucosa gástrica induzida por etanol.
Arq bras Med, **61** (4):277-283,1987.
- Allen, A., Flemström, G.; Garner, A., Kivilaakso, E. Gastroduodenal mucosal
protection. **Physiol. Rev.**,**73**, 823-857, 1993.
- Asakawa, Y., Taira,Z., Toyota, M. and Tekemoto, T. Sesquiterpene lactones of
Eremanthus incanus and *Porella japonica*. Crystal structure and stereochemistry
of eregoyazidin, **J. Org. Chem.** 46: 4602-4604, 1981.
- Barbosa, A.J.A., Queiroz, D.M.M., Mendes, E.N., Rocha, G.A., Cisalpino, E.O.,
Lima, G.F., Oliveira, C.A. Immunocytochemical identification of *Campylobacter*
pylori in gastritis and correlation with culture. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **112**,
523-525, 1988.

- Black, J. W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R., Parsons, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. **Nature**, **236**, 385-390, 1972.
- Brunton, L.L. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Gilman, A.G. ed. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9^a Ed. McGraw-Hill, New York, pp. 901-915, 1996.
- Cordeiro, F., Tratamento da úlcera duodenal: Uma visão histórica.
<http://www.epub.org.br/gastro/n0102/historia.htm>.
- Dias, P.C.; Foglio M.A.; Possenti, A.; Nogueira, D.C.F. & Carvalho, J.E Antiulcerogenic activity of crude ethanolic extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Phytotherapy Research**, 2000 (in the press).
- Eberhart, C.E. & Dubois, R.N. Eicosanoides and gastrointestinal tract. **Gastroenterology**. **109**: 285-301, 1995.
- Elliot, S.N., McKnight, W., Cirino, G & Wallace, J. L. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**. **109**: 524-530, 1995.
- Ferreira, P.M. (1995) Mecanismo de ação do extrato bruto da *Maytenus ilicifolia* e efeitos das substâncias isoladas sobre a secreção gástrica de ácido. ICB / UFMG - Belo Horizonte, 91p. (Tese de Mestrado).

- Gamberini, M.T., Skorupa, L.A., Souccar, C. & Lapa, A.J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, **86**: Suppl. II, 137-139, 1991.
- Garcia, M., Silva, A .J.R. da Gilbert, B., & Rabi, J. A. Absolute stereochemistry os eremanthine. A schistosomicidal sesquiterpene lactone from *Eremanthus elaeagnus*. **Phytochemistry**, Vol 15. Pp. 331-332, 1976.
- Goa, K.L., Monk, J.P. Enprostil: A preliminary review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic proprieties and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer. **Gastroenterology**, **50**, 539-559, 1987.
- Gupta, M.B., Tangri, K.K., Bhargava, K.P. Mechanism of ulcerogenic activity of reserpine in albino rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **27**: 269-271, 1974.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. Secretory functions of the alimentary tract. In: Textbook of Medical Physiology, 9^a ed., W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 815-832, 1996.
- Hayden, L.J., Thomas, G., West, G.B. Inhibitors of gastric lesions in the rat. **J. Pharm. Pharmac.**, **30**, 244-246, 1978.
- Herz, W. & Kumar, N., Cytotoxic sesquiterpene lactones of *Eremanthus incanus* and *Heterocoma albida*. Crystal structure and stereochemistry of Eregoyazin, **J. Org. Chem.**, Vol.45 n^o 12 2503-2506, 1980.
- Hojgaard, L., Nielson, A .M., Rune, S.J. Pepetic Ulcer Pathophysiology: Acic, Bicarbonate, and mucosal function, **San J Gastroenterol**, **31** Suppl 216: 10-15, 1996

- Kato, S., Kitamura, M., Korolkiewicz, R.P., Takeuchi, K., Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor, **Br J Pharmacol**, **123 (5)**: 839-846, 1998
- Konturek, P.C., Brozozowski, T., Konturek, S.I., Márquez, M., Torres, J., Ortiz, J. A , Studies on the cytoprotective and antisecretory activity of ebrotidine. A review, **Arzneimittelforschung** **47**, (4 A), 578-589, 1997.
- Konturek, S.J. & Pawlik, W. Physiology and pharmacology of prostaglandins. **Digestive Diseases and Sciences**, **31(2)**, 6S-19S, 1986.
- Konturek, S.J., Brozozowsky, T., Pytko-Polonczyk, J., Drozdowicz, D. Comparison of cholecystokinin, pentagastrin and duodenal oleate in gastroprotection in rats. **Scand. J. Gastroenterology.**, **30(7)**, 620-630, 1995.
- Levine, R.J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: C.J. Pfeiffer (Ed.), *Peptic Ulcer*, Munksgaard, Kopenhagen, pp.92-97, 1971.
- Lewin, M.J.M., Bado, A., Cherifi, Y. and Reyl-Desmars, F. The gastric H3 receptor: a review. **The Yale Journal of Biology and medicine**, **65**: 607-611, 1992
- Lewis, D.A. & Hanson, P.J., Anti-ulcer drugs of plant origin, **Progress in Medicinal Chemistry**, **28**, 201-231, 1991 (a).
- Lewis, D.A., Hanson, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: G.P. Ellis and G.B. West, ed. *Progress in Medicinal Chemistry* - vol. 28, Elsevier Science Publishers, B.V., pp. 201-231, 1991(b).

- Lindberg, P., Brandstrom, A., Wallmark, B. Structure-activity relationships of omeprazole analogues and their mechanisms of action. **Trends Pharmacol. Sci.**, **8**, 399-402, 1987.
- Litchfield Jr., J.T., Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **96**, 99-113, 1949.
- Luanardello, M.A., Tomaz, J.C., Vichnewski, W., Lopes, J.L.C., Gutierrez, A.B., Diaz, J.G. & Herz, W. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Eremanthus mattogrossensis* and *Eremanthus eriopus*, **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol6 no 3
- Magistrelli, M.J., Conn, M. and Cristoni, A. Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*. **Arzneim.-Forsch./Drug research**, **38 (5)**: 686-690, 1988.
- Martin, M.J., La Casa, C., Alarcón de la Lastra, C., Cabeza, J., Villrgas, I., Motilva, V., Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin, **Z Naturforsch [C]** **53**, (1-2), 82-88, 1998.
- Masamune, A., Shimosegawa, T., Masamune, O., Mukaida, N., Koizumi, M. & Toyota, T. *Helicobacter pilory* - dependent ceramide production may mediate increased interleukin 8 expression in human gastric cancer cell lines. **Gastroenterology**, **116**: 1330-1341, 1999.
- Monk, J.P., Clissold, S.P. Misoprostol: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. **Drugs**, **33**, 1-30, 1987.

- Oates, P.J., Hakkinen, J.P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, **94**: 10-21, 1988.
- Parmar, N.S., Ghosh, M.N. Gastric anti-ulcer activity of (+)-cyanidanol-3, a histidine decarboxylase inhibitor. **Eur. J. Pharmacol.**, **69**, 25-32, 1981.
- Prinz, C., Kajimura, M., Scott, D., Helander, H., Shin, J., Besacon, M., Bamberg, K., Hersey, S. and Sachs, G. Acid secretion and the H/KATPase of stomach. **The Yale Journal of Biology and medicine**, **65**: 577-596, 1992.
- Queiroz, D.M.M., Barbosa, A.J.A., Mendes, E.N., Rocha, G.A., Cisalpino, E.O., Lima, G.F., Oliveira, C.A. Distribution of *Campylobacter pylori* and gastritis in the stomach of patients with and without duodenal ulcer. **Am. J. of Gastroenterology**, **83**(12), 1368-1370, 1988.
- Quesne, P.W. Le., Lavery, S.B., Menachery, M.D., Brennan, T.F. & Raffauf, R.F. Antitumor plants. Part 6.^{1,2} novel modified germacranolides and other constituents of *Eramanthus elaeagnus* Schultz-Bip (Compositae), **J.C.S.Perkin**, 1572-1580, 1980.
- Rafatullah, S., Tariq, M., Al Yahya, M.A., Mossa, J.S. & Ageel, A.M. Evaluation of Turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J. Ethnopharm.**, **29**: 25-34, 1990.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. The gastrointestinal tract. In: Pharmacology, 3^o ed., Churchill Livingstone, New York, pp.385-402, 1995.

- Rangachari, P.K. Histamine release by gastric stimulants. **Nature**, **253**, 53-55, 1975.
- Robert, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, **77**, 761-767, 1979.
- Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Davis, J.P., Field, S.O. & Hanchar, A.J. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptative cytoprotection" mediated by prostaglandins. **Am. J. Physiol.** **245**: G113-G121, 1983.
- Sababi, M., Nilsson, E. & Holm L., Mucus and alkali secretion in the rat duodenum: Effects of indometacin, N^o-Nitro-L-arginine, and luminal acid. **Gastroenterology** **109**: 1526-1534, 1995.
- Sachs, G., Carlsson, E., Londberg, P., Wallmark, B. Gastric H⁺, K⁺-ATPase as therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **28**, 269-284, 1988.
- Sandvik, A.K. & Waldrum, H.L. Gastrin is a potent stimulant of the parietal cell - maybe. **Am. J. Physiol.** **260**: G925-G928, 1991.
- Schubert, M.L. Regulation of gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**. **10**: 575-588, 1994.
- Schubert, M.L., Shamburek, R.D. Control of acid secretion. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, **19**, 1-25, 1990.

- Sellers, L.A., Carroll, N.J.H., Allen, A. Misoprostol-induced increases in adherent gastric mucus thickness and luminal mucus output. **Digestive Diseases and Sciences**, **31** (2), 91S-95S, 1986.
- Smedfors, B., Johansson, C. Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by misoprostol. **Digestive Diseases and Sciences**, **31**: (2) 96S-100S, 1986.
- Soldani, G., mengozzi, G., Intorre, L., Giorgi, G. De, Coruzzi, G. and Bertaccini, G. Histamine H3 receptor-mediated inhibition of gastric acid secretion in conscious dogs. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, **347**: 61-65. 1993.
- Soll, AH. Histamina e secreção gástrica. In: **Conceitos básicos em gastroenterologia**, Editora smith kline & French Intern. Co., 3: 01-52, 1983.
- Surprenant, A. Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. **Annu. Ver. Physiol** 56: 117-141., 1994
- Szabo, S. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, **214**, 201-202, 1981.
- Takeuchi, K., Okada, M., Niida, H. & Okabe, S. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **248** (2): 836-841, 1989.

- Talley, N.J., Ormand, J.E. Is antibacterial therapy against *Campylobacter pylori* useful in the treatment of indigestion and chronic peptic ulceration? **Trends Pharmacol. Sci.**, **10**, 36-40, 1989.
- Texter, E.C., Reylly, P.A. The efficacy and selectivity of pirenzepine: review and commentary. **Scand. J. Gastroenterol.**, **17**(72), 237-246, 1982.
- Tytgat, G.N.T. & Rauws, E.A.J. *Campylobacter pylori* and its role in peptic ulcer disease. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, **19**: 183-196, 1990.
- Vichnewski, W. Machado, F.W.L., Rabi, J.A. Murari, R. & Herz, W., Eregoyazin and Eregoyazidin, two new guaianolides from *Eremanthus goyazensis*. **J.Org. Chem.**, Vol42 n° 24 pp.3910-3913, 1977.
- Vichnewski, W. Sarti, S.J., Gilbert, B., Herz, W. Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*, **Phytochemistry**, Vol15, pp191-193, 1976.
- Vichnewski, W., Takahashi, A. M., Nasi, A .M. T., Rodrigues, Gonçalves, D.C.R.G., Lopes, J.N.C., Goedken, V.L., Gutierrez, B.A . & Herz, W., Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidelli*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. **Phytochemistry.**, Vol28 n° 5 pp.1441-1451, 1988.
- Wallace, J.L., & Bel, C.J., Gastroduodenal mucosal defense **Currente Opinion in Gastroenterology**, **10**: 589-594 , 1994
- Wallace, J.L., & Chin, B.C., Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury, **P.S.E.B.M.**, **214**, 1997.

- Walsh, J.H., Peptides as regulators of gastric acid secretion, **Ann. Ver. Physiol.** **50**, 41-63, 1988.
- Whittle, B.J.R. Temporal relationship between cyclo-oxygenase inhibition, as measured by prostacyclin byosynthesis and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in rats. **Gastroenterology**, **80**, 94-98, 1981.
- Wingate, D.L. Neurophysiology of the gastrointestinal tract. **The Gastrointerology Annual**, **3**: 258-283, 1986.
- Wood, J.D. Enteric neurophysiology. **Am. J. Physiol.**, **247**: G585-598, 1984.
- Yamamoto, O., Okada, Y., Okabe, S. Effectes of a proton pump inhibitor, omeprazole, on gastric secretion and gastric and gastric and duodenal ulcers or erosions in rats. **Digestive Disease Scince**, **29**, 394-401, 1984.