

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



CHRISTIANE TAKAYAMA

**DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS
ANTIULCEROGÊNICOS E ANTIOXIDANTES DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis spicigera* Lam.,
LAMIACEAE**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Christiane Takayama
Alba Monteiro
aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

T139d	<p>Takayama, Christiane Determinação dos mecanismos antiulcerogênicos e antioxidantes do óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> Lam., Lamiaceae / Christiane Takayama. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Óleo essencial. 2. <i>Hyptis spicigera</i>. 3. Drogas antiulcerogênicas I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza, 1954- Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Determination of the antiulcerogenic and antioxidant mechanisms of the essential oil from *Hyptis spicigera* Lam., Lamiaceae.

Palavras-chave em inglês: Essential oil; *Hyptis spicigera*; Antiulcer drugs.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito, Leônia Maria Batista, Ana Paula Couto Davel.

Data da defesa: 14/01/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 14 de janeiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª Alba Regina Monteiro Souza Brito (Orientadora)


Assinatura

Prof^ª Dr^ª Leônia Maria Batista


Assinatura

Prof^ª Dr^ª Ana Paula Couto Davel


Assinatura

Prof^ª Dr^ª Ana Beatriz Albino de Almeida

Assinatura

Prof^ª Dr^ª Máira Cola

Assinatura



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

CERTIFICADO

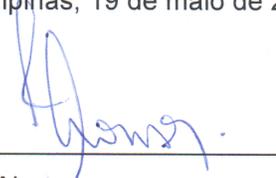
Certificamos que o Protocolo nº **1537-1**, sobre "**Determinação dos mecanismos antiulcerogênicos e antioxidantes do óleo extraído de *Hyptis lophanta*, Lamiaceae**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito / Christiane Takayama**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **19 de maio de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1537-1**, entitled "**Determination of antiulcerogenic and antioxidant mechanisms in oil extracted from *Hyptis lophanta*, Lamiaceae**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **May 19, 2008**.

Campinas, 19 de maio de 2008.


Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

A Jaime, Hatsue e Renan...

...com amor e admiração.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por guiar meus passos e por ter me permitido chegar até aqui...

Aos meus pais, Jaime e Hatsue, que são para mim exemplos de luta e dedicação... obrigada por tudo, por todo amor e apoio incondicional... todas as minhas conquistas se devem a vocês... obrigada...

Ao Renan, amor da minha vida e grande companheiro... obrigada pelo amor, carinho e por me proporcionar muitos momentos felizes... e também obrigada pela paciência, incentivo e por me fazer rir mesmo nos momentos difíceis...

A toda minha família, em especial aos meus avós (in memoriam) e aos pais do Renan, Inácio e Amália... obrigada pelo carinho...

À Professora Alba, minha orientadora, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança, amizade e pelos ensinamentos...

A todas as pessoas que fazem ou já fizeram parte da equipe do Laboratório de Produtos Naturais, com as quais dividi momentos de muita aprendizagem e também de descontração... obrigada pela convivência, apoio e amizade...

... Ao Victor, quem me acompanhou no laboratório na época da iniciação científica... obrigada pelos primeiros ensinamentos científicos...

... Ao Dersinho, um grande amigo sempre disposto a ajudar (daqueles que não sabe mesmo recusar ajuda, mesmo quando está super atarefado) e o principal responsável pela alegria e momentos descontraídos no laboratório... obrigada pela amizade, sugestões, conselhos, críticas e ajuda constante (foi muita ajuda mesmo),...

... À Aninha, um exemplo de pessoa por quem tenho grande admiração, obrigada pela amizade, ensinamentos, ajuda e muitos e muitos conselhos ...

... Ao Felipe, também um grande parceiro de trabalho, obrigada pela ajuda (que também foi muita) e amizade...

... Aos queridos amigos e colegas Bitá (Vinícius), Camilla, Cibele, Cinza (Eduardo), Deborah, Dunder (Ricardo), Erikinha, Fabi, Luís, Pati, Silene... obrigada pela ótima convivência dentro e fora do laboratório, pela disposição em ajudar e total apoio ...

Ao Prof^o Dr. Marcos José Salvador pela imensa ajuda e sugestões...

À Prof^a Dr^a Clélia Akiko Hiruma Lima e à equipe de seu laboratório pela receptividade, contribuição e atenção...

À Prof^a Dr^a Cláudia Helena Pellizon e à Ariane também pela colaboração...

À Prof^a Leônia Maria Batista pela atenção e disposição em participar da banca de defesa...

À Prof^a Ana Paula Couto Davel pela paciência, solicitude e valiosa participação nas bancas de qualificação e defesa...

Às docentes Prof^a Dr^a Elenice A. de Moraes Ferrari, Prof^a Dr^a Ana Beatriz A. de Almeida e Prof^a Dr^a Ana Paula Couto Davel pela participação em meu exame de qualificação, sugestões e comentários sobre meu trabalho...

Ao Adriano Galvão de Carvalho e à Raizando Óleos Essenciais, pela atenção e importante colaboração nesse trabalho, com envio de amostras da planta...

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

Aos colegas do Depto. de Fisiologia e Biofísica pela colaboração, especialmente André e Priscila, sempre dispostos a ajudar...

Aos docentes e funcionários do Depto. de Fisiologia e Biofísica e da Coordenadoria de Pós-graduação do IB/UNICAMP...

À Bia, Mit e Suzana, pessoas que considero muito... obrigada pela amizade de vocês...

À Capes, CNPq e Fapesp pelo apoio financeiro para minha formação científica e para o desenvolvimento desse projeto.

“Tudo o que chega, chega sempre por alguma razão.”

Fernando Pessoa

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xviii
LISTA DE TABELAS.....	xx
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações iniciais	1
1.2. Úlcera péptica	1
1.3. Fatores protetores da mucosa gástrica.....	3
1.3.1. <i>Camada de muco e bicarbonato</i>	4
1.3.2. <i>Prostaglandinas (PG)</i>	5
1.3.3. <i>Reconstituição do epitélio gástrico</i>	6
1.3.4. <i>Fluxo sanguíneo</i>	8
1.3.5. <i>Óxido nítrico (NO)</i>	9
1.3.6. <i>Sistema antioxidante</i>	9
1.4. Modelos experimentais de úlcera gástrica.....	14
1.5. Tratamento de úlcera gástrica.....	15
1.6. Plantas medicinais	16
1.7. Óleos essenciais.....	18
1.8. Família Lamiaceae.....	20
1.8.1. <i>Hyptis</i> Jacq. (Lamiaceae).....	21
1.8.2. <i>Hyptis spicigera</i> Lam. syn <i>Hyptis lophanta</i> Mart. ex Benth. (Lamiaceae)	22

2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Óleo essencial	26
3.2. Análise química do óleo essencial.....	26
3.3. Animais.....	27
3.4. Avaliação da atividade antiulcerogênica.....	27
3.4.1. <i>Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto</i>	27
3.4.2. <i>Úlcera gástrica induzida por indometacina (DAINE)</i>	28
3.5. Avaliação dos mecanismos protetores da mucosa gástrica.....	28
3.5.1. <i>Parâmetros do suco gástrico</i>	28
3.5.2. <i>Muco aderido à mucosa gástrica</i>	29
3.5.3. <i>Níveis de prostaglandina (PGE₂)</i>	29
3.5.4. <i>Óxido nítrico (NO) e compostos com grupamento sulfidril (G-SH) na gastroproteção</i>	30
3.6. Avaliação da atividade cicatrizante.....	30
3.6.1. <i>Úlcera gástrica induzida por ácido acético</i>	30
3.6.2. <i>COX-2 e EGF</i>	31
3.7. Avaliação dos parâmetros toxicológicos.....	32
3.8. Análise histológica.....	32
3.9. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	32
3.9.1. <i>Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH</i>	32
3.9.2. <i>Avaliação da capacidade de absorção de radicais de oxigênio – (ORAC-FL)</i>	33
3.10. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	33
3.10.1. <i>Índice de peroxidação lipídica (LPO)</i>	34

3.10.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO)	35
3.10.3. Grupamentos sulfidril (GSH)	35
3.10.4. Atividade da glutathione redutase (GR).....	35
3.10.5. Atividade da glutathione peroxidase (GPx)	36
3.10.6. Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	36
3.11. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Análise química do OEH.....	37
4.2. Atividade antiulcerogênica do OEH.....	38
4.3. OEH nos parâmetros ácido-gástricos	39
4.4. OEH na produção de muco gástrico	40
4.5. OEH nos níveis gástricos de prostaglandina (PGE ₂).....	41
4.6. OEH sobre óxido nítrico (NO) e compostos com grupamentos sulfidril (G-SH)	42
4.7. Atividade cicatrizante do OEH.....	44
4.7.1. OEH na úlcera gástrica induzida por ácido acético	44
4.7.2. OEH na expressão gástrica de COX-2 e EGF na úlcera induzida por ácido acético.....	45
4.8. OEH e parâmetros toxicológicos	46
4.9. Análise histológica	47
4.10. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de OEH.....	48
4.10.1. DPPH	48
4.10.2. ORAC-FL.....	48
4.11. Atividade antioxidante <i>in vivo</i> de OEH.....	49
4.11.1. Índice de peroxidação lipídica	51

4.11.2. <i>Atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	52
4.11.3. <i>Grupamentos sulfidril (G-SH)</i>	53
4.11.4. <i>Atividade da glutathione redutase (GR)</i>	54
4.11.5. <i>Atividade da glutathione peroxidase (GPx)</i>	54
4.11.6. <i>Atividade da superóxido dismutase (SOD)</i>	55
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	72
7. PERSPECTIVAS	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs. = absorbância

ALFAC = solução de álcool, formalina e ácido acético

ALU = área de lesão ulcerativa

ANOVA = análise de variância de uma via

ATP = adenosina trifosfato

bFGF = fator de crescimento fibroblástico básico

CAT = catalase

CG-EM = cromatografia gasosa – espectrometria de massa

COX = ciclooxigenase

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

DAINE = drogas anti-inflamatórias não esteroidais

DNA = ácido desoxirribonucléico

d.p.r. = desvio padrão relativo

DPPH = 1,1-difenil-1-picril-hidrazila

DTNB = ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico)

EC₅₀ = concentração mínima para obter 50% do efeito

ECSOD = superóxido dismutase extracelular

EDTA = ácido etilenodiaminotetraacético

EGF = fator de crescimento epidermal

EGF-R = receptor de fator de crescimento epidermal

eNOS = óxido nítrico sintase endotelial

e.p.m. = erro padrão da média

ERO = espécies reativas de oxigênio

FADH₂ = flavina adenina dinucleotídeo

GSH = glutathiona reduzida

G-SH = grupamentos sulfidríla

GPx = glutathiona peroxidase

GSSG = glutathiona oxidada

GR = glutathiona redutase

H[•] = átomo de hidrogênio

H₂ = receptor histamínico do tipo 2

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

HGF = fator de crescimento de hepatócito

HNE = 4-hidroxinonenal

i.d. = intraduodenal

IL = interleucina

iNOS = óxido nítrico sintase induzida

i.p. = intraperitoneal

L-NAME = L-nitro arginina metil-éster

MAPK = proteíno-quinase ativada por mitógenos

min = minuto

MIP-2 = proteína inflamatória de macrófagos 2

MnSOD = superóxido dismutase dependente de manganês/ superóxido dismutase
mitocondrial

MPO = mieloperoxidase

NADH + H⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBT = azul de nitrotetrazólio

NEM = n-etilmaleimida

NFκB = fator de transcrição nuclear κB

nNOS = óxido nítrico sintase neuronal

NO = óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintase

O₂^{•-} = ânion superóxido

O₂ = oxigênio molecular

¹O₂ = oxigênio *singlet*

•OH = radical hidroxila

OE = óleo essencial

OEH = óleo essencial de *Hyptis spicigera*

ONOO⁻ = peroxinitrito

ORAC = capacidade de absorção de radicais de oxigênio

PAS = ácido periódico de Schiff

PG = prostaglandinas

PGD₂ = prostaglandina D₂

PGE₂ = prostaglandina E₂

PGF_{2α} = prostaglandina F₂

PGI₂ = prostaglandina I₂

pH = potencial hidrogeniônico

PPI = inibidor de bomba protônica

ppm = parte por milhão

RO[•] = alcoxila

ROO[•] = peroxil

SDS = dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

SOD = superóxido dismutase

rpm = rotações por minuto

TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TE = equivalentes de Trolox

TNF α = fator de necrose tumoral α

Tris = hidroximetilaminometano

TXA₂ = tromboxano A₂

U = unidade

UA = unidade arbitrária

vEGF = fator de crescimento epitelial vascular

v.o. = via oral

λ = comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Adaptado de Laine <i>et al.</i> , 2008.	4
Figura 2: Esquema representativo da cicatrização da úlcera gástrica. Adaptado de Tarnawski, 2005.	7
Figura 3: Representação esquemática da ação de enzimas antioxidantes. Adaptado de Kwiecien <i>et al.</i> , 2002.....	14
Figura 4: <i>Hyptis spicigera</i> Lam. (Lamiaceae). (A) e (B) Parte aérea de <i>H. spicigera</i> , (C) Planta seca com inflorescências e (D) Detalhe de uma inflorescência de <i>H. spicigera</i>	23
Figura 5: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> . UA, unidades arbitrárias.	38
Figura 6: Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica em ratos tratados com OEH..	41
Figura 7: Quantificação dos níveis de PGE ₂ na mucosa gástrica de ratos tratados com OEH.	42
Figura 8: Efeito da administração oral durante 14 dias consecutivos do óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> (OEH, 100 mg/Kg) na cicatrização de úlcera gástrica induzida por ácido acético absoluto em ratos.	44
Figura 9: Efeito da administração oral durante 14 dias consecutivos do OEH na expressão de COX-2 (A) e de EGF (B) na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera gástrica induzida por ácido acético absoluto.	45
Figura 10: Efeito da administração oral, durante 14 dias consecutivos, do óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> (OEH, 100 mg/Kg) sobre o peso dos animais.	46

Figura 11: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético. Coloração PAS, um marcador de glicoproteínas. Notar a maior secreção de muco no grupo tratado com OEH (setas). (A) Veículo; (B) Cimetidina; (C) OEH. Barras: 10µm.	47
Figura 12: Curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína no ensaio ORAC-FL para os controles experimentais Branco (controle negativo) e Trolox (controle positivo, amostra de referência análogo sintético da vitamina E) e para as amostras de óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> (OEH).	49
Figura 13: Efeito da administração oral de OEH (100 mg/Kg) na ALU no estômago de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. (A) Visualização macroscópica das lesões. (B) Área de lesão ulcerativa (ALU).	50
Figura 14: Índice de peroxidação lipídica na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.....	51
Figura 15: Atividade da enzima MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto..	52
Figura 16: Níveis de G-SH na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto.....	53
Figura 17: Atividade da enzima GR na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto	54
Figura 18: Atividade da enzima GPx na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.	55
Figura 19: Atividade da enzima SOD na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> (OEH), segundo análise feita por CG-EM.	37
Tabela 2. Efeito do óleo essencial de <i>H. spicigera</i> (OEH) em modelos de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto e DAINÉ em ratos. As áreas de lesão ulcerativas estão representadas como média \pm e.p.m.....	39
Tabela 3. Efeito do óleo essencial de <i>H. spicigera</i> (OEH), administrado em diferentes vias, nos parâmetros ácido-gástricos em ratos submetidos à ligadura de piloro. Dados expressos como média \pm e.p.m.	40
Tabela 4. Efeito do tratamento oral com óleo essencial de <i>H. spicigera</i> (OEH) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos pré-tratados com L-NAME ou NEM.	43
Tabela 5. Relação peso órgãos/ peso corpóreo de animais tratados com veículo, cimetidina (100 mg/Kg) ou OEH (100 mg/Kg) durante 14 dias consecutivos.	46
Tabela 6. Capacidade antioxidante do óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> (OEH).....	48

O gênero *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) compreende cerca de 350 espécies e exibe grande diversidade morfológica no Cerrado brasileiro. As espécies são aromáticas e frequentemente utilizadas para o tratamento de infecções gastrintestinais, cólicas, dor, doenças de pele, rinofaringite, congestão nasal e febre. *Hyptis spicigera* Lam., uma erva daninha nativa do Brasil e típica do Cerrado, é também conhecida como catirina, hortelã, fazendeiro, cheirosa, cheirosa-de-espiga ou buchinha-do-cerrado. É fortemente aromática e diferencia-se das demais espécies de *Hyptis* pela forma da sua inflorescência. Seu óleo essencial é utilizado para tratar dores musculares, pancadas, luxações e problemas digestivos. O objetivo deste trabalho, baseado no uso popular da espécie, foi avaliar o potencial antiulcerogênico do óleo essencial comercial de *Hyptis spicigera* (OEH), bem como seus possíveis mecanismos de ação envolvidos. A análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) do OEH indicou a presença de três monoterpenos majoritários: α -pineno (50,8%), cineol (20,3%) e β -pineno (18,3%). Foram realizados diferentes modelos experimentais de úlcera gástrica; com base em suas respectivas especificações foram incluídos dois grupos controle, um positivo (lansoprazol, carbenoxolona ou cimetidina) e um negativo (veículo – Tween 80, 12%, 10 mL/Kg). Após cada experimento, ratos Unib: WH foram sacrificados, seus estômagos removidos e abertos na região de maior curvatura e fotografados para quantificação da área de lesão ulcerativa por meio do programa AVSoft. OEH, na dose de 100 mg/Kg (v.o.), apresentou atividade antiulcerogênica contra lesões gástricas induzidas por etanol absoluto (97%) e DAINÉ (84%). Para avaliar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica de OEH atividades antissecretória, citoprotetora e antioxidante foram analisadas. O modelo de

úlceras gástricas induzidas por ácido acético e análises de *western blotting* (COX-2 e EGF) foram também utilizadas para avaliar a capacidade cicatrizante de OEH. Esse óleo essencial não interfere na secreção ácida na mucosa gástrica; além disso, sua gastroproteção não depende de NO nem de compostos com G-SH. A atividade gastroprotetora de OEH ocorre devido ao aumento na produção de muco (28%) induzido pelos níveis gástricos de PGE₂. OEH demonstrou também potente capacidade de cicatrização, com 87% de redução da área de lesão ulcerativa, devido ao aumento na expressão de COX-2 (75%) e EGF (115%) na mucosa gástrica. Existem evidências de que ERO participam na etiologia de úlceras gástricas e muitos óleos essenciais foram recentemente qualificados como antioxidantes naturais. A capacidade do OEH de reduzir ou prevenir estresse oxidativo foi avaliada *in vitro* e *in vivo*, na mucosa gástrica de ratos Unib: WH submetidos à úlcera induzida por etanol absoluto. OEH apresentou atividade antioxidante, via transferência de H⁺, relacionado ao sequestro de radicais peróxil. Nenhum sinal de toxicidade foi observado nesse estudo, considerando os parâmetros analisados.

Hyptis Jacq. (Lamiaceae), with almost 350 species, exhibits large morphological diversity in the Brazilian Cerrado region. Its species are quite aromatic and recommended in folk medicine for the treatment of many gastrointestinal infections, colic, pain, skin diseases, rhynopharingites, nasal congestion and fever. *Hyptis spicigera* Lam., a native wild shrub of Brazil widely distributed throughout the Cerrado, is also known as “catirina”, “hortelã”, “fazendeiro”, “cheirosa”, “cheirosa de espiga” or “buchinha-do-cerrado”. It is strongly aromatic and the difference related to other *Hyptis* concerns its inflorescence form. The essential oil extracted from this plant is employed to treat muscular pain, punch, luxation and gastric disorders. Based on the popular indications of this plant for the treatment of gastrointestinal disturbances, the present work aimed on evaluating the antiulcerogenic potential of the commercial essential oil of *Hyptis spicigera* (OEH), as well as its possible mechanisms of action. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of OEH indicated three monoterpenes as major compounds: alpha-pinene (50,8%), cineole (20,3%) and beta-pinene (18,3%). Based on their respective specifications, the groups under each experimental model included positive (lansoprazole, carbenoxolone, or cimetidine) and negative (vehicle-Tween 80 at 12%, 10mL/Kg) controls. After each experiment, Unib: WH rats were killed; the stomachs were opened along the greater curvature and scanned. So that, the ulcerative lesion area could be counted, aided by the AVSoft program. OEH, at the dose of 100 mg/Kg (p.o.), provided effective gastroprotection against lesions induced by absolute ethanol (97%) and NSAID (84%). To elucidate the mechanisms of action involved in the OEH antiulcerogenic activity, the antisecretory, citoprotective and antioxidant actions were evaluated. The acetic acid-induced gastric ulcer model and western blotting

assay (COX-2 and EGF) were also used to evaluate the OEH healing capacity. OEH does not interfere with H^+ secretion in gastric mucosa and its gastric protection does not depend on nitric oxide (NO) and sulfhydryl compounds (SH). The gastroprotective action of OEH occurs due to an increase in the gastric mucus production (28%) induced by PGE_2 levels. Furthermore, OEH demonstrated a great healing capacity with 87% of reduction in the ulcerative lesion area. It accelerated the healing of acetic acid-induced gastric lesions due to an increase in COX-2 (75%) and EGF (115%) expression in gastric mucosa. There are evidences concerning the participation of ROS in the etiology of gastric ulcer and many essential oils were recently described as natural antioxidants. The role of the essential oil in reducing or preventing the oxidative stress was evaluated *in vitro* and *in vivo*, on Unib:WH rat gastric mucosa submitted to absolute ethanol-induced (p.o) gastric ulcer model. OEH presented antioxidant activity, by transferring ions H^+ , related to peroxil radical scavenging. No sign of toxicity was observed in this study, considering the analyzed parameters.

1.1. Considerações iniciais

O uso de plantas para o tratamento de enfermidades é uma tradição milenar transmitida ao longo de gerações, e está baseada no conhecimento empírico acumulado. O uso popular de plantas para fins terapêuticos, por sua vez, se configura como uma das bases para investigar e identificar moléculas com atividade farmacológica, visando desenvolver novos medicamentos. Dessa forma, a diversidade de moléculas sintetizadas no metabolismo secundário dos vegetais possibilita tanto a descoberta de novos compostos químicos quanto de novos modelos para a síntese química de moléculas para o tratamento de diversas enfermidades. Dentre os alvos da pesquisa de novas substâncias terapêuticas de origem vegetal está a úlcera péptica (Gurib-Fakim, 2006; Simões *et al.*, 2004).

A pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e apresenta um caráter multidisciplinar. Nessas pesquisas, a experiência adquirida pelo Laboratório de Produtos Naturais indica a necessidade de um trabalho conjunto de uma equipe para identificar a espécie e determinar as substâncias ativas, além de profissionais que executem ensaios farmacológicos (Souza Brito, 1996; Souza Brito & Nunes, 1997).

1.2. Úlcera péptica

As úlceras gástricas e duodenais (úlceras pépticas) afetam cerca de 10% da população mundial. A incidência dessa enfermidade no mundo é estimada em 1500 a 3000 casos por 100000 habitantes por ano. No Brasil, apesar de ser uma doença frequente, não se conhece precisamente sua real incidência. Nas diferentes estatísticas, a incidência de úlcera péptica no Brasil varia de 1 a 20%, devido à variação das populações estudadas e a

diferenças na coleta dos dados e nos critérios de diagnóstico (Berstad & Berstad, 1993; d'Accampora *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2009).

A úlcera péptica foi por muito tempo uma importante causa de morbimortalidade (Chan & Leung, 2002); consiste em lesões profundas, no estômago ou duodeno, que se estendem através da mucosa e penetram a camada muscular (Leong & Chan, 2004 *apud* Leong, 2009). Essas lesões podem surgir quando ocorre sobreposição de agentes agressores (ácido clorídrico e pepsina) frente à mucosa ou quando os mecanismos de defesa da mucosa tornam-se deficientes (Brzozowski, 2003; Laine *et al.*, 2008). O desequilíbrio entre fatores agressores e protetores da mucosa gástrica está relacionado a diversos fatores exógenos como estresse, uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINE), tabagismo, consumo de álcool e infecção por *Helicobacter pylori* (Tarnawski, 2005; Yuan *et al.*, 2006).

A infecção por *H. pylori* é apontada como o principal fator etiológico da úlcera gástrica, com 75% dos casos associados à presença dessa bactéria. A erradicação de *H. pylori* é eficiente na redução das taxas de recidiva de úlceras (Napolitano, 2009). O segundo maior fator etiológico da úlcera gástrica é a utilização de DAINÉ. Estima-se que usuários crônicos de DAINÉ tem risco de desenvolver úlcera gástrica 46 vezes maior que a média da população e a prevalência de úlcera gástrica nesse grupo é de 9 a 13% (Castro *et al.*, 2009).

Além dos dois fatores citados, outros podem estar relacionados à etiologia da úlcera como doença de Chron, hipercalcemias, linfomas, mastocitose sistêmica, hiperfunção de células G, infecção por *Helicobacter heilmannii*, citomegalovírus ou herpes do tipo I. Para uma pequena parcela de indivíduos com úlcera gástrica não se identifica a causa etiológica da doença; são os casos de úlceras idiopáticas (Castro *et al.*, 2009). Chow & Sung (2007)

relatam que a prevalência de úlceras idiopáticas tem aumentado na última década; na América do Norte, 20 a 40% dos casos de úlceras gástricas não estão associados à infecção por *H. pylori* ou ao uso crônico de DAINE.

Yuan *et al.* (2006) relatam que recentes avanços no conhecimento e no tratamento de úlceras pépticas reduziram a incidência dessa doença. Entretanto, existem alguns problemas a serem resolvidos como tratar úlceras quando há falhas na erradicação de *H. pylori*, prevenir o desenvolvimento e evitar a reincidência de úlceras em usuários de DAINE e tratar úlceras não relacionadas à infecção por *H. pylori* ou ao uso de DAINE.

1.3. Fatores protetores da mucosa gástrica

A integridade da mucosa gástrica envolve diversos fatores como secreção de muco e bicarbonato (barreira protetora à ação do ácido no lúmen do estômago), organização do epitélio e sua adequada reconstituição, fluxo sanguíneo, sistema antioxidante, síntese de prostaglandinas e óxido nítrico (McCord & Fridovich, 1969; Garner *et al.*, 1979; Whittle *et al.*, 1981; Whittle *et al.*, 1990). Os principais fatores de proteção da mucosa gástrica são ilustrados na Figura 1 e descritos a seguir.

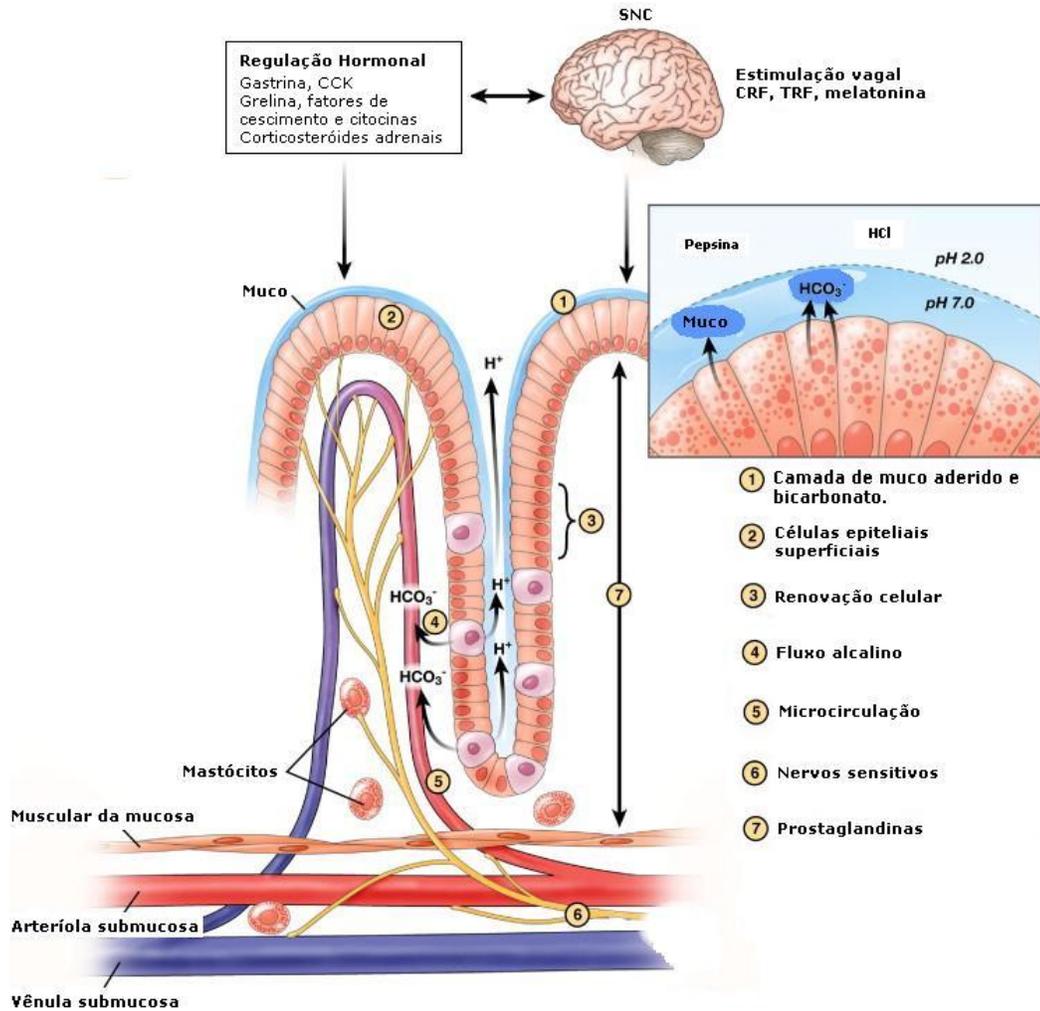


Figura 1: Principais mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Adaptado de Laine *et al.*, 2008.

1.3.1. Camada de muco e bicarbonato

O epitélio gástrico é recoberto por uma camada contínua de muco e bicarbonato. Ambos consistem na primeira linha de defesa da mucosa gástrica, com capacidade de lubrificar e protegê-la de forças mecânicas da digestão, além de favorecerem a difusão e neutralização do ácido luminal contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (Allen & Flemström, 2005; Laine *et al.*, 2008).

O muco, formado por glicoproteínas mucinas (5%) e água (95%), secretado pelas células superficiais do epitélio gástrico, tem sua produção estimulada por hormônios gastrointestinais (gastrina e secretina), agentes colinérgicos e prostaglandinas (Laine *et al.*, 2008). A camada de muco também protege as células epiteliais de danos provocados por radicais livres; essa ação antioxidante do muco está relacionada às suas glicoproteínas que podem sequestrar radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Cross *et al.*, 1984; Garner *et al.*, 1984; Repetto & Llesuy, 2002).

O bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais é retido pelo muco, criando um gradiente de pH entre o lúmen e o epitélio gástrico, mantendo pH neutro na superfície das células epiteliais, além de impedir o contato da pepsina com o epitélio do estômago devido à presença de fosfolípidos hidrofóbicos (Garner *et al.*, 1984; Laine *et al.*, 2008).

1.3.2. Prostaglandinas (PG)

A hidrólise de fosfolípidos de membrana mediada pela fosfolipase A_2 libera no citoplasma o ácido araquidônico, a partir do qual as PG são sintetizadas pela ação das ciclooxigenases (COX). Os prostanóides derivados do ácido araquidônico são denominados de série 2, sendo eles a prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaciclina (PGI_2), prostaglandina F_2 ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e tromboxano A_2 (TXA_2) (Dey *et al.*, 2006). Existem duas isoformas conhecidas de COX: a) COX-1, constitutiva, que é relacionada à síntese fisiológica de prostaglandina; b) COX-2, induzida, que aumenta a síntese de prostanóides na inflamação e em várias doenças (Chandrasekharan *et al.*, 2002; Gudis & Sakamoto, 2005).

A PGE₂ do estômago estimula a produção de muco e bicarbonato, reduz a secreção ácida, regula o fluxo sanguíneo, estimula a renovação epitelial, além de inibir a expressão de TNF- α , contribuindo para a integridade da mucosa (Brzozowski *et al.*, 2005).

DAINE inibem, de forma não seletiva, as enzimas COX e, conseqüentemente, a síntese de PG. O uso frequente de DAINES está relacionado ao desenvolvimento de gastrite e úlcera gástrica, fato que evidencia a importância das PG para a manutenção da integridade da mucosa gástrica (Vonkeman & van de Laar, 2010).

1.3.3. Reconstituição do epitélio gástrico

O epitélio gástrico humano renova-se completamente a cada 2-4 dias. As células superficiais do epitélio do estômago são responsáveis pela secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos, que formam uma importante barreira contra a difusão do ácido e da pepsina (Laine *et al.*, 2008). Considerando a importância da superfície epitelial para prevenção de lesões no estômago, um balanço adequado entre perda e renovação celular torna-se fundamental para manter a integridade da mucosa gástrica. Aumento na degradação ou redução na proliferação de células epiteliais está associado a danos na mucosa (Konturek, 1985).

Histologicamente, a úlcera consiste de duas características principais: margem da úlcera (componente epitelial, formado pela mucosa adjacente não necrótica) e tecido de granulação (componente de tecido conectivo). Este último desenvolve-se entre 48 a 72 horas após a formação da úlcera; consiste de fibroblastos, macrófagos e de microvasos resultantes da proliferação de células endoteliais (Tarnawski, 2005).

O termo “reconstituição” refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa, que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados, na base da

membrana desprotegida (Paimela *et al.*, 1995). Um esquema representativo do processo de cicatrização da úlcera gástrica pode ser visualizado na Figura 2.

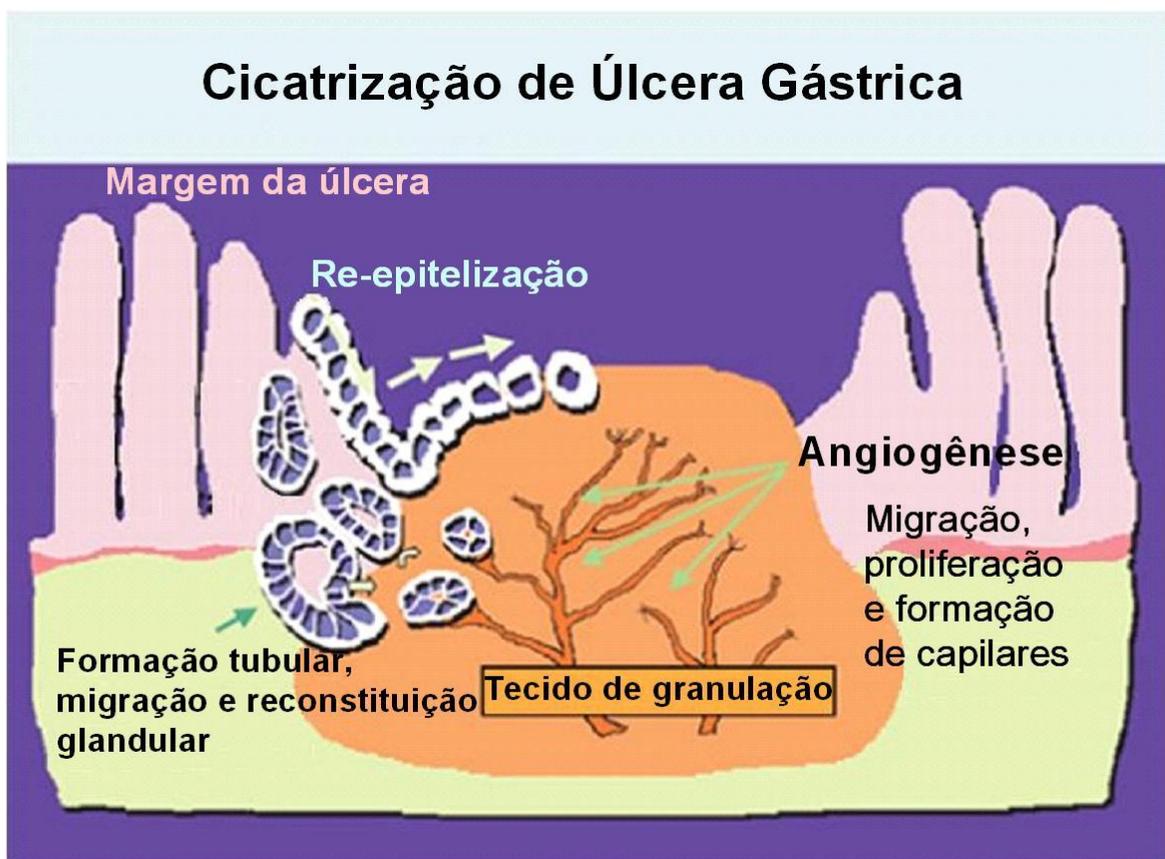


Figura 2: Esquema representativo da cicatrização da úlcera gástrica. Adaptado de Tarnawski, 2005.

A úlcera é reparada através de crescimento e formação de glândulas gástricas, proliferação e migração celular garantidas por células progenitoras localizadas na base das glândulas gástricas, crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), reinervação da mucosa por nervos intrínsecos e extrínsecos, além de deposição de matriz extracelular. Todos esses eventos conduzem à cicatrização da úlcera, sendo controlados por fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas como fator de crescimento epitelial vascular (vEGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico básico

(bFGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), ciclooxigenase-2 (COX-2), entre outros, de forma espacial e temporalmente sincronizada (Milani & Calabro, 2001; Wallace & Ma, 2001; Tarnawski, 2005; Laine *et al.*, 2008). De modo geral, os fatores de crescimento promovem proliferação e migração de células epiteliais para a cratera da úlcera, levando à re-epitelização dessa cratera e maturação das glândulas. EGF, seu receptor e a COX-2 são fundamentais nesses processos (Tarnawski *et al.*, 2001; Tarnawski, 2005).

1.3.4. Fluxo sanguíneo

A microcirculação é outro fator importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica, sendo a redução do fluxo sanguíneo um agente facilitador do desenvolvimento de úlceras (Konturek, 1985; Laine *et al.*, 2008). O contato da mucosa com agentes irritantes resulta no aumento do fluxo sanguíneo na mucosa, enquanto condições de redução da microcirculação na mucosa, como choque hemorrágico, microtrombos e agentes vasoconstritores, aumentam a formação de lesões no estômago (Konturek, 1985). Menguy e colaboradores (1974) relatam que a indução de choque hemorrágico em ratos resulta em redução dos níveis de ATP, concomitantemente ao surgimento de necrose celular e erosões.

O fluxo sanguíneo é modulado pelo sistema nervoso e por mediadores, como óxido nítrico (NO), bradicinina e PG; tal fluxo fornece à mucosa gástrica nutrientes, oxigênio, hormônios e fatores responsáveis pela rápida reconstituição do epitélio, pela secreção de muco e bicarbonato, além de permitir remoção de agentes lesivos e excesso de prótons (Kawano & Tsuji, 2000; Wallace & Ma, 2001). Assim, a microcirculação gástrica regula a capacidade do estômago de reagir a agentes lesivos e a redução do fluxo sanguíneo torna a mucosa gástrica vulnerável (Abdel-Salam *et al.*, 2001), o que favorece formação das lesões causadas por estresse, etanol e DAINÉ (Kawano & Tsuji, 2000).

1.3.5. Óxido nítrico (NO)

O NO é um mediador envolvido tanto na inflamação e ocorrência de danos ao tecido, quanto na proteção frente à úlcera gástrica e na manutenção de determinadas funções fisiológicas. Possui ação protetora na mucosa gástrica por regular a homeostase da microcirculação e atuar na cicatrização, além de ser uma molécula capaz de inibir infiltração de neutrófilos, diminuindo a expressão de moléculas de adesão e algumas citocinas (Elliot & Wallace, 1998; Wallace & Ma, 2001; Tatemichi *et al.*, 2003). Entretanto, em altas concentrações, NO pode inibir enzimas de reparo do DNA e aquelas dependentes de grupamentos sulfidríla, além de formar peroxinitrito (ONOO^-) após reagir com ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e contribuir com o estresse oxidativo (Cho, 2001). A enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual produz NO a partir da L-arginina, possui diferentes isoformas, que podem ser do tipo constitutivo (endotelial – eNOS e neuronal – nNOS) ou induzido (iNOS). A ação citotóxica do NO está principalmente relacionada à atividade da iNOS que, ao ser estimulada, produz NO por longos períodos de tempo, em grande quantidade, favorecendo a formação de ONOO^- (Naito *et al.*, 1998; Cho, 2001; Wallace & Ma, 2001).

1.3.6. Sistema antioxidante

Átomos e moléculas que possuem número ímpar de elétrons (elétrons desemparelhados) em sua órbita externa são denominados radicais livres e possuem grande instabilidade e reatividade. Em meios biológicos, os principais radicais livres são formados a partir do metabolismo do oxigênio molecular (O_2), como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), peroxil ($\text{ROO}\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$) (Cheeseman, 1993; de Zwart *et al.*, 1999; Naito & Yoshikawa, 2002).

Radicais peroxil são formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é causada pelo ataque de uma espécie reativa (geralmente $\bullet\text{OH}$), que subtrai um átomo de hidrogênio ($\text{H}\bullet$) de um grupo metileno alílico, normalmente de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, e caracterizando a etapa de iniciação. Este radical é usualmente estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Sob condições aeróbicas, o carbono radicalar do dieno conjugado reage com O_2 (que é uma molécula hidrofóbica e, portanto, se concentra no interior das membranas) e forma o radical peroxil. Este radical peroxil é capaz de subtrair $\text{H}\bullet$ de moléculas de lipídeos adjacentes, cujo carbono radicalar sofre novo rearranjo, reage com O_2 e forma outro radical peroxil e assim sucessivamente, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação da peroxidação lipídica (Vasconcelos *et al.*, 2007).

A partir de O_2 também são geradas outras moléculas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), mas que participam da liberação de radicais livres. Assim, $\text{O}_2\bullet^-$, $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 e $^1\text{O}_2$ são denominados, em conjunto, espécies reativas do oxigênio (ERO) (Cheeseman, 1993; de Zwart *et al.*, 1999; Naito & Yoshikawa, 2002).

Por sua alta reatividade, ERO podem oxidar moléculas biológicas (lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos) causando danos aos tecidos e levando a enfermidades. Em condições fisiológicas, os prejuízos relacionados à geração de ERO são evitados ou minimizados através de um complexo sistema antioxidante, envolvendo agentes enzimáticos e não enzimáticos. Quando a formação de ERO excede a capacidade antioxidante do organismo tem-se estresse oxidativo, um estado que propicia diversas

alterações em macromoléculas e danos celulares, com aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas, redução dos níveis de grupamentos sulfidríla e indução de apoptose e está relacionado a diversas doenças, inclusive úlcera e inflamação gastrointestinal (Halliwell & Gutteridge, 1990; Das & Banerjee, 1993; Yoshida *et al.*, 1995; Naito & Yoshikawa, 2002; Barreiros *et al.*, 2006).

ERO podem ser formadas na cadeia de transporte de elétrons, que ocorre na membrana mitocondrial interna, durante a síntese de ATP. Depois de atravessarem a cadeia de transporte, quatro elétrons doados por NADH + H⁺ ou FADH₂ são transferidos pela citocromo oxidase ao O₂, formando água. A transferência monovalente de elétrons pode resultar em redução incompleta do oxigênio e gerar O₂^{•-} (Naito & Yoshikawa, 2002; Barreiros *et al.*, 2006).

A dismutação de O₂^{•-} produz H₂O₂, que não apresenta grande reatividade, mas pode dar origem a [•]OH, o radical mais deletério ao organismo, através de reações com metais de transição como Fe²⁺ ou Cu⁺ (Blake *et al.*, 1987; Lazar *et al.*, 1989; Naito & Yoshikawa, 2002; Barreiros *et al.*, 2006).

Outra fonte de produção de radicais livres em meios biológicos é o processo inflamatório onde O₂ é reduzido a O₂^{•-}, por meio da enzima NADPH oxidase presente na membrana plasmática de células fagocitárias (Grisham & Hernandez, 1986). O ânion superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio, que pode originar ácido hipocloroso ou hipoclorito na presença de Cl⁻, em reação catalisada pela mieloperoxidase (Grisham & Hernandez, 1986; Fialkow *et al.*, 2007).

Além de causar oxidação de moléculas biológicas, ERO são capazes de modular vias de sinalização intracelular ou agir como substâncias parácrinas, através da ativação de

citocinas, angiotensina e fatores de crescimento. Também são apontadas como fatores reguladores da resposta inflamatória modulando eventos como fagocitose, secreção de citocinas, expressão gênica e apoptose, principalmente relacionados à função de neutrófilos (Ganguly *et al.*, 2006; Fialkow *et al.*, 2007). Dentre os elementos ativados por ERO está o fator nuclear de transcrição κ B (NF κ B), que regula a expressão de diversos genes importantes para o processo inflamatório (Halliwell & Gutteridge, 2007). NF κ B regula a expressão de várias citocinas como interleucinas, da quimiocina proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP-2) e das enzimas iNOS e COX-2, além de outros mediadores inflamatórios como moléculas de adesão (Conner & Grisham, 1996; Fialkow *et al.*, 2007).

NF κ B é ativado em situações de estresse (mecânico, oxidativo e aqueles produzidos por choque e infecções), em resposta a estímulos como citocinas (IL-1, TNF α) ou outras substâncias como H₂O₂, lipopolissacarídeos, níquel e cobalto (Das & Maulik, 2004; Fialkow *et al.*, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007). A ativação de NF κ B é observada em várias doenças, desde gastrite até artrite reumatóide. Lee e colaboradores (2005) observaram aumento na ativação de NF κ B em modelo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto. O estresse oxidativo associado à resposta inflamatória, com ativação de NF κ B e liberação de citocinas, é observado em casos de gastrite e úlcera gástricas causados por *H. pylori* (Naito & Yoshikawa, 2002; Halliwell & Gutteridge, 2007).

O organismo possui agentes antioxidantes não-enzimáticos como as vitaminas A, E, C e a provitamina A (β -caroteno), glutathiona (GSH), α -tocoferol, transferrina, compostos com grupamento sulfidril (G-SH) e quelantes como EDTA; possui também agentes antioxidantes enzimáticos como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Esses agentes fazem parte do sistema antioxidante, um mecanismo de defesa do organismo que impede os danos

causados por ERO. (Szelenyi & Brune, 1988; Konturek *et al.*, 1990; Das *et al.*, 1997; Halliwell, 1997).

Os compostos com G-SH são agentes antioxidantes não-enzimáticos que se ligam às ERO impedindo sua ação nociva sobre a mucosa gástrica (Avilla *et al.*, 1996). O papel gastroprotetor dos G-SH endógenos, presentes no muco gástrico, já foi demonstrado em diversos modelos de indução de úlcera (etanol, DAINÉ e estresse), nos quais ocorre depleção desses compostos (Hernandez-Munoz *et al.*, 2000; Bayir *et al.*, 2006). O pré-tratamento com bloqueadores de G-SH, como o N-etilmaleimida (NEM), demonstrou potencializar significativamente a indução de úlceras gástricas (Hiraishi *et al.*, 1994), enquanto que aumentos significativos desses grupamentos promovem gastroproteção (Sener-Muratoglu *et al.*, 2001). Os G-SH são também importantes na produção e manutenção do muco gástrico. As subunidades glicoprotéicas deste último são unidas entre si por pontes dissulfeto, as quais uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel (Salim, 1992; Avilla *et al.*, 1996).

Dentre os agentes antioxidantes enzimáticos, a enzima SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ e tem como co-fatores cobre e zinco, no caso das isoformas citoplasmática (CuZnSOD) e extracelular (ECSOD), ou manganês, no caso da enzima mitocondrial (MnSOD). CAT degrada o H_2O_2 , requerendo ferro como co-fator, enquanto a GPx, cujo co-fator é o selênio, facilita a “varredura” de radicais livres, associada à oxidação de glutathiona (GSH). A glutathiona oxidada (GSSG) é reduzida pela enzima GR (Conner & Grisham, 1996; Halliwell, 1997; Havsteen, 2002; Imai & Nakagawa, 2003; Baker, 2004; Koch *et al.*, 2004; Rukkumani *et al.*, 2004). Um esquema das reações catalizadas pelas enzimas do sistema antioxidante é apresentado na Figura 3.

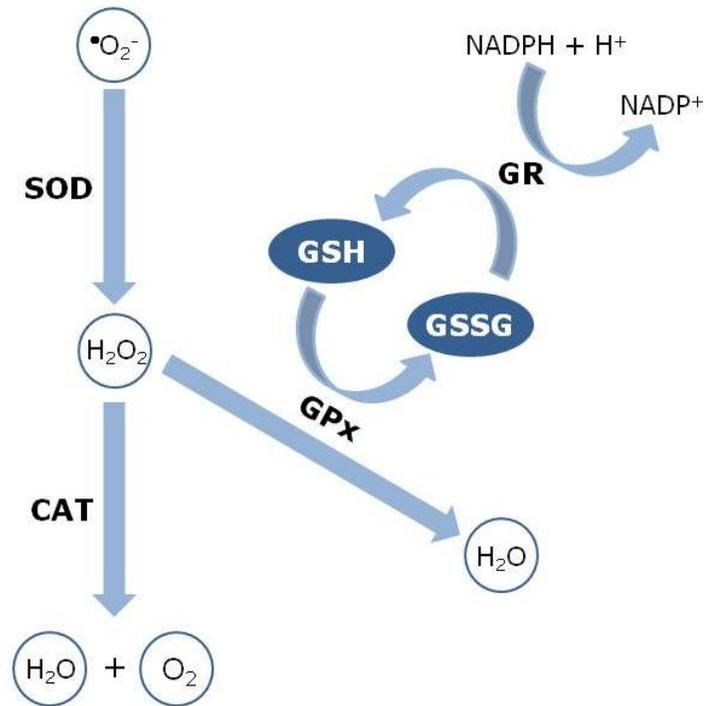


Figura 3: Representação esquemática da ação de enzimas antioxidantes. Adaptado de Kwiecien *et al.*, 2002.

1.4. Modelos experimentais de úlcera gástrica

Devido ao caráter multifatorial da úlcera gástrica, existem diversos modelos experimentais para indução de lesões na mucosa gástrica, a partir de diferentes agentes, como etanol absoluto, DAINÉ, ácido acético, entre outros.

Na úlcera gástrica induzida por etanol há formação de edema no tecido, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular, redução de muco aderido ao epitélio, infiltração de células inflamatórias, e consequente liberação de substâncias vasoativas, aumento da permeabilidade da mucosa e geração de ERO (Szabo *et al.*, 1985; Hiraishi *et al.*, 1999; Kountouras *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005). Tratamento com inibidores de bomba protônica, como o lansoprazol (Fukuda *et al.*, 1995), ou com antagonistas de receptores histamínicos,

como a cimetidina (Morimoto *et al.*, 1991), ou com antioxidantes, como a rutina, uma flavona natural (La Casa *et al.*, 2000), é capaz de proteger a mucosa gástrica contra danos induzidos por etanol.

Na úlcera gástrica induzida por DAINÉ, o principal mecanismo ulcerogênico envolvido é a inibição da síntese de prostaglandinas como consequência da inibição das enzimas COX. Além disso, DAINÉ provocam danos ao endotélio vascular, redução do fluxo sanguíneo, formação de micro-trombos obstrutivos e ativação de neutrófilos (Guth, 1992, Laine *et al.*, 2008). Diversos trabalhos reportam que o tratamento com cimetidina inibe lesões gástricas induzidas por DAINÉ (Hiruma-Lima *et al.*, 1999; Brzozowski *et al.*, 2005; Paula *et al.*, 2006).

O modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético é o que mais se assemelha à úlcera em humanos, tanto no aspecto patológico quanto nos mecanismos de cicatrização. Através desse modelo é possível avaliar o processo de cicatrização da úlcera (Okabe & Amagase, 2005).

1.5. Tratamento de úlcera gástrica

O tratamento de úlcera gástrica consistiu, por muito tempo, em procedimento cirúrgico, com altas taxas de morbimortalidade. Na década de 70, surgiu a terapia baseada na redução da secreção ácida, com uso de inibidores de receptores histamínicos (H₂) como a cimetidina: a utilização desses inibidores reduziu bastante a terapia invasiva de úlceras pépticas (Gustavsson & Nyren, 1989). Na década de 1980, o surgimento de inibidores de bomba protônica (PPI), como o lansoprazol, permitiu aumento dos índices de cicatrização de úlceras gástricas (Yuan *et al.*, 2006).

A associação de *H. pylori* (denominada, na época, *Campylobacter pylori*) com o surgimento de úlceras gástricas, fato que revolucionou a terapêutica dessa enfermidade também ocorreu na década de 1980 (Marshall & Warren, 1984; Chan & Leung, 2002). Assim, o tratamento de primeira linha em casos de úlcera gástrica com presença de *H. pylori* consiste, atualmente, na administração de inibidores de bomba protônica ou de receptores histaminérgicos, associados a antibióticos (Chan & Leung, 2002; Suzuki *et al.*, 2010).

Entretanto, existem algumas limitações na atual terapêutica como reincidência de úlceras em usuários de DAINÉ ou baixa eficácia em úlceras não associadas a *H. pylori* ou DAINÉ (Yuan *et al.*, 2006), o que torna necessário investigar novas substâncias para o tratamento de úlcera.

1.6. Plantas medicinais

Plantas são utilizadas na medicina popular, há milhares de anos, no tratamento das mais diversas enfermidades. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais, sendo a maioria de países em desenvolvimento (Gurib-Fakim, 2006). O conhecimento tradicional sobre o uso das plantas é, em muitos casos, o único recurso terapêutico disponível às populações rurais desses países, tais como o Brasil (Agra *et al.*, 2008; Veiga-Junior, 2008). Nestas localidades, em geral, não existem farmácias comerciais e o suprimento de medicamentos do Sistema Único de Saúde (SUS) é irregular e, portanto, conhecimento e utilização de plantas medicinais são de grande valor para essas populações (de Jesus *et al.*, 2009).

A fitoterapia, baseada em observações empíricas acumuladas e transmitidas ao longo das gerações, permite utilizar o conhecimento popular sobre o uso terapêutico de plantas como base para extração, estudo, isolamento e purificação de compostos com ação farmacológica. Plantas são fontes de diversos fármacos utilizados clinicamente: um quarto

dos medicamentos é de origem vegetal ou contêm substâncias sintetizadas a partir de estruturas encontradas em plantas (Gurib-Fakim, 2006). A investigação farmacológica de espécies vegetais oferece grandes avanços no tratamento de várias doenças, além de ferramentas para o estudo de fisiologia e farmacologia (Dohadwalla, 1985).

Apesar do atual avanço tecnológico para o desenvolvimento de novas drogas, produtos naturais provenientes de plantas ou outras fontes biológicas permanecem como fonte infindável de novos fármacos (Schmidt *et al.*, 2008; Saklani & Kutty, 2008). Li & Vederas (2009) consideram essas novas tecnologias como forma de acelerar o desenvolvimento de drogas obtidas de fontes naturais. Nas últimas décadas, aumentaram as pesquisas para obtenção de novas drogas antiúlcera de fontes naturais (Souza Brito *et al.*, 1997; de Sousa Falcão *et al.*, 2008; Mota *et al.* 2009). Uma das mais novas drogas utilizada como ferramenta farmacológica, a carbenoxona, é derivada do ácido glicirretínico, extraído de *Glycyrrhiza glabra* ou alcaçuz (Barrowman & Pfeiffer, 1982 *apud* Barbastefano, 2007; Asl & Hosseinzadeh, 2008).

O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em megadiversidade, o que representa um vasto potencial de medicamentos a serem descobertos a partir de produtos naturais - plantas, toxinas, animais e microrganismos (Gotlieb, 1981; Mittermeier *et al.*, 2005). Entretanto, um levantamento do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil entre 2007 e 2008, indicou que apenas 162 espécies vegetais possuem derivados registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), dentre as quais menos de 30% são nativas da América do Sul. Tal fato pode ser visto como um indicativo da necessidade de maiores investimentos em pesquisa envolvendo a avaliação da eficácia e segurança de espécies medicinais brasileiras para o desenvolvimento de fitoterápicos (Carvalho *et al.*, 2008).

Dentre os biomas com abundância de plantas nativas, o Cerrado é o segundo maior em área do país, ocupando 23% do território nacional, localizado no planalto central (Ribeiro & Walter, 1998). Segundo Proença *et al.* (2000), o Cerrado é o mais brasileiro dos biomas sul-americanos, com vegetação complexa de grande heterogeneidade fitofisionômica; apesar de possuir formação savânica com a maior diversidade vegetal do mundo, esse bioma ainda é pouco conhecido e há carência de estudos voltados para a identificação de plantas úteis do Cerrado (Guarim Neto & Morais, 2003).

Esta diversidade é relativa aos táxons mais elevados (gênero, família e ordem), mostrando a importância do Cerrado para a pesquisa com plantas medicinais. Isto porque quanto maior for a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e diversidade química entre elas (Guarim Neto & Morais, 2003). Entre os gêneros com maior número de espécies nativas estão *Hyptis* (68), *Eriope* e *Tabebuia* (Oliveira & Marquis, 2002; Guarim Neto & Morais, 2003; Souza & Lorenzi, 2005).

1.7. Óleos essenciais

Óleos essenciais (OE), também chamados de óleos voláteis, são produtos obtidos de partes de plantas aromáticas tais como flores, folhas, caules, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes (Burt, 2004). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas que apresentam solubilidade em solventes orgânicos apolares; geralmente, as substâncias são odoríferas e líquidas, com aparência oleosa à temperatura ambiente. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo dos óleos fixos, uma mistura de substâncias lipídicas obtida geralmente de sementes. OE são extraídos, principalmente, através de destilação por arraste com vapor d'água e logo após a extração,

são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados. São poucos os óleos essenciais que apresentam cor e em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais (Simões *et al.*, 2004).

Os constituintes de OE variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre. A maior parte dos OE é constituída de terpenóides, derivados de unidades de isopreno, enquanto a minoria é de fenilpropanóides, formados a partir do ácido chiquímico (Simões *et al.*, 2004).

Em mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações: normalmente dois ou três deles são majoritários (20-70%), outros estão presentes em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades ou apenas traços. A composição química dos OE pode variar conforme o órgão da planta, idade ou estágio do ciclo vegetativo; pode também haver alteração de composição de acordo com condições ambientais, tais como clima e composição do solo (Bakkali *et al.*, 2008).

O uso de OE remonta à Antiguidade em lugares como China, Egito, Grécia e Turquia. Devido a sua fragrância e propriedades medicinais como anti-séptica, bactericida, antivírus e fungicida, tais compostos eram utilizados em embalsamento, conservação de alimentos, cosmetologia, medicina (remédios antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais) e em práticas religiosas (Bakkali *et al.*, 2008). A longa história descrevendo o uso de OE para fins medicinais sugere a presença de alguns componentes farmacologicamente ativos (Wei & Shibamoto, 2010) e estudos recentes reforçam as diversas propriedades medicinais deles (Schnaubelt, 2005); dentre essas atividades estão antioxidante (Mimica-Dukić *et al.*, 2003; Sacchetti *et al.*, 2004;

Sacchetti *et al.*, 2005), anti-inflamatória (de las Heras & Hortelano, 2009; Neves *et al.*, 2010), antinociceptiva (Martínez *et al.*, 2009), antimicrobiana (Mimica-Dukić *et al.*, 2003; Ohno *et al.*, 2003; Burt, 2004; Sacchetti *et al.*, 2004), antifúngica (Sacchetti *et al.*, 2004) e antiulcerogênica (Hiruma-Lima *et al.*, 2000; Moraes *et al.*, 2009).

Atualmente, cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, dentre os quais 10% são comercialmente importantes para as indústrias farmacêutica (na qual são empregados *in natura* para a preparação de infusões ou sob a forma de preparações farmacêuticas simples, destinadas a uso oral), agrônômica, de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), cosmética (perfumes e produtos de higiene) e sanitária (Simões *et al.*, 2004; Bakkali *et al.*, 2008).

Devido a essa utilização crescente nas indústrias, o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos voláteis constituem importantes atividades econômicas. Embora seja difícil estimar, acredita-se que, para obtenção de OE de espécies da família Lamiaceae, sejam cultivados mais de 500 mil hectares, sendo a *Rosmarinus officinalis* L. uma das mais utilizadas e produzidas no mundo (Simões *et al.*, 2004).

1.8. Família Lamiaceae

A família Lamiaceae (Labiatae) é uma das mais empregadas mundialmente como condimento e constitui uma consolidada fonte de extratos com propriedades antioxidante e antibacteriana (Sacchetti *et al.*, 2004). Possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. No Brasil ocorrem 26 gêneros e cerca de 350 espécies (Souza & Lorenzi, 2005).

Nessa família, estão incluídas muitas ervas aromáticas cultivadas no Brasil, como a lavanda (*Lavandula angustifolia*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), poejo (*Mentha pulegium*), alfavaca (*Ocimum basilicum*), alfavacão (*Ocimum gratissimum*), orégano (*Origanum vulgare*), boldo brasileiro (*Plectranthus barbatus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e hortelã (*Mentha* ssp.). Além disso, várias espécies são cultivadas como ornamentais, com destaque para sálvia (*Salvia splendens*), lágrima-de-cristo (*Clerodendron thomsonae*) e cóleus (*Solenostemon scutellarioides*). Essa família tem, portanto, grande importância econômica por ser fonte de OE aromáticos e de plantas ornamentais (Souza & Lorenzi, 2005); além disso, muitas dessas espécies são utilizadas como condimento na culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que proporcionam aos alimentos (Falcão & Menezes, 2003).

1.8.1. *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae)

O gênero *Hyptis* Jacq. é composto por cerca de 350 espécies distribuídas desde o sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina, excluindo-se somente o extremo sul. Algumas espécies invasoras são bem estabelecidas na Ásia, África e norte da Austrália. O centro da diversidade desse gênero encontra-se nos campos cerrados do Brasil, mais especificamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (Harley, 1988; Falcão & Menezes, 2003). *Hyptis* é um gênero rico em espécies de grande importância econômica e etnofarmacológica, cujos conhecimentos são transmitidos de geração a geração até os dias de hoje (Falcão & Menezes, 2003). As populações as utilizam para fins medicinais não só no Brasil (Barbosa & Barbosa, 1992; de Jesus *et al.*, 2009), mas também no México (Pereda-Miranda & Delgado, 1990), Índia (Mukherjee *et al.*, 1984), China (Lee *et al.*,

1988), Equador, Tailândia (Almtorp *et al.*, 1991), Caribe (Porter *et al.*, 1995), Panamá (Gupta *et al.*, 1996) e na África (Onayade *et al.*, 1990; Aycard *et al.*, 1993).

As espécies do gênero *Hyptis* são aromáticas e frequentemente utilizadas no tratamento de infecções gastrintestinais, cólicas, dor, doenças de pele (Corrêa, 1931), rinofaringite, congestão nasal e febre (Malan *et al.*, 1988; Rojas *et al.*, 1992). Um levantamento bibliográfico realizado sobre o gênero *Hyptis* revelou que 25 espécies foram estudadas sob os aspectos etnofarmacológicos, farmacológicos e de composição química (Falcão & Menezes, 2003). Estudos indicam atividades antifúngica (Pandey *et al.*, 1982; Singh *et al.*, 1992), antibacteriana (Iwu *et al.*, 1990; Asekun *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2008), antinociceptiva (Arrigoni-Blank *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2007), anti-inflamatória (Bispo *et al.*, 2001; Falcão *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006), antioxidante (Silva *et al.*, 2009) e antiulcerogênica (Barbosa & Ramos 1992) para algumas espécies de *Hyptis*.

1.8.2. *Hyptis spicigera* Lam. syn *Hyptis lophanta* Mart. ex Benth. (Lamiaceae)

Hyptis spicigera Lam., sinônimo de *Hyptis lophanta* Mart. ex Benth. (Figura 4), é muito frequente no Centro-Oeste do Brasil, uma região de Cerrado, onde infesta solos cultivados em geral, beira de estradas e terrenos baldios; é também conhecida como catirina, hortelã, fazendeiro, cheirosa, cheirosa-de-espiga ou buchinha do cerrado. A espécie prefere solos férteis e úmidos, florescendo durante os meses de abril a julho, com um ciclo de mais de cem dias; sua presença em uma lavoura é facilmente notada por ser fortemente aromática. A *Hyptis spicigera*, nativa do Brasil e facilmente diferenciada das demais *Hyptis* pela forma de sua inflorescência, é uma planta anual, ereta, ramificada e herbácea, de caule quadrangulado e estriado que varia de 80 a 200 cm de altura; que se propaga apenas por sementes (Lorenzi, 2000).

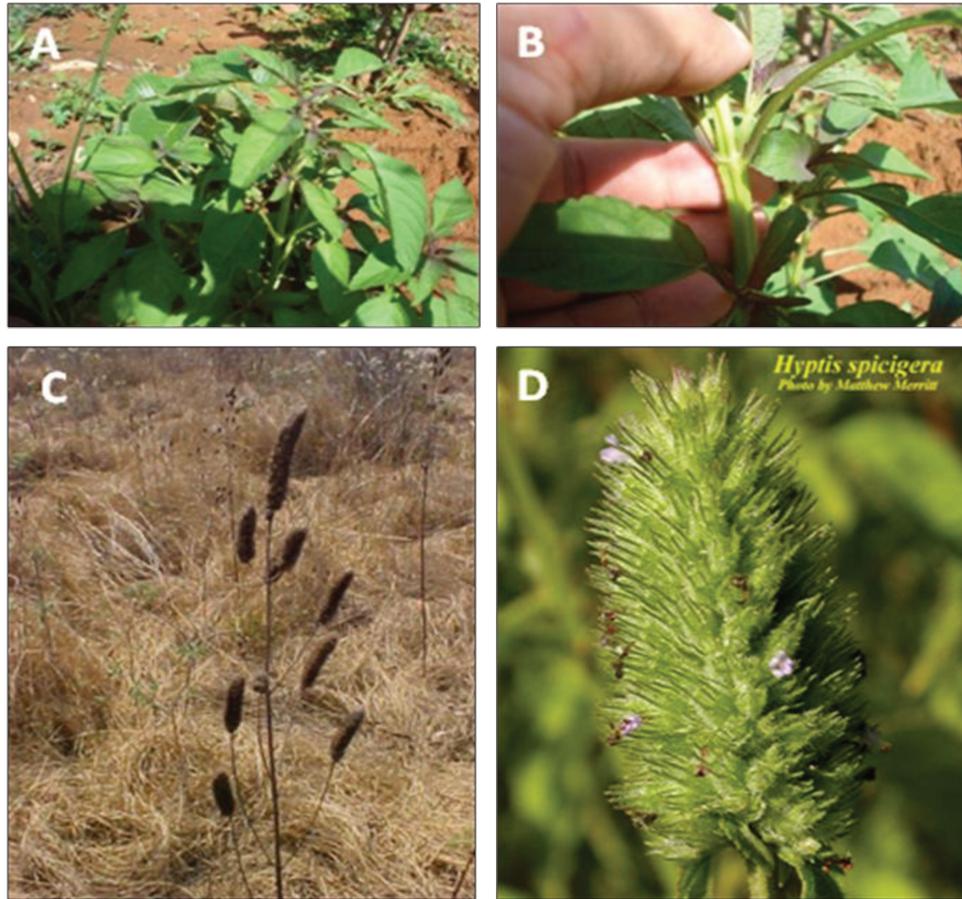


Figura 4: *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). (A) e (B) Parte aérea de *H. spicigera*, (C) Planta seca com inflorescências. Fotos tiradas por Adriano Galvão de Carvalho e (D) Detalhe de uma inflorescência de *H. spicigera*.

No México, onde é conhecida como “hierba del burro”, é utilizada por fazendeiros no controle de insetos contra infestações em grãos armazenados, sendo também utilizada como repelente; suas partes aéreas são utilizadas como condimentos e também para fins medicinais, no tratamento de distúrbios gastrintestinais, infecções de pele, feridas e picadas de insetos (Fragoso-Serrano *et al.*, 1999; Pereda-Miranda *et al.*, 2001). Essa espécie é também popularmente conhecida em alguns países da África, sendo utilizada no tratamento de diarreia, disenteria, gripes, resfriados, dor de cabeça, entre outros (Ladan *et al.*, 2009). O

extrato de suas folhas apresentou atividade antimicrobiana (Ladan *et al.*, 2009), anticonvulsivante e sedativa (Ngo Bum *et al.*, 2009).

No Brasil, o OE de *Hyptis spicigera* é indicado para tratar dores musculares, pancadas, luxações e problemas digestivos, mas não há estudos que confirmem os usos populares. Por essa razão, a espécie *Hyptis spicigera* foi selecionada para este projeto a fim de avaliar o potencial antiulcerogênico de seu óleo essencial, assim como possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Contribuir com o entendimento da fisiopatologia da úlcera gástrica através da investigação da atividade antiulcerogênica do óleo essencial de *Hyptis spicigera*, na perspectiva de uma nova alternativa terapêutica.

Objetivos específicos:

- Analisar a composição química do óleo essencial de *Hyptis spicigera* (OEH).
- Avaliar a atividade antiulcerogênica do OEH em modelos experimentais.
- Avaliar os mecanismos envolvidos na atividade antiulcerogênica do OEH.
- Avaliar o potencial cicatrizante na atividade antiulcerogênica do OEH.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do OEH.
- Avaliar os mecanismos antioxidantes na atividade antiulcerogênica do OEH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Óleo essencial

OEH foi adquirido da Laszlo aromaterapia Ltda. Partes aéreas de *H. spicigera* foram coletadas no Distrito de Caatinga (João Pinheiro, MG-Brasil), uma região de Cerrado, por Adriano Galvão de Carvalho da Raizando Óleos Essenciais, que extraiu o OEH e forneceu amostras da espécie para confirmação botânica. OEH foi extraído através de destilação por arraste com vapor d'água a partir das inflorescências, folhas e caules de *H. spicigera*. Sua exsicata foi analisada e identificada pelo Prof. Jorge Yoshio Tamashiro, do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – UNICAMP e depositada no Herbário da UNICAMP (HUEC, nº 150422).

3.2. Análise química do óleo essencial

A identificação dos componentes químicos do OEH foi feita por cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-EM, Shimadzu GC-2010). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária (DB-5; 5,30 m x 0,32mm x 0,25 µm), com temperatura de injetor 250 °C, razão de split 1:30, detector com temperatura de 250°C, hélio como gás de arraste (1,52 mL/min, White Martins, 99,9%) e volume injetado de 1µL de amostra diluída em clorofórmio (1:100). O aquecimento da coluna foi programado para 60° (3 min) - 220°C (5 min) a 3°C/min, com tempo total de corrida de 40 min. O espectro de massa foi de 40 a 600 u.m.a..

Os constituintes de OEH foram identificados por comparação de seus espectros de massas com aqueles da biblioteca do sistema CG-EM (NIST 62 lib), com a literatura, bem como por comparação do índice de retenção de Kovats (Adams, 1995). Esse índice foi calculado através da equação de Kovats, utilizando-se uma solução padrão de hidrocarbonetos (C₈ a C₂₀). Todos os procedimentos de análise foram realizados no

Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – UNICAMP, com colaboração do Prof. Dr. Marcos José Salvador.

3.3. Animais

Foram utilizados ratos machos Unib: WH (150 a 250 g), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB-UNICAMP), aclimatados às condições do laboratório por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, em temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos claro-escuro de 12h controlados, alimentados com ração nuvital (Nuvilab) e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP, protocolo nº 1537-1).

3.4. Avaliação da atividade antiulcerogênica

Com base em suas respectivas especificações, cada modelo experimental incluiu um controle positivo (lansoprazol, carbenoxolona ou cimetidina) e negativo (veículo-Tween 80, 12%, 10 mL/Kg). Após cada experimento, os animais foram sacrificados, seus estômagos foram removidos e abertos na região de maior curvatura, prensados entre duas placas de vidro e fotografados para a quantificação da área de lesão ulcerativa por meio do programa Bioview 4 (AVSoft, Brasil).

3.4.1. Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto

Esse protocolo experimental foi realizado como descrito por Morimoto *et al.*, 1991. Os animais ($n = 7$, por grupo) foram mantidos em jejum por 24 horas antes do experimento, com livre acesso à água e então tratados com veículo, lansoprazol (30 mg/Kg) ou OEH (12,5; 25; 50 e 100 mg/Kg), oralmente por gavagem. Uma hora depois, os animais receberam por via oral etanol absoluto (10 mL/Kg) e foram sacrificados por deslocamento

cervical uma hora após a administração de etanol. Os estômagos foram removidos para quantificação das lesões, conforme descrito anteriormente.

3.4.2. Úlcera gástrica induzida por indometacina (DAINE)

A metodologia utilizada foi descrita por Hayden *et al.*, (1978). Após 24 horas de jejum, os animais ($n = 7$, por grupo) foram tratados (via oral) com veículo, cimetidina (100 mg/Kg) ou OEH (100 mg/Kg). Meia hora após o tratamento, a lesão gástrica foi induzida por administração subcutânea de indometacina (30 mg/Kg). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 4 horas após a administração de indometacina. Os estômagos foram removidos e abertos no sentido da maior curvatura para a quantificação das áreas das lesões ulcerativas, conforme descrito anteriormente.

3.5. Avaliação dos mecanismos protetores da mucosa gástrica

3.5.1. Parâmetros do suco gástrico

Os animais ($n = 7$, por grupo) permaneceram em jejum durante 24 horas, com livre acesso a água. Uma hora após o tratamento oral ou imediatamente depois da administração intraduodenal do veículo, cimetidina (100 mg/Kg) ou OEH (100 mg/Kg), realizou-se a ligadura do piloro, conforme metodologia descrita por Shay *et al.* (1945) com algumas modificações (Batista *et al.*, 2004). Quatro horas depois, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos removidos. O conteúdo estomacal foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante teve seu volume e pH mensurados por um pHmetro digital (PA 200, Marconi S.A., Piracicaba).

3.5.2. Muco aderido à mucosa gástrica

Após 24h de jejum, os animais ($n = 7$, por grupo) foram tratados por administração oral de veículo, carbenoxolona (200 mg/Kg) ou OEH (100 mg/Kg). Uma hora depois, os animais sob anestesia (50 mg/Kg de ketamina e 10 mg/Kg de xilazina) foram submetidos a uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a ligadura do piloro. Quatro horas após a ligadura, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, as porções glandulares dos estômagos foram separadas, pesadas e imersas em solução de Alcian Blue para o procedimento de quantificação de muco. A leitura das absorbâncias foi realizada a 598 nm e os resultados foram expressos como μg de Alcian Blue/g de tecido (Rafatullah *et al.*, 1990).

3.5.3. Níveis de prostaglandina (PGE_2)

A metodologia foi realizada segundo Curtis (1995). Os animais permaneceram em jejum durante 24 horas e foram aleatoriamente divididos em grupos ($n = 7$, por grupo) sham, veículo+DAINE e OEH+DAINE. Primeiramente, DAINÉ - indometacina dissolvida em solução de bicarbonato de sódio 5% (30 mg/Kg) - foi administrada pela via subcutânea. Meia hora depois, os animais foram tratados (via oral) com veículo ou OEH (100 mg/Kg) e meia hora após o tratamento oral, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos removidos. As porções glandulares dos estômagos foram raspadas, pesadas e suspensas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10mM, pH 7,4). Os raspados foram homogeneizados com Polytron (PT – 10 – 35, Kinematica AG – Switzerland) e encubados a 37° C por vinte minutos. Os níveis de PGE_2 foram quantificados utilizando-se um kit de dosagem imuno-enzimática (R&D Systems, EUA).

3.5.4. Óxido nítrico (NO) e compostos com grupamento sulfidril (G-SH) na gastroproteção

A metodologia foi realizada de acordo com Arrieta e colaboradores (2003). Os animais foram divididos em seis grupos ($n = 7$, por grupo) e pré-tratados com salina; L-NAME (L-nitro arginina metil-éster, 70 mg/Kg), um inibidor da síntese de NO ou NEM (N-etilmaleimida, 10 mg/Kg), um bloqueador dos compostos com G-SH. Trinta minutos após o pré-tratamento, os animais receberam por via oral veículo, carbenoxolona (100 mg/Kg) ou OEH (100 mg/Kg). Uma hora depois, todos os grupos tiveram a úlcera induzida por etanol absoluto (10 mL/Kg). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical uma hora após a administração de etanol e seus estômagos foram removidos para a quantificação das áreas de lesão ulcerativa.

3.6. Avaliação da atividade cicatrizante

3.6.1. Úlcera gástrica induzida por ácido acético

Nesse modelo de indução de úlcera gástrica, os animais ($n = 7$, por grupo) não permaneceram em jejum. Eles foram anestesiados (50 mg/Kg de ketamina e 10 mg/Kg de xilazina) para aplicação de 100 μ L de ácido acético absoluto na camada subserosa da junção do fundo com o antro do estômago. Dois dias após a cirurgia, os tratamentos (via oral) com veículo, cimetidina (100mg/Kg) e OEH (100mg/Kg) foram administrados uma vez ao dia, durante 14 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados no 15º dia por deslocamento cervical, seus estômagos removidos para quantificação das lesões e processados para as análises de *western blotting* e análise histológica (Okabe & Amagase, 2005).

3.6.2. COX-2 e EGF

As porções glandulares dos estômagos obtidos a partir de ratos submetidos à indução de úlcera por ácido acético foram homogeneizadas em 1mL de tampão (PB 0,1M, pH 7,4 com inibidor de protease 1%). Os homogenatos foram centrifugados (12000 rpm, 15 min, 4°C) e seus sobrenadantes coletados e armazenados a -80°C para posterior análise de *western blotting*. A concentração protéica dos homogenatos foi determinada conforme o método de Bradford (1976). Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (tampão PB 0,5M, pH6,8; glicerol; dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; bromofenol 0,1% e β-mercaptoetanol) em uma proporção de 1:1. Para cada amostra, 100 µg de proteínas foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese, a qual foi incubada com anticorpos primários específicos para EGF (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e COX-2 (Cayman Chemical, EUA), em uma diluição de 1:500. Cada membrana foi lavada três vezes por 10 minutos e incubadas com anticorpos secundários anti-goat (Zymed Laboratories, EUA) para EGF e anti-rabbit (Zymed Laboratories, EUA) para COX-2, ambos na diluição de 1:5000. Como controle, foi utilizado o anticorpo para a β-actina (Sigma-Aldrich, EUA), uma proteína constitutiva. A imunodeteção foi realizada utilizando-se um kit detector de luz quimioluminescente (SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate, Pierce, EUA). A análise densiométrica foi feita com normalização ao controle (proteína constitutiva) utilizando-se o programa Bioview 4 (AVSoft, Brasil).

3.7. Avaliação dos parâmetros toxicológicos

Os parâmetros toxicológicos foram avaliados conforme o método estabelecido por Souza Brito (1994), nos animais submetidos aos tratamentos com veículo, cimetidina e OEH (100mg/kg), sem terem a úlcera induzida. Durante o período de 14 dias, os efeitos do tratamento com OEH foram observados diariamente (progressão do peso corpóreo, alterações na pelagem e nas fezes). Também, verificaram-se os efeitos de OEH (100 mg/Kg) no peso dos seguintes órgãos: coração, pulmões, fígado e rins.

3.8. Análise histológica

Após 14 dias de tratamento no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético, os animais foram sacrificados, seus estômagos removidos e abertos no sentido da maior curvatura. As amostras foram fixadas em ALFAC (formalina 40%; ácido acético 100%; etanol 80%) e incluídas em paraplast para análise histológica com coloração por ácido periódico de Schiff (PAS), um marcador de glicoproteínas (Vacca, 1985).

3.9. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Os experimentos *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante do OEH foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – UNICAMP, em colaboração do Prof. Dr. Marcos José Salvador.

3.9.1. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

O radical DPPH (1,1-difenil-1-picril-hidrazila) é estável de coloração púrpura; porém, quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade do OEH de reduzir o radical DPPH. Para tanto, 5,2 mg de OEH foram dissolvidos em 250 µl de etanol, obtendo-se uma solução estoque. Várias diluições foram preparadas em etanol, com concentrações finais no ensaio de 25 a 800 ppm. Para cada

amostra (10 µL) foram adicionados 100 µL de etanol, 100 µL de tampão fosfato (100 mM) e 50 µL de solução de DPPH (250 µM). Decorridos 30 min, a absorbância foi medida em leitor de elisa ($\lambda=517$ nm) e a porcentagem de redução do radical foi calculada pela equação: % redução = $100 - [(Abs. Amostra - Abs. controle negativo)/Abs. controle DPPH - Abs. controle negativo] \times 100$ (Cuendet *et al.*, 1997; Ou *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo, o flavonóide quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.9.2. Avaliação da capacidade de absorção de radicais de oxigênio – (ORAC-FL)

A capacidade antioxidante do OEH foi também avaliada pelo método ORAC-FL (*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*), o qual mede a capacidade antioxidante contra radicais peroxil utilizando fluoresceína como marcador de fluorescência. Esse método foi realizado em um sistema de leitura multi-detectora em microplaca, Synergy HT. A temperatura de incubação foi de 37°C. Esses procedimentos foram realizados conforme o método estabelecido por Ou e colaboradores (2001), com modificações (Salvador *et al.*, 2006). Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes do Trolox (TE) por grama de óleo essencial (µmol TE/g), que corresponde à quantidade de Trolox que tem a mesma atividade antioxidante para o radical peroxil em 1 g de amostra; ou como equivalentes relativos ao Trolox (TE), para os controles positivos. As análises foram realizadas em triplicata.

3.10. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

Para avaliar a atividade antioxidante *in vivo* do OEH, foram feitas medições da atividade de enzimas antioxidantes e produtos da oxidação da mucosa gástrica, em relação aos índices de lesão ulcerativa obtidos em modelo experimental de úlcera induzida por

etanol absoluto (Morimoto *et al.*, 1991). Os animais foram divididos em quatro grupos ($n = 7$, por grupo): Sham, Veículo, Lansoprazol (30 mg/Kg), OEH (100 mg/Kg). O grupo Sham foi formado por animais não tratados, expostos aos procedimentos experimentais, mas sem efetiva indução de úlcera. Os estômagos foram abertos ao longo da maior curvatura e as suas porções glandulares foram raspadas com lâminas de vidro e homogeneizadas em 1mL de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4). Os homogenatos permaneceram congelados a -70°C , até a realização dos ensaios bioquímicos. As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente e os resultados expressos em nmol/min/mg de proteína. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina do soro bovino para estabelecimento da curva padrão.

3.10.1. Índice de peroxidação lipídica (LPO)

A determinação do índice de peroxidação lipídica foi realizada conforme o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979). O homogenato da mucosa foi diluído em KCl 0,15M (relação 1:10). Em seguida, a 0,5 mL deste homogenato foram adicionados 0,2 mL do dodecil sulfato (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%, solução ajustada com NaOH a pH 3,5), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) e 0,3 mL de água destilada. Todas as amostras foram deixadas em banho-maria, com termostato ajustado para 95°C por 1 hora. Após este período, as amostras foram resfriadas e a elas foram adicionados 1 mL de água destilada e 5 mL de n-butanol. Posteriormente, foram agitadas por 1 minuto e centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos. A absorbância da capa orgânica foi determinada a 532 nm. Os resultados foram expressos como pmols de TBARS por mg de proteínas.

3.10.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO, uma evidência da infiltração de neutrófilos, foi determinada de acordo com método descrito por Krawisz e colaboradores (1984). Vários trabalhos apresentam aumento na atividade da MPO associado à úlcera gástrica (Smith *et al.*, 1987; Andrews *et al.*, 1994; de la Lastra, *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1997; Derin *et al.*, 2006). As amostras do raspado da mucosa gástrica foram centrifugadas a 12000 rpm, por 15 min, a 4°C. A uma alíquota do sobrenadante foi adicionada solução de O-dianisidina (0,167 g/L) e 0,0005% H₂O₂ em tampão fosfato 50mM, pH 6,3, na proporção de 1:30. As absorbâncias foram lidas a 460 nm, por 10 minutos e os resultados expressos em U/g de proteína.

3.10.3. Grupamentos sulfidrila (GSH)

A determinação de GSH foi realizada conforme o método descrito por Faure & Lafond (1995). As amostras foram centrifugadas (12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,4). A seguir, fez-se a leitura da absorbância de 100 µL da amostra, acrescidos de 100 µL de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura foram adicionados 20 µL de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) [DTNB 0,01mM], diluído em metanol e nova leitura (A2) foi realizada a 412 nm decorridos 15 minutos de reação. A concentração de grupamentos sulfidrila (tiol) foi determinada por $(A1 - A2) \times 1,57$.

3.10.4. Atividade da glutatona redutase (GR)

A atividade dessa enzima foi determinada seguindo-se espectrofotometricamente a oxidação de NADPH a 340 nm (Carlberg & Mannervik, 1985). A reação enzimática foi constituída de: PB 1M, pH 7; 0,2 mM EDTA; 1 mM GSSG e 0,1 mM de NADPH. O

consumo de NADPH foi determinado pela diminuição da absorbância a 340 nm. O coeficiente de extinção para o NADPH é $6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.10.5. Atividade da glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método de Yoshikawa *et al.* (1993). Ao raspado da mucosa estomacal foram adicionados 0,25 mM H_2O_2 , 10 mM de glutathione reduzida, NADPH 4mM e 1 U de enzima glutathione redutase em PBS, pH 7,8. As absorbâncias foram lidas a cada minuto em espectrofotômetro, a 365 nm, entre um e 10 minutos.

3.10.6. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada, conforme método descrito por Winterbourn e colaboradores (1975), pela inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo radical superóxido gerado através do sistema hipoxantina / xantina oxidase (XO), a 37°C . A reação enzimática foi composta de: PB 0,1 M, pH 7,4; 0,07 U de XO/ml; 100 μM hipoxantina; 600 μM NBT e 1 mg/mL de proteína da amostra. Os resultados foram expressos como U/mg proteínas.

3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), com teste *a posteriori* de Dunnett ou Tukey, com um nível de significância mínimo de $p < 0,05$ em todas as análises (Prisma, USA).

4.1. Análise química do OEH

A análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) do OEH indicou 14 compostos, dentre os quais três monoterpenos majoritários: α -pineno (50,8%), cineol (20,3%) e β -pineno (18,3%) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Hyptis spicigera* (OEH), segundo análise feita por CG-EM.

Pico	Substância	Área (%)
1	α -tujeno	0,2
2	α-pineno	50,8
3	Sabineno	1,1
4	β-pineno	18,3
5	β -myrceno	0,1
6	α -phellandreno	0,3
7	β -cymeno	0,2
8	Cineol	20,3
9	Copaeno	0,2
10	β -bourboneno	0,3
11	Cariofileno	7,0
12	Humuleno	0,4
13	Germacreno D	0,1
14	Óxido de cariofileno	0,6

O cromatograma de OEH pode ser visualizado na Figura 5.

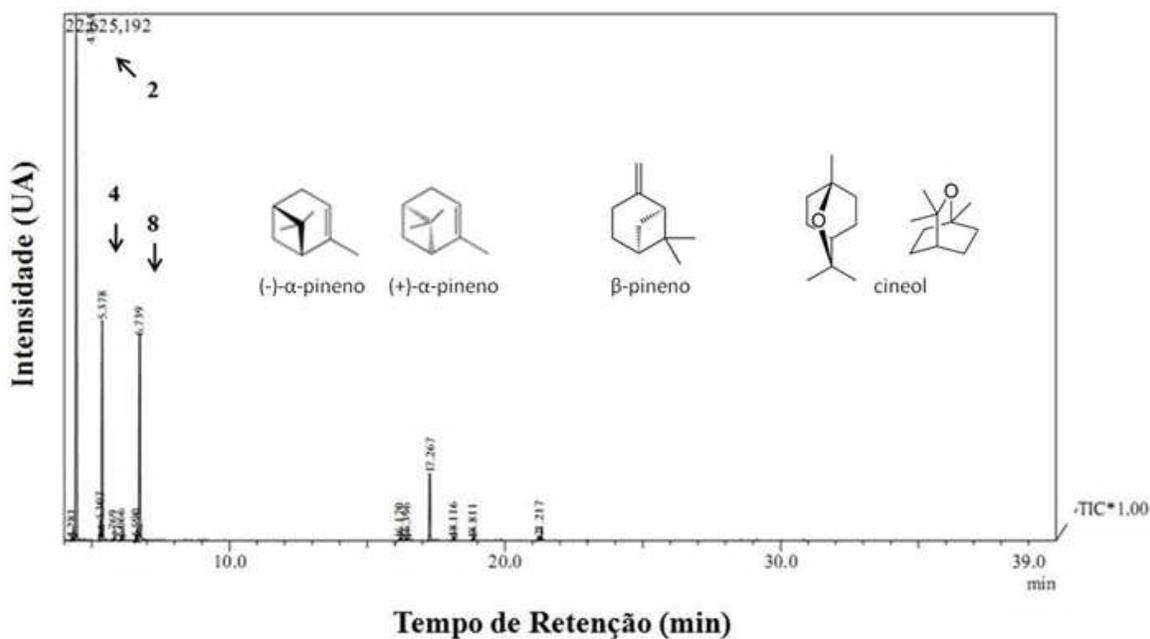


Figura 5: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de *Hyptis spicigera*. UA, unidades arbitrárias.

4.2. Atividade antiulcerogênica do OEH

No modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, quatro doses de OEH foram testadas: 12,5; 25; 50 e 100 mg/Kg. OEH apresentou significativa gastroproteção (97%) na dose de 100 mg/Kg, a qual foi selecionada para os demais ensaios a fim de se verificar os mecanismos envolvidos nessa atividade gastroprotetora. No modelo de úlcera gástrica induzida por DAINÉ, OEH também foi capaz de proteger a mucosa gástrica na dose de 100 mg/Kg (com 84% de redução da área de lesão ulcerativa em comparação ao Veículo). Ambos os resultados estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeito do óleo essencial de *H. spicigera* (OEH) em modelos de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto e DAINÉ em ratos. As áreas de lesão ulcerativas estão representadas como média \pm e.p.m.

Modelos Experimentais	Tratamentos (v.o.)	Dose (mg/Kg)	A.L.U (mm²)	Proteção (%)
Etanol absoluto	Veículo	-	149.90 \pm 29.79	-
	Lansoprazol	30	43.10 \pm 5.48**	71
	OEH	12,5	75.96 \pm 24.41	49
		25	89.24 \pm 13.89	40
		50	74.35 \pm 20.84	50
		100	4.28 \pm 2.03***	97
DAINE	Veículo	-	20.67 \pm 5.07	-
	Cimetidina	100	0.68 \pm 0.17***	97
	OEH	100	3.28 \pm 1.06***	84

ANOVA seguida de teste de Dunnet, ** p<0,01; ***p<0,001, em relação ao grupo controle negativo tratado com veículo.

4.3. OEH nos parâmetros ácido-gástricos

Os resultados da avaliação dos parâmetros ácido-gástricos de animais submetidos ao tratamento com OEH administrado por diferentes vias, oral e intraduodenal (sistêmica) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Efeito do óleo essencial de *H. spicigera* (OEH), administrado em diferentes vias, nos parâmetros ácido-gástricos em ratos submetidos à ligadura de piloro. Dados expressos como média ± e.p.m.

Via	Tratamentos	Dose (mg/Kg)	Volume do suco gástrico (mL)	pH (unidades)
Intraduodenal	Veículo	-	0.94 ± 0.07	1.62 ± 0.07
	Cimetidina	100	0.49 ± 0.07*	1.60 ± 0.06
	OEH	100	1.02 ± 0.17	1.41 ± 0.07
Oral	Veículo	-	0.82 ± 0.15	2.44 ± 0.18
	Cimetidina	100	1.68 ± 0.18**	5.10 ± 0.08***
	OEH	100	1.02 ± 0.25	2.07 ± 0.20

ANOVA seguida de teste de Dunnet, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 comparados ao grupo controle negativo tratado com veículo.

Verificou-se que nos animais submetidos à ligadura de piloro por nenhuma das duas vias de administração utilizadas para OEH foi capaz de alterar o volume e o pH do suco gástrico.

4.4. OEH na produção de muco gástrico

Os resultados obtidos para os efeitos do OEH em animais submetidos à ligadura do piloro sobre a produção de muco gástrico estão demonstrados na Figura 6.

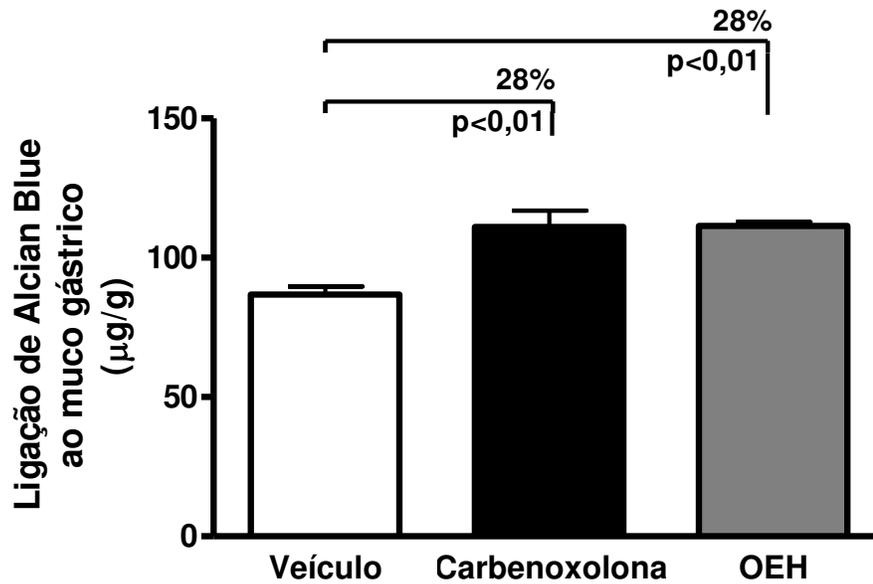


Figura 6: Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica em ratos tratados com OEH. Resultados expressos como média \pm e.p.m. ANOVA seguida de teste de Dunnet.

Os animais tratados com OEH apresentaram aumento em 28% na quantidade de muco aderido à mucosa gástrica, em comparação com o grupo controle veículo, demonstrando que OEH apresenta atividade citoprotetora.

4.5. OEH nos níveis gástricos de prostaglandina (PGE_2)

Os dados obtidos no experimento do efeito do OEH sobre os níveis gástricos de PGE_2 estão demonstrados na Figura 7.

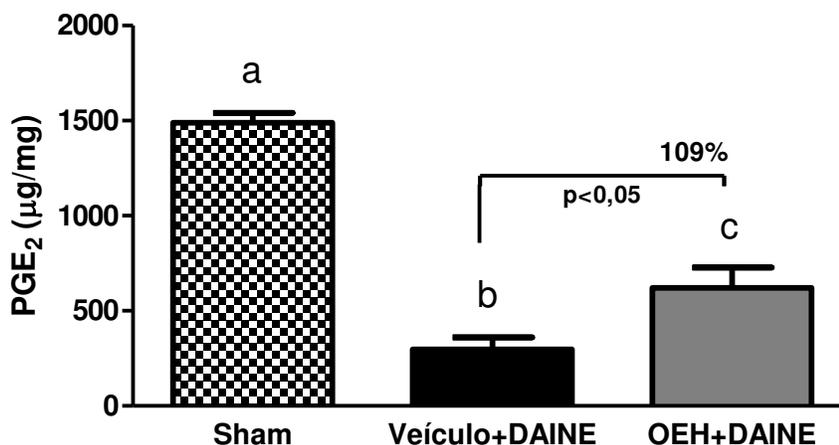


Figura 7: Quantificação dos níveis de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos tratados com OEH. Resultados estão expressos como média ± e.p.m. ANOVA seguida por teste de Tukey. Diferentes letras (a, b ou c) representam diferenças estatísticas entre os grupos.

OEH, administrado concomitantemente à indometacina (DAINE), inibidora da ciclooxigenase, não foi capaz de manter os níveis de PGE₂ similares ao grupo Sham. Mas, quando comparado ao grupo veículo+DAINE, OEH foi capaz de manter os níveis altos de PGE₂.

4.6. OEH sobre óxido nítrico (NO) e compostos com grupamentos sulfidril (G-SH)

A Tabela 4 mostra o resumo dos efeitos de OEH na mucosa gástrica de animais submetidos à úlcera induzida por etanol absoluto e demonstra se NO e compostos com G-SH participam na gastroproteção promovida por OEH.

Tabela 4. Efeito do tratamento oral com óleo essencial de *H. spicigera* (OEH) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos pré-tratados com L-NAME ou NEM.

Pré-tratamento	Tratamento	Dose (mg / kg, v.o.)	A.L.U. (mm ²)	Inibição (%)
Salina (i.p.)	Veículo	-	292.50 ± 13.18	-
	Carbenoxolona	100	13.52 ± 1.76***	95
	OEH	100	14.59 ± 6.58***	95
L-NAME (i.p.)	Veículo	-	870.80 ± 48.70	-
	Carbenoxolona	100	737.90 ± 29.16*	15
	OEH	100	81.30 ± 28.61***	91
Salina (i.p.)	Veículo	-	229.70 ± 25.66	-
	Carbenoxolona	100	15.49 ± 4.97***	93
	OEH	100	13.36 ± 5.52***	94
NEM (i.p.)	Veículo	-	364.30 ± 18.46	-
	Carbenoxolona	100	256.60 ± 21.35*	30
	OEH	100	103.30 ± 33.49***	72

Dados expressos como média ± e.p.m. ANOVA seguida de teste de Dunnet, *p<0,05; ***p<0,001, em relação ao grupo controle negativo tratado com veículo.

Quando os animais foram pré-tratados com L-NAME, um inibidor da enzima NO-sintase, OEH continuou exercendo seu efeito gastroprotetor mesmo sem atividade dessa enzima; esse resultado demonstra que a atividade de OEH não depende de NO. O mesmo foi observado em animais pré-tratados com NEM, um inibidor dos G-SH. O óleo essencial manteve sua ação protetora mesmo sem os compostos sulfidríla, demonstrando que a atividade gastroprotetora de OEH também não depende dos compostos com G-SH.

4.7. Atividade cicatrizante do OEH

4.7.1. OEH na úlcera gástrica induzida por ácido acético

Nesse modelo, o tratamento oral com OEH durante 14 dias consecutivos demonstrou que o óleo essencial de *Hyptis spicigera* acelera a cicatrização de úlcera gástrica em ratos, como pode ser observado na Figura 8.

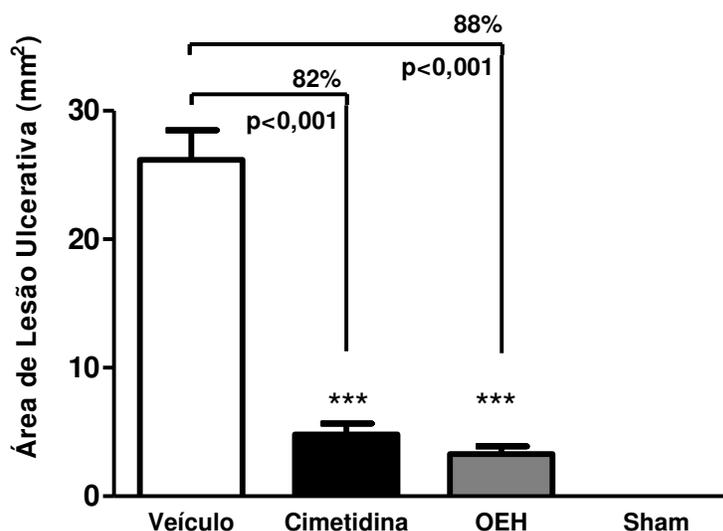


Figura 8: Efeito da administração oral durante 14 dias consecutivos do óleo essencial de *Hyptis spicigera* (OEH, 100 mg/Kg) na cicatrização de úlcera gástrica induzida por ácido acético absoluto em ratos. Dados são expressos como média \pm e.p.m. ANOVA seguida de teste de Dunnet.

OEH diminuiu significativamente a área de lesão ulcerativa em 88% quando comparado ao grupo controle negativo tratado com veículo (p < 0,001).

4.7.2. OEH na expressão gástrica de COX-2 e EGF na úlcera induzida por ácido acético

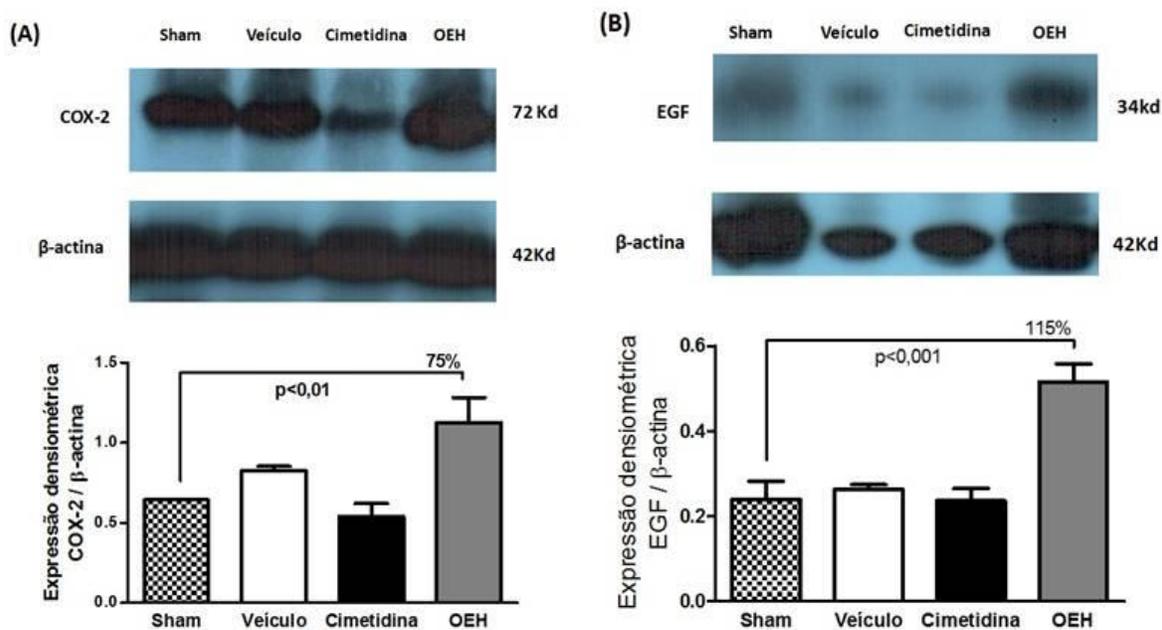


Figura 9: Efeito da administração oral durante 14 dias consecutivos do OEH na expressão de COX-2 (A) e de EGF (B) na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera gástrica induzida por ácido acético absoluto. A análise densiométrica foi realizada seguindo a normalização ao controle (β -actina). Dados estão expressos como média \pm e.p.m. ANOVA seguida de teste de Dunnet.

Análises de *western blotting* revelaram que o tratamento oral com OEH durante 14 dias consecutivos após lesões gástricas induzidas por ácido acético absoluto promoveu um grande aumento na expressão de COX-2 e EGF (Figura 9 A e B, respectivamente) na mucosa gástrica de ratos. O tratamento com OEH aumentou a expressão da enzima COX-2 em 75% e em 115% a expressão de EGF, ambos comparados ao grupo Sham.

4.8. OEH e parâmetros toxicológicos

Os dados resumidos sobre a evolução ponderal de animais submetidos à administração oral sub-crônica (14 dias) de OEH estão na Figura 10.

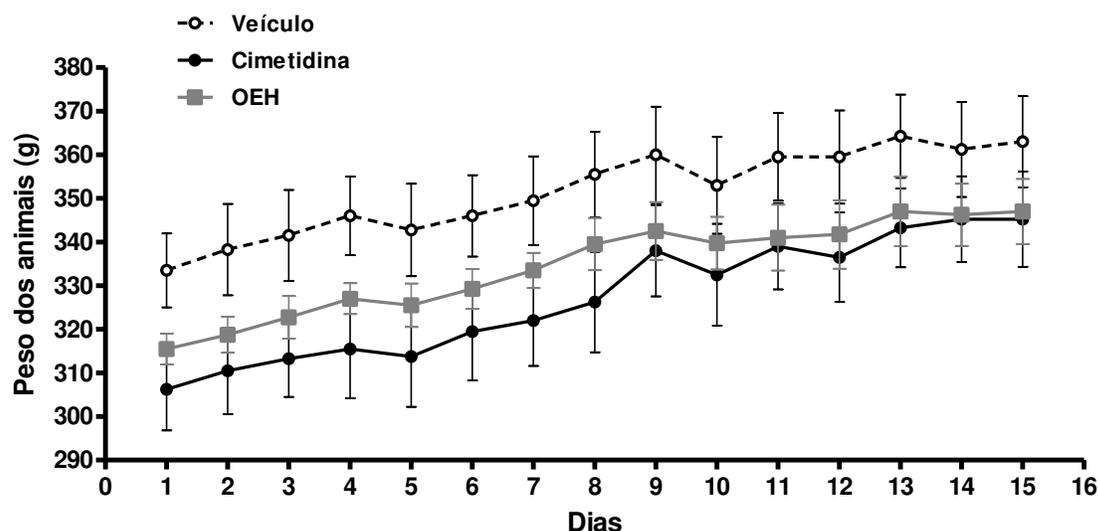


Figura 10: Efeito da administração oral, durante 14 dias consecutivos, do óleo essencial de *Hyptis spicigera* (OEH, 100 mg/Kg) sobre o peso dos animais. Dados expressos como média \pm e.p.m. ANOVA seguida de teste de Dunnet, $p > 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo.

Durante os 14 dias de estudo, pôde-se observar que não houve diferença significativa na progressão dos pesos corpóreos (Figura 10).

Os dados de peso de órgãos importantes para a atividade metabólica, após 14 dias de tratamento por via oral com OEH, estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Relação peso órgãos/ peso corpóreo de animais tratados com veículo, cimetidina (100 mg/Kg) ou OEH (100 mg/Kg) durante 14 dias consecutivos.

Tratamento	Coração	Pulmão	Rins	Fígado
Veículo	3.23 \pm 0.01	5.15 \pm 0.32	4.80 \pm 0.09	10.94 \pm 0.06
Cimetidina	3.21 \pm 0.07	4.73 \pm 0.13	4.92 \pm 0.01	11.27 \pm 0.33
OEH	3.26 \pm 0.03	4.61 \pm 0.39	5.11 \pm 0.03	11.16 \pm 0.19

Os valores foram transformados em arcoseno e os resultados expressos como média \pm e.p.m. ANOVA seguida de teste de Dunnet, $p > 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo.

Também, após 14 dias de administração oral de OEH, pôde-se observar que não houve diferença significativa nos pesos dos órgãos (Tabela 5) para todos os grupos. Além disso, nenhuma anormalidade macroscópica foi detectada nos órgãos avaliados, na pelagem, nem nas fezes dos animais. E não houve mortalidade em nenhum grupo tratado.

4.9. Análise histológica

A Figura 11 confirma, pelo método de PAS, a capacidade de OEH estimular a produção de muco gástrico, demonstrada na Figura 6, pelo método de quantificação de muco aderido à mucosa gástrica.

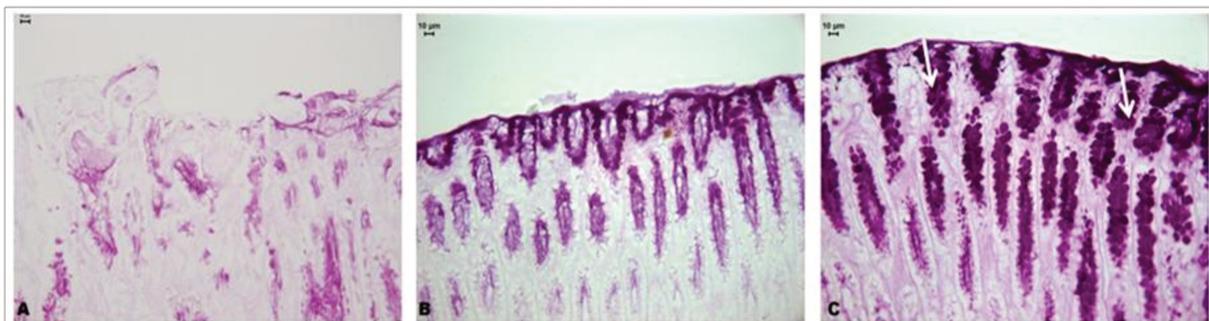


Figura 11: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético. Coloração PAS, um marcador de glicoproteínas. Notar a maior secreção de muco no grupo tratado com OEH (setas). (A) Veículo; (B) Cimetidina; (C) OEH. Barras: 10µm.

Animais tratados com OEH durante 14 dias consecutivos, após indução de úlcera por ácido acético, apresentaram aumento na quantidade de produção de muco, evidenciado pela maior intensidade de células positivas para essa coloração. Pela Figura 11, também é possível observar a integridade da mucosa gástrica dos animais tratados em comparação com o grupo Veículo.

4.10. Atividade antioxidante *in vitro* de OEH

4.10.1. DPPH

A atividade antioxidante do OEH foi inicialmente analisada *in vitro*, através de ensaio de redução do radical DPPH, método indireto, baseado em mecanismos de transferência de elétrons (Tomei *et al.*, 2007). Até a maior concentração analisada (800 ppm) nesse ensaio, OEH não apresentou atividade antioxidante.

4.10.2. ORAC-FL

O método ORAC-FL permite avaliar em ensaio cinético a capacidade antioxidante de uma substância contra radicais peroxil, os quais são ERO comumente produzidas no processo metabólico. Trata-se de um ensaio direto, baseado em mecanismos de transferência de hidrogênio (Tomei *et al.*, 2007), considerando-se ativo toda amostra com valores acima de 700 $\mu\text{mol TE/g}$ (Wu *et al.*, 2004). O resultado de ORAC obtido para OEH pode ser visualizado na Tabela 6 e uma curva ilustrativa do ensaio cinético de OEH está demonstrada na Figura 12.

Tabela 6. Capacidade antioxidante do óleo essencial de *Hyptis spicigera* (OEH)

Amostra	ORAC
OEH ^a	1103.41 (9.42)
Quercetina ^b	5.62 (0.90)
Isoquercitrina ^b	5.25 (1.80)

^aDados expressos como μmol de equivalentes de Trolox por grama ($\mu\text{mol TE/g}$), média (% d.p.r., desvio padrão relativo) das triplicatas.

^bControles positivos. Dados expressos como equivalentes relativos ao Trolox (TE), média (% d.p.r., desvio padrão relativo) das triplicatas.

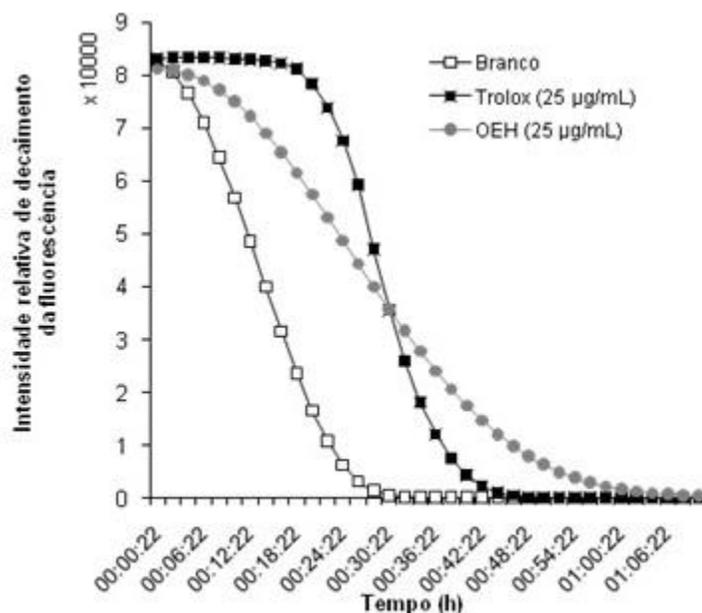


Figura 12: Curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína no ensaio ORAC-FL para os controles experimentais Branco (controle negativo) e Trolox (controle positivo, amostra de referência análogo sintético da vitamina E) e para as amostras de óleo essencial de *Hyptis spicigera* (OEH).

Nesse método, OEH apresentou considerável ação antioxidante (ORAC = 1103,4 $\mu\text{mol TE/g}$ OEH). Sendo assim, procurou-se avaliar a atividade antioxidante *in vivo* desse óleo essencial.

4.11. Atividade antioxidante *in vivo* de OEH

A avaliação da atividade antioxidante *in vivo* do OEH foi realizada com amostras obtidas no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto. A administração oral de etanol absoluto em ratos causa lesões hemorrágicas no estômago, como se observa no

grupo Veículo. O efeito gastroprotetor do pré-tratamento com OEH (100 mg/kg) nesse modelo experimental de úlcera é apresentado na Figura 13.

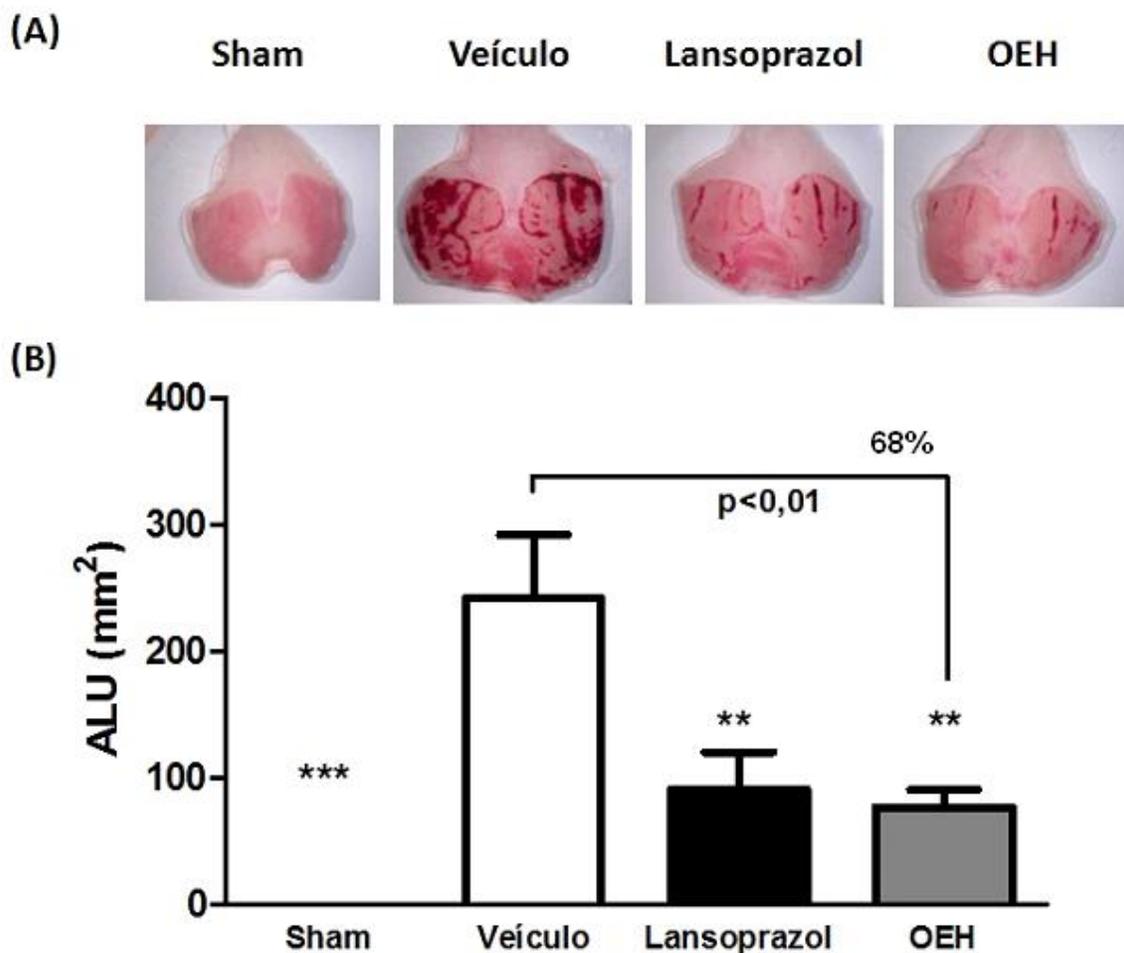


Figura 13: Efeito da administração oral de OEH (100 mg/Kg) na ALU no estômago de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. (A) Visualização macroscópica das lesões. (B) Área de lesão ulcerativa (ALU). Dados expressos em média \pm e.p.m. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnet. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle negativo tratado com veículo.

OEH reduziu em quase 70% a área de lesão ulcerativa em relação ao grupo tratado apenas com veículo, evidenciando possível mecanismo antioxidante envolvido na atividade gastroprotetora de OEH.

4.11.1. Índice de peroxidação lipídica

A concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi analisada como índice de peroxidação lipídica. O efeito de OEH sobre o índice de peroxidação lipídica na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto está demonstrado na Figura 14.

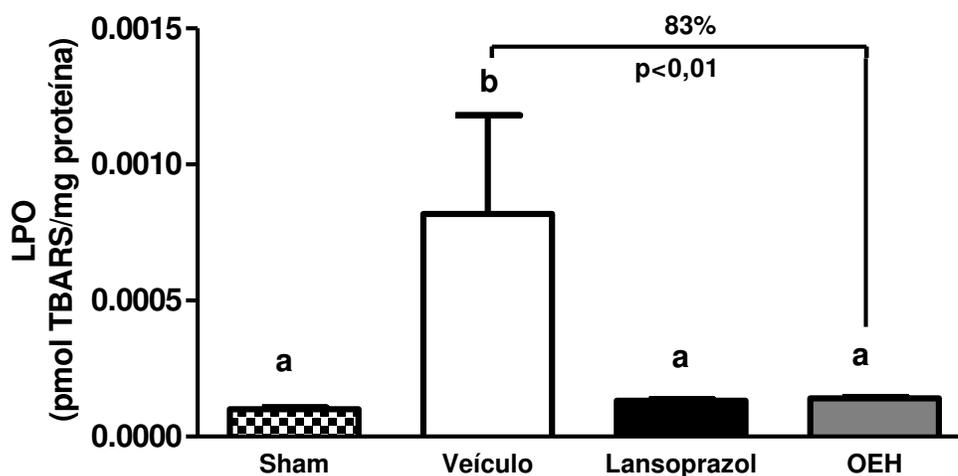


Figura 14: Índice de peroxidação lipídica na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Dados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Tukey. Diferentes letras (a, b) representam diferenças estatísticas entre os grupos.

OEH foi capaz de inibir o índice de peroxidação lipídica em comparação ao grupo controle negativo Veículo, mantendo níveis desse índice similares aos do grupo Sham.

4.11.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO)

O aumento de atividade da enzima MPO indica maior infiltração de neutrófilos no tecido. Os resultados obtidos para efeito do OEH sobre atividade da MPO na mucosa gástrica de animais submetidos à indução de úlcera por etanol absoluto estão apresentados na Figura 15.

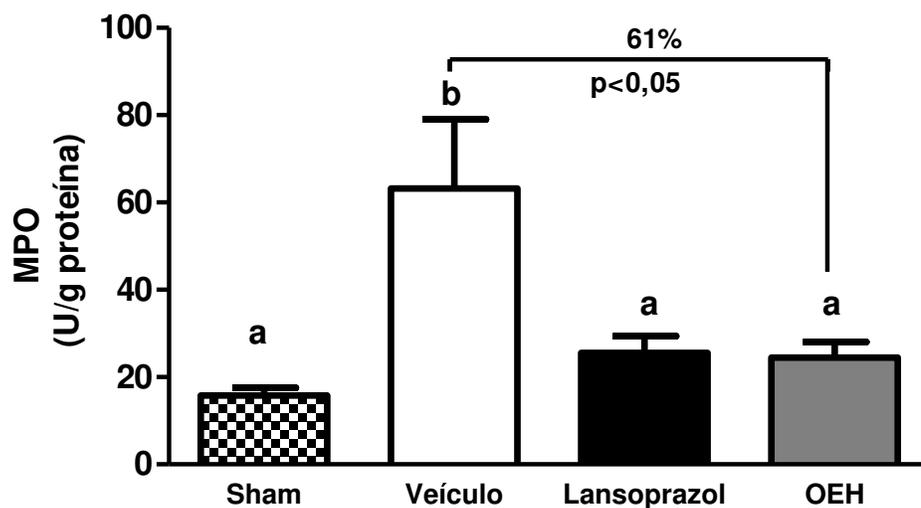


Figura 15: Atividade da enzima MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto. Dados são expressos em média \pm e.p.m. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Tukey. Diferentes letras (a, b) representam diferenças estatísticas entre os grupos.

OEH foi capaz de inibir a atividade da MPO em relação ao grupo Veículo, mantendo níveis de atividade similares ao do grupo Sham.

4.11.3. Grupamentos sulfidril (G-SH)

A depleção de grupamentos sulfidril (G-SH) geralmente é observada na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, como indício de estresse oxidativo. Os níveis de G-SH encontrados na mucosa gástrica de ratos expostos a esse modelo experimental encontram-se na Figura 16.

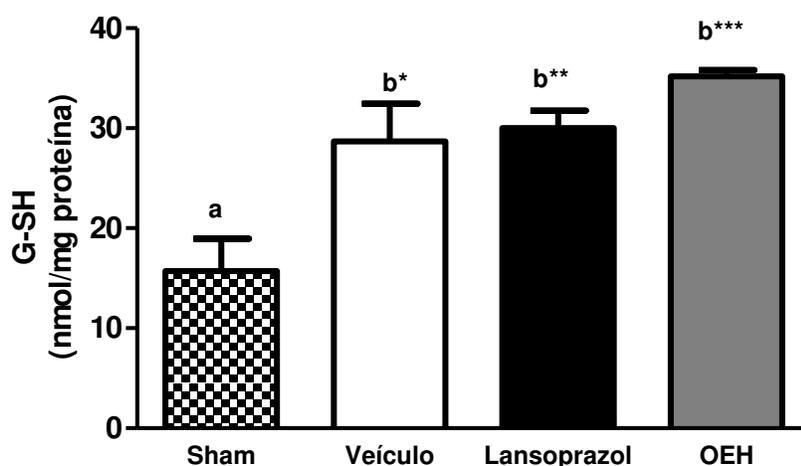


Figura 16: Níveis de G-SH na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto. Dados são expressos em média \pm e.p.m. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferentes letras (a, b) representam diferenças estatísticas entre os grupos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Após exposição ao agente ulcerogênico, o grupo Veículo apresentou aumento significativo nos níveis de G-SH, em relação ao grupo Sham, ao contrário do que se encontra na literatura. O pré-tratamento com OEH (100 mg/kg) também manteve altos os níveis de G-SH, não havendo diferença significativa em relação ao grupo Veículo nem ao grupo controle positivo Lansoprazol.

4.11.4. Atividade da glutathiona redutase (GR)

A atividade da glutathiona redutase, que tem papel importante na mucosa gástrica, não apresentou diferença significativa entre os grupos após indução de úlcera gástrica por etanol absoluto (Figura 17).

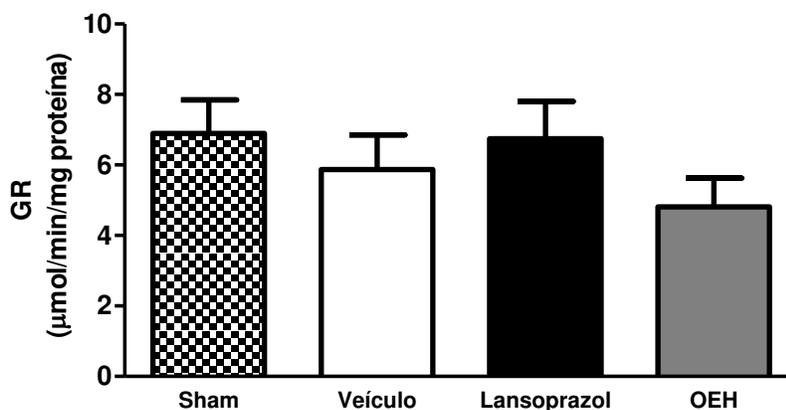


Figura 17: Atividade da enzima GR na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Dados estão expressos em média \pm e.p.m. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Tukey.

4.11.5. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

Após indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, a atividade da GPx foi analisada e os resultados estão mostrados na Figura 18.

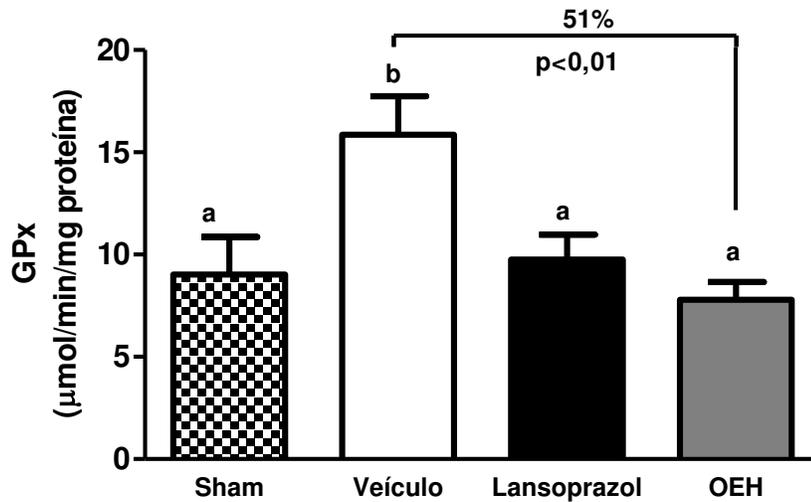


Figura 18: Atividade da enzima GPx na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Dados são expressos em média \pm e.p.m. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Tukey. Diferentes letras (a, b) representam diferenças estatísticas entre os grupos.

Foi observado aumento na atividade da enzima GPx no estômago dos animais do grupo controle negativo tratado com veículo. O aumento na atividade dessa enzima pode ser indicativo de estresse oxidativo. O grupo pré-tratado com OEH apresentou atividade da GPx semelhante ao grupo Sham, indicando menor estresse oxidativo no estômago dos animais tratados com o óleo essencial.

4.11.6. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da enzima SOD na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto é demonstrada na Figura 19.

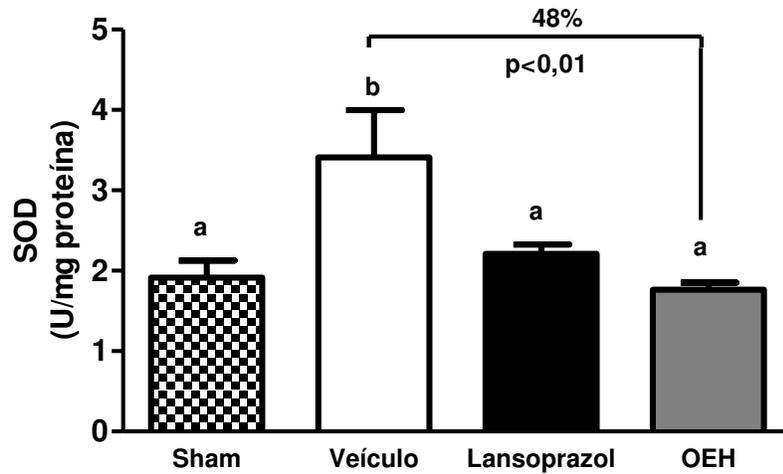


Figura 19: Atividade da enzima SOD na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto. Dados estão expressos em média \pm e.p.m. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Tukey. Diferentes letras (a, b) representam diferenças estatísticas entre os grupos.

A enzima SOD teve sua atividade aumentada no grupo controle negativo tratado com veículo, em relação ao Sham. No grupo tratado com OEH, a atividade da SOD se manteve similar aos níveis do grupo Sham.

Plantas aromáticas são utilizadas desde a antiguidade devido às propriedades conservantes e medicinais, que são parcialmente atribuídas aos óleos essenciais (Edris, 2007). Óleos essenciais são compostos naturais voláteis e complexos, caracterizados por um forte odor. Eles são utilizados como bactericida, antiviral, fungicida, antiparasitário, inseticida, medicinal e cosmético; e, atualmente, são utilizados principalmente nas indústrias farmacêuticas, agrícolas, de cosméticos e de alimentos (Bakkali *et al.*, 2008). Estudos recentes indicam que componentes de óleos essenciais, especialmente monoterpenos, apresentam diversos efeitos farmacológicos (Edris, 2007).

Os compostos majoritários identificados no óleo essencial de *Hyptis spicigera* são α -pineno (50,8%), cineol (20,3%) e β -pineno (18,3%) (Tabela 1 e Figura 5). Essa composição é bastante similar àquela demonstrada em um simpósio sobre óleos essenciais: α -pineno (26,4%), cineol (21,5%), β -pineno (13,8%) e biciclogermacreno (18,3%) (Maia & Andrade, 2009). Geralmente, os compostos majoritários são responsáveis pelos efeitos biofísicos e biológicos do óleo essencial de onde foram isolados, sendo que a amplitude de seus efeitos depende da concentração desses compostos. No entanto, é possível que a atividade dos compostos majoritários seja modulada pelos constituintes minoritários, havendo sinergismo entre eles. Nesse sentido, para efeitos biológicos, estudar todo o óleo essencial em vez de alguns de seus componentes fornece mais informações devido ao conceito de sinergismo parecer ser significativo (Bakkali *et al.*, 2008; Mercier *et al.*, 2009).

α -pineno, o composto majoritário de OEH, está relacionado com uma série de propriedades farmacológicas, tanto isoladamente como em sinergismo com outros pinenos,

dentre as quais: anti-inflamatória (Neves *et al.*, 2010), lipofílica, bactericida, fungicida, inseticida, pesticida, anticarcinogênica, diurética, antioxidante, imunoestimulante, anti-convulsivo, sedativo, anti-estresse e hipoglicêmico. Os efeitos de α -pineno variam conforme a concentração de mono e sesquiterpenos (Mercier *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura, β -pineno geralmente acompanha α -pineno em menores quantidades nos óleos essenciais. Alguns estudos indicam que o β -pineno, juntamente com α -pineno e outros terpenos, é citotóxico, lipofílico, bactericida, fungicida, inseticida, anticarcinogênico, pesticida, antioxidante e sedativo. Quando α - e β -pinenos são compostos majoritários de um óleo essencial, eles apresentam atividades anti-inflamatória e analgésica. Quando administrado isoladamente, beta-pineno exibe moderada atividade antimicrobiana (Mercier *et al.*, 2009) e não apresenta atividade gastroprotetora (Rozza *et al.* 2010).

Cineol (1,8-cineol), também conhecido como eucaliptol ou cajepitol, é um óxido terpeno presente em muitos óleos essenciais, frequentemente empregado pela indústria farmacêutica nas formulações de fármacos, como estimulador de permeação sobre a camada córnea da pele e como descongestionante (Levison *et al.*, 1994); é utilizado também no tratamento de bronquite, sinusite e reumatismo (Santos & Rao, 2000). Foi demonstrado que cineol apresenta, por via sistêmica, atividades anti-inflamatória, analgésica, gastroprotetora e hepatoprotetora (Santos *et al.*, 2004), moderada atividade antioxidante (Mitić-Ćulafić *et al.*, 2009) e atividade antimicrobiana, mas não com a mesma eficácia quando comparado ao óleo essencial completo (Hendry *et al.*, 2009). Além disso, cineol não apresenta efeito mutagênico ou genotóxico, sendo isso um indício de segurança desse composto (Mitić-Ćulafić *et al.*, 2009).

A integridade funcional da mucosa gástrica depende do equilíbrio entre fatores agressores e mecanismos protetores. Dessa maneira, o sucesso do tratamento farmacológico contra úlcera gástrica depende não somente do bloqueio da secreção ácida, mas também do aumento dos fatores de proteção da mucosa gástrica (Dajani & Klamut, 2000). Os agentes protetores da mucosa consistem em três fatores funcionais: secreção de muco, microcirculação e motilidade (Ueki *et al.*, 1998), dois fatores humorais: prostaglandinas e óxido nítrico (Whittle *et al.*, 1990) e da sensibilidade neuronal à capsaicina (Holzer, 1998). A habilidade de certos fatores endógenos protegerem a mucosa gástrica contra danos ao epitélio gástrico através de mecanismos não relacionados à inibição da secreção ácida foi primeiramente denominada “citoproteção” e em seguida caracterizada como “gastroproteção” (Szabo & Goldberg, 1990; Martin & Wallace, 2006).

A formação das lesões gástricas induzidas por etanol tem origem multifatorial que inclui estresse oxidativo, dano ao DNA, decréscimo nos níveis de glutathiona total e peroxidação lipídica nas células da mucosa gástrica como alguns dos fatores envolvidos, produzindo necrose, hemorragia sub-epitelial, edema, esfoliação celular e aumento da permeabilidade da mucosa (Hiraishi *et al.*, 1999; Kountouras *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 1985; La Casa *et al.*, 2000). Além disso, a atividade ulcerogênica do etanol se deve a sua capacidade de dissolver o conteúdo de muco gástrico, diminuindo o gradiente de potencial de ação entre o lúmen e a mucosa; que, por sua vez, aumenta o fluxo de íons Na^+ e H^+ para o lúmen gástrico, estimulando a secreção de histamina, pepsina e de íons H^+ (Szabo & Brown, 1987). Considerando que OEH (100 mg/Kg) inibiu em quase 100% a formação de lesões gástricas causadas por etanol, pode-se afirmar que esse óleo essencial exerce considerável gastroproteção (Tabela 2).

O potencial de agressão das drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINE) ao trato gastrointestinal continua sendo um grande impedimento no uso para tratamento de doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide (Avila *et al.*, 1996; Ng & Chan, 2010). Sabe-se que inibição da síntese de prostaglandinas é o principal mecanismo ulcerogênico de DAINÉ, além de provocarem danos ao endotélio vascular, redução do fluxo sanguíneo, formação de micro-trombos obstrutivos e ativação de neutrófilos (Guth, 1992). No modelo experimental de úlcera gástrica induzida por DAINÉ, o óleo essencial de *Hyptis spicigera* (OEH) apresentou atividade gastroprotetora na dose de 100 mg/Kg (Tabela 2).

Considerando que propriedades ulcerogênicas de DAINÉ e etanol são consequência da redução de mecanismos protetores da mucosa gástrica, como prostaglandina e muco (Konturek *et al.*, 2005), pode-se afirmar que a atividade antiulcerogênica do OEH observada nesses modelos pode ser atribuída a esses fatores de proteção.

Alguns agentes farmacológicos, como inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase, antagonistas histaminérgicos e colinérgicos, são antiulcerogênicos através da redução da secreção ácida no estômago (Aihara *et al.*, 2003). Com base nisso, avaliou-se a atividade antissecretória do OEH, tanto por via oral (v.o.) quanto sistêmica (i.d.), através do modelo de ligadura do piloro. Em ambos os experimentos, OEH não demonstrou modificações nos parâmetros ácido-gástricos. Esses resultados indicam, portanto, que OEH não exerce atividade antiulcerogênica através de mecanismo antissecretório (Tabela 3). Esse resultado é importante quando se leva em conta que o uso prolongado de inibidores de bomba prótonica e de bloqueadores de H_2 pode provocar efeitos adversos, como hipergastrinemia devido ao aumento do pH no lúmen gástrico (Orlando *et al.*, 2007).

Após investigar os efeitos de OEH sobre a secreção ácida passou-se à avaliação dos efeitos sobre os fatores protetores da mucosa. Muco gástrico é a primeira linha de defesa

contra o ácido e, junto com bicarbonato secretado pelo epitélio, adere à mucosa e serve como uma barreira contra autodigestão (Allen & Flemström, 2005). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram um aumento estatisticamente significativo (quase 30%) na quantidade de muco aderido em animais tratados com OEH, justificando assim a ação gastroprotetora observada previamente (Figuras 6 e 11). A importância do muco como fator protetor à mucosa gástrica se deve também à composição de glicoproteínas, que atuam como antioxidantes reduzindo danos à mucosa provocados por radicais livres (Repetto & Llesuy, 2002).

Dentre os fatores humorais presentes na mucosa gástrica, a PGE₂ desempenha importante função na gastroproteção por estimular secreção de muco e bicarbonato, manter o fluxo sanguíneo local e aumentar a resistência das células epiteliais contra potencial dano causado por citotoxinas (Hawkey & Rampton, 1985; Brzozowski *et al.*, 2005). A Figura 7 demonstra que mesmo com administração de um inibidor de COX não-seletivo (indometacina) que consequentemente reduz os níveis de PGE₂, OEH foi capaz de aumentar os níveis de PGE₂ na mucosa gástrica em comparação ao grupo controle negativo Veículo, que foi também tratado com indometacina. Apesar desse aumento, OEH não foi capaz de manter PGE₂ em níveis basais, similares àqueles encontrados em ratos normais (Sham). Dessa maneira, não é possível assegurar que OEH estimula a síntese de PGE₂, mas pode-se afirmar que esse óleo essencial é capaz de manter PGE₂ em níveis suficientes para proteger a mucosa gástrica contra danos. Considerando que uma das formas de controle da síntese de muco gástrico é através da PGE₂, a ação de OEH sobre os níveis de PGE₂ explica o fato de esse tratamento aumentar a secreção de muco, confirmando a ação gastroprotetora promovida por OEH.

Foi demonstrado que úlcera gástrica induzida por etanol está associada com redução dos níveis de compostos com grupamentos sulfidril (G-SH), principalmente glutatona intracelular (GSH). G-SH limita a geração de radicais livres protegendo a célula (La Casa *et al.*, 2000). Com base nisso, avaliou-se a função de G-SH na gastroproteção promovida por OEH no modelo de úlcera induzida por etanol. Para isso, os animais foram pré-tratados com NEM, um inibidor de G-SH. Pôde-se concluir que a atividade gastroprotetora do OEH não depende desses compostos já que OEH inibiu a formação de lesões ulcerativas (um pouco mais de 70%) em animais desafiados com etanol apesar da inibição de G-SH (Tabela 4). Além de G-SH, outra possível substância envolvida na gastroproteção é o óxido nítrico (NO), que é sintetizado pela NO-sintase (NOS) e desempenha importante função de modular a defesa da mucosa gástrica pela regulação da secreção de muco (Brown *et al.*, 1993), aumento do fluxo sanguíneo (Wallace & Miller, 2000) e inibição de infiltração de neutrófilos (Wallace *et al.*, 1997). O ensaio que avaliou a participação do NO na gastroproteção promovida pelo OEH demonstrou que, apesar da inibição de NO pela ação do L-NAME, um bloqueador da NOS, OEH continuou exercendo sua atividade gastroprotetora (Tabela 4). Dessa maneira, pode-se concluir que o mecanismo de proteção gástrica do OEH não está relacionado à síntese de NO.

Até recentemente, estudos sobre gênese de úlcera péptica focavam em anormalidades de secreção ácida e de pepsina, sendo que a supressão ácida, por meio de antagonistas de receptor de H₂ e inibidor de bomba protônica, foi a principal estratégia de tratamento durante três décadas (Yuan *et al.*, 2006). Atualmente, está aumentando o interesse sobre os mecanismos de cicatrização da úlcera e sobre a possibilidade de que a rapidez e a qualidade do processo de cicatrização possam ser farmacologicamente moduladas (Wallace, 2008). O modelo de úlcera induzida por ácido acético foi

desenvolvido a fim de avaliar o processo de cicatrização das úlceras pépticas. Esse modelo se assemelha muito à úlcera em humanos, tanto no aspecto patológico quanto nos mecanismos de cicatrização, considerando que são difíceis de tratar e requerem longo tempo para cicatrização (Okabe & Amagase, 2005). OEH demonstrou ser capaz de acelerar o processo de cicatrização de úlcera gástrica em ratos, mostrando forte atividade cicatrizante (Figura 8). Também através desse modelo experimental e dos parâmetros toxicológicos avaliados, pode-se concluir que OEH apresenta baixa toxicidade, na dose de 100 mg/Kg até 14 dias consecutivos de administração por via oral em ratos (Figura 10 e Tabela 5).

Cicatrização de úlcera é um processo de reparo geneticamente programado que inclui inflamação, proliferação celular, reepitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese e remodelação tecidual com interação entre células e a matriz extracelular. A capacidade de acelerar esse processo depende de muitos fatores, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento epitelial vascular (vEGF), peptídeos trefoil e COX-2; essa dependência é espacial e temporalmente sincronizada (Tarnawski, 2005). Considerando a importância de COX-2 e EGF no processo de cicatrização, a expressão dessas proteínas foi analisada por *western blotting* em estômagos de ratos submetidos à indução de úlcera por ácido acético. Pôde-se observar grande quantidade de ambas as proteínas em animais tratados com OEH – a expressão de COX-2 aumentou 1,75 vez e a de EGF 2,15 vezes, ambos em comparação ao grupo Sham (Figura 9 A e B, respectivamente).

COX-2 desempenha importante função na cicatrização da úlcera gástrica, enquanto que sua inibição prejudica esse processo (Peskar, 2005). No sítio da úlcera, COX-2 parece contribuir para síntese de prostaglandinas e é considerado segunda linha de defesa contra

úlceras gástricas, ativadas durante o processo de cicatrização para compensar a perda temporária de COX-1 na mucosa adjacente à úlcera. COX-2 também auxilia a COX-1 na manutenção da integridade da mucosa gástrica; sua expressão é estimulada por vários fatores de crescimento e citocinas (Halter *et al.*, 2001).

Fatores de crescimento e seus receptores desempenham importante função na proliferação e migração celular, reparo de tecido lesionado e cicatrização de úlcera. O principal receptor de fator de crescimento expresso nas células progenitoras gástricas é o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF-R), o qual regula a proliferação celular (Laine *et al.*, 2008). OEH aumentou a expressão de EGF em mais de 100% no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético. Diversos autores associam o processo antiulcerogênico com cicatrização da úlcera crônica e participação do EGF (Konturek *et al.*, 1992). Sendo assim, o aumento na expressão de COX-2 (75%) e EGF (115%) para restauração da mucosa gástrica, em animais tratados com OEH, é uma forte evidência da capacidade cicatrizante desse óleo essencial.

Recentemente, muitos óleos essenciais foram qualificados como antioxidantes naturais (Ruberto & Baratta, 2000). Com base nisso, outro objetivo desse trabalho foi verificar se OEH apresenta mecanismo antioxidante em sua atividade gastroprotetora. Para isso, a atividade antioxidante de OEH foi primeiramente testada *in vitro*.

O método DPPH é baseado na reação de transferência de elétrons ao radical peróxil DPPH e a atividade antioxidante das amostras testadas é definida em termos de concentração mínima para reduzir 50 % do DPPH – EC₅₀ (Aruoma, 2003; Magalhães *et al.*, 2008). De forma geral, quanto menor o valor de EC₅₀, maior a capacidade antioxidante,

sendo compostos com $EC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ considerados significativos antioxidantes nesse ensaio (Omisore *et al.*, 2005). OEH não apresentou atividade redutora nesse ensaio.

Ao contrário do método DPPH, cujo mecanismo envolve transporte de elétrons, o método ORAC-FL envolve reações de transferência de hidrogênio. Nesse método utilizou-se a fluoresceína como sonda fluorescente e o radical AAPH, o qual quando oxidado gera radical peroxil. A habilidade antioxidante da amostra em sequestrar radicais peroxil é calculada a partir da medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência (“Area Under the Fluorescence Decay Curve” – AUC) comparada ao padrão Trolox e ao Branco (diluente). O ORAC-FL combina o tempo e a porcentagem (%) de inibição da ação do radical pelo antioxidante e usa a AUC para quantificação do potencial antioxidante da amostra (Ou *et al.*, 2001 com modificações em Salvador *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005 *apud* Tomei *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2007). OEH apresentou considerável ação antioxidante nesse modelo (ORAC = 1103,4 $\mu\text{mol TE/g OEH}$) (Tabela 6 e Figura 12).

Considerando a atividade antioxidante *in vitro* de OEH apresentada pelo método ORAC, procurou-se avaliar a atividade antioxidante *in vivo* desse óleo essencial, através do modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Nesse modelo, o agente lesivo induz uma rápida e forte vasoconstrição que é acompanhada por uma rápida e vigorosa dilatação arteriolar, processo no qual são geradas espécies reativas de oxigênio (ERO) (Glavin & Szabo, 1992). OEH (100 mg/Kg) inibiu em 68% a formação de lesões gástricas causadas por etanol absoluto; esse resultado indica possível mecanismo antioxidante envolvido na atividade gastroprotetora de OEH (Figura 13).

Uma das principais consequências da liberação de ERO é a formação de peróxidos lipídicos que causam prejuízos às membranas biológicas, acarretando diversos danos às células. Na literatura, são diversos os trabalhos que mostram aumento da peroxidação

lipídica na úlcera gástrica, alguns deles apresentando uma estreita correlação entre a concentração de TBARS e o índice de lesão no estômago ulcerado por etanol absoluto (Mizui & Doteuchi, 1986; Kvietys *et al.*, 1990; Salim, 1990; La Casa *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2010). Conforme a literatura, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram significativa redução da peroxidação lipídica em relação à redução da área de lesão ulcerativa. Animais tratados com OEH apresentaram redução de 83% do índice de peroxidação lipídica (Figura 14). Esse resultado concorda com o do método *in vitro* ORAC, cujo mecanismo envolve sequestro de radicais peroxil, que são formados durante a peroxidação lipídica.

Além disso, a peroxidação lipídica resulta na produção e liberação de substâncias que recrutam e ativam leucócitos polimorfonucleares (Zimmerman & Granger, 1994 *apud* La Casa *et al.*, 2000). Infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, no tecido constitui outra fonte biológica de ERO (Koch *et al.*, 2004; La Casa *et al.*, 2000). A infiltração de neutrófilos é também relatada como um dos processos envolvidos na gênese de úlcera gástrica (Bayir *et al.*, 2006). A enzima NADPH oxidase, presente na membrana de neutrófilos, reduz O_2 a $O_2^{\bullet-}$, que é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, neutrófilos liberam outras substâncias citotóxicas, como proteases e lactoferrinas (Derin *et al.*, 2006).

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), presente em altas concentrações nos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos, é relatada como indicador da infiltração dessas células (Nauseef, 2001; Segal, 2005; Hansson *et al.*, 2006). Vários trabalhos apresentam aumento na atividade da MPO associado à úlcera gástrica (Smith *et al.*, 1987; Andrews *et al.*, 1994; de la Lastra, *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1997; Derin *et al.*, 2006). Após

indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, observou-se aumento na atividade de MPO no estômago de ratos que receberam apenas veículo. Nos animais tratados com OEH, esse aumento foi evitado, o que indica possível inibição de infiltração de neutrófilos e, conseqüentemente, menor liberação de radicais livres e substâncias lesivas no tecido, contribuindo para a gastroproteção desse tratamento (Figura 15). Vale ressaltar, que esse resultado é condizente com aquele obtido com o método ORAC-FL e do índice de peroxidação lipídica. Sendo OEH capaz de sequestrar radicais peroxil, evita-se o desencadeamento do processo de peroxidação lipídica e, conseqüentemente, evita-se o recrutamento de neutrófilos.

Além do aumento da peroxidação lipídica, diversos trabalhos evidenciam geração de ERO na úlcera gástrica induzida por etanol com diminuição na quantidade de grupamentos sulfidrila na mucosa gástrica (Mizui & Doteuchi, 1986; Melchiorri *et al.*, 1997; Bagchi *et al.*, 1998; Kahraman *et al.*, 2003; Arafa & Sayed-Ahmed, 2003). Ao contrário do que foi descrito, administração de etanol provocou aumento nos níveis de G-SH, tanto em animais do grupo controle negativo quanto naqueles pré-tratados com OEH (Figura 16).

No entanto, para alguns autores, a função dos G-SH na citoproteção da mucosa gástrica é controversa. Segundo Takeuchi e colaboradores (1988), os níveis gástricos de G-SH não estão diretamente relacionados nem com desenvolvimento, nem com prevenção de úlcera gástrica induzida por etanol, pois tanto o aumento quanto a depleção dos níveis gástricos de G-SH podem induzir citoproteção gástrica contra danos induzidos por etanol; o agravamento ou a prevenção dessas lesões pode estar associado ao aumento na permeabilidade vascular da mucosa ou à inibição da motilidade gástrica, respetivamente. Sendo assim, para esses autores, os níveis gástricos de G-SH não são os mediadores diretos

na proteção da mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol. O resultado obtido sobre níveis gástricos de G-SH demonstrado na Figura 16 está de acordo com essa hipótese. Isso pode ser uma evidência de que a capacidade antioxidante de OEH não está relacionada às medidas de proteção dessas substâncias, confirmando o resultado da Tabela 4, no qual foi demonstrado que G-SH não participam na gastroproteção em ratos tratados com OEH.

A administração de etanol resulta também na diminuição da atividade antioxidante, formando assim um ambiente favorável para o estresse oxidativo (Das & Vasudevan, 2007). O organismo possui um sistema de defesa antioxidante, que abrange um complexo de enzimas e moléculas capazes de sequestrar radicais livres. Dentre essas enzimas, GPx converte H_2O_2 em H_2O , a partir da oxidação da glutatona (GSH) a sua forma dissulfídica (GSSG), a qual pode novamente ser convertida a GSH pela ação da GR utilizando NADPH como co-fator (Imai & Nakagawa, 2003; Zabłocka & Janusz, 2008).

Na determinação da atividade da GR, não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 17), diferente do observado por alguns autores, cujos trabalhos demonstram diminuição na atividade da GR em lesão ulcerativa causada por etanol (Moghadasian & Godin, 1996; Bilici *et al.*, 2002). O ciclo “redox” da glutatona desempenha importante papel para garantir a integridade da mucosa em exposição ao etanol. Mas os resultados podem ser explicados considerando-se que a integridade da mucosa desafiada com etanol foi mantida em animais tratados com OEH, mesmo sem aumento significativo da atividade da GR. Pode-se afirmar que esse resultado condiz com o de grupamentos sulfidríla demonstrado na Figura 16, ou seja, grupamentos sulfidríla não fazem parte do mecanismo antioxidante de OEH de fato.

Após indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, houve aumento na atividade da GPx no grupo controle negativo, o que não foi observado no grupo tratado com OEH (Figura 18). Ao contrário, diversos trabalhos relatam diminuição na atividade da enzima GPx após exposição de tecidos ao etanol (Puntarulo *et al*, 1999; Molina *et al.*, 2003; Luczaj & Skrzydlewska, 2004). Esta enzima pode ser inativada através de modificações nos resíduos de selenocisteína em seu sítio ativo, por 4-hidroxinonal (HNE), um produto da peroxidação lipídica (Miyamoto *et al.*, 2003; Luczaj & Skrzydlewska, 2004). Além disso, a atividade da GPx pode ser reduzida devido à depleção da glutatona pelo etanol (Loguercio *et al*, 1993; Bilici *et al.*, 2002).

No entanto, há divergências com relação à atividade dessa enzima. Repetto e colaboradores (2003) analisaram a atividade da GPx em modelo de úlcera induzida por etanol e não observaram diferenças entre os grupos experimentais. Em outros tipos de lesão, como colite ulcerativa, é relatado aumento na atividade da GPx em modelos experimentais, provavelmente como efeito do acúmulo de peróxidos (Nieto *et al.*, 2000; Tham *et al.*, 2002). Sendo assim, é provável que a elevada atividade da GPx nos animais tratados apenas com veículo esteja relacionada ao acúmulo de peróxidos, evidenciando que o mecanismo antioxidante de OEH está provavelmente relacionado com sequestro de peróxidos, confirmando os resultados de ORAC-FL e de inibição do índice de peroxidação lipídica.

Superóxido dismutase (SOD) forma um grupo de enzimas conjugadas com metal, de papel antioxidante vital na saúde humana conferido pela ação sequestradora do ânion superóxido (Johnson & Giulivi, 2005). Além disso, esta enzima também é componente essencial de vias de sinalização que regulam a fisiologia celular (Oberley, 2005). Existem três formas conhecidas de SOD em células de mamíferos, a SOD contendo cobre e zinco

(CuZnSOD) encontrada principalmente no citoplasma e núcleo, a SOD contendo manganês (MnSOD) encontrada nas mitocôndrias e a SOD extracelular (ECSOD) encontrada primariamente nos compartimentos extracelulares (Oberley, 2005).

Após indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, a enzima SOD apresentou aumento de atividade no estômago de animais tratados apenas com veículo (Figura 19). Esse resultado está de acordo com o obtido por outros autores. Ganguly e Swarnakar (2009) observaram aumento na expressão de mRNA da enzima SOD associado ao aumento de estresse oxidativo e liberação de mediadores inflamatórios em modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina (DAINE). Também, Konturek e colaboradores (2008) observaram aumento da expressão de mRNA de SOD na mucosa gástrica ulcerada, nesse caso, em úlcera crônica induzida por ácido acético.

Além disso, Repetto e colaboradores (2003) atribuem o aumento na atividade da SOD ao estresse oxidativo e maior liberação de $O_2^{\cdot-}$. Assim, maior atividade e expressão da enzima SOD na mucosa gástrica podem indicar maior exposição do tecido à geração de ERO e a menor atividade da SOD no grupo pré-tratado com OEH, em comparação ao controle negativo, evidencia menores danos à mucosa gástrica dos animais desse grupo, com menor exposição a estresse oxidativo. Esse resultado condiz com o da atividade da GPx, demonstrado na Figura 18. No grupo pré-tratado com OEH, a atividade da SOD apresenta-se reduzida, não havendo acúmulo de peróxido de hidrogênio e, sendo assim, a atividade da GPx também fica reduzida nos animais tratados com o óleo essencial. Já aqueles animais do controle negativo, que apresentaram aumento na atividade da SOD, também tiveram a atividade da GPx aumentada por conta do acúmulo de peróxido de hidrogênio.

Dessa maneira, o mecanismo antioxidante de OEH está relacionado ao sequestro de radicais peroxil, por transferência de hidrogênio, demonstrado pelo resultado de ORAC-FL, sendo inibição do índice de peroxidação lipídica, da atividade da MPO e da GPx consequências da redução desses radicais. Com o menor estresse oxidativo, em animais tratados com OEH, a atividade da SOD fica conseqüentemente reduzida.

Para finalizar, os resultados obtidos confirmam a indicação popular de OEH no tratamento de problemas digestivos, considerando sua capacidade de proteger a mucosa gástrica de animais contra diferentes agentes agressores, por diferentes mecanismos de ação: citoprotetor, cicatrizante e antioxidante.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que as atividades antiulcerogênica e gastroprotetora promovidas por OEH são devidas ao aumento da produção gástrica de muco relacionada aos níveis de PGE₂ na mucosa gástrica. Os resultados demonstraram também que OEH possui uma forte atividade cicatrizante modulada pelo aumento na expressão de COX-2 e EGF na mucosa gástrica. Outro mecanismo envolvido nessas atividades é o antioxidante, via transferência de átomos de hidrogênio, relacionado ao sequestro de radicais peroxil.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos com OEH são promissores devido à significativa proteção contra úlcera gástrica induzida por diferentes agentes e sugerem uma promissora aplicação terapêutica de OEH; no entanto, estudos adicionais acerca desse óleo essencial ainda são necessários. Assim, são perspectivas do trabalho com OEH:

- Estudos adicionais de toxicidade, como toxicidade aguda e crônica;
- Avaliar outros possíveis mecanismos envolvidos na atividade antiulcerogênica;
- Avaliar o potencial antiulcerogênico de dois compostos majoritários de OEH (α -pineno e cineol), isoladamente. Sobre o terceiro composto majoritário de OEH, β -pineno, já há estudos antiúlcera realizados;
- Desenvolver formas farmacêuticas contendo OEH e realizar estudos de farmacocinética e farmacodinâmica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Salam, O.M., Czimmer, J., Debreceni, A., Szolcsanyi, J., Mozsik, G., 2001. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *Journal of Physiology, Paris* 95, 105-127.
- Adams, R.P., 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream. Allured Publish Corporation.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., França, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 472-508.
- Aihara, T., Nakamura, E., Amagase, K., Tomita, K., Fujishika, T., Furutani, K., Okabe, S., 2003. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacology and Therapeutics* 98, 109-127.
- Allen, A., Flemström, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 288, 1 –19.
- Almtorp, G.T., Hazell, A.C., Torssell, K.B.G., 1991. Alignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* 30, 2753-2756.
- Andrews, F.J., Malcontenti-Wilson, C., O'Brien, P.E., 1994. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into gastric mucosa after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology* 266, 48-54.
- Arafa, H.M., Sayed-Ahmed, M.M., 2003. Protective role of carnitine esters against alcohol-induced gastric lesions in rats. *Pharmacological Research* 48, 285-290.
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castilho, C., Navarrete, A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringens*; roles of

- prostaglandins, sulphidryls, nitric oxide and capsaicin neurons. *Planta Medica* 69, 905-909.
- Arrigoni-Blank, M.F., Antonioli, A.R., Caetano, L.C., Campos, D.A., Blank, A.F., Alves, P.B., 2008. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. *Phytomedicine* 15, 334-339.
- Aruoma, O.I., 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* 523-524, 9-20.
- Asekun, O.T., Ekundayo, O., Adeniyi, B.A., 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia* 70, 440-442.
- Asl, M.N., Hosseinzadeh, H., 2008. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research* 22, 709-724.
- Avilla, J.R., de la Lastra, C.A., Martin, M.J., Motilva, V., Luque, I., Delgado, D., Esteban, J., Herrerias, J., 1996. Role of endogenous sulphidryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflammation Research: official journal of the European Histamine Research Society* 45, 83-88.
- Aycard, J.P., Kini, F., Kam, B., Gaydou, E.M., Faure, R., 1993. Isolation and identification of spicigera lactone: complete proton and carbon-13 assignments using two-dimensional NMR experiments. *Journal of Natural Products* 56, 1171-1173.
- Bagchi, D., Carryl, O.R., Tran, M.X., Krohn, R.L., Bagchi, D.J., Garg, A., Bagchi, M., Mitra, S., Stohs, S.J., 1998. Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Journal of Applied Toxicology* 18, 3-13.

- Baker, R.D., Cook, C.O., Goodwin, D.C., 2004. Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 833-839.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Barbastefano, V., 2007. Atividade antiulcerogênica de extratos brutos, frações semi-purificadas e substância ativa de duas espécies do gênero *Vernonia*: *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea*. Orientadora: Dr^a Alba Regina Monteiro Souza Brito. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas/SP.
- Barbosa, P.P.P., Barbosa, C.P., 1992. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. *Phytotherapy Research* 6, 114-115.
- Barbosa, P.P.P., Ramos, C.P., 1992. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. *Phytotherapy Research* 6, 114-115.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova* 29, 113-123.
- Barrowman, J.A., Pfeiffer, C.J., 1982. *Drugs and peptic ulcer*. Boca Raton: CRC Press.
- Batista, L.M., de Almeida, A.B., de Pietro, M.L., Toma, W., Calvo, T.R., Vilegas, W., 2004. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, 328-332.
- Bayir, Y., Odabasoglu, F., Cakir, A., Aslan, A., Suleyman, H., Halici, M., Kazaz, C., 2006. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*. 13, 584-590.
- Berstad, K., Berstad, A., 1993. *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 28, 561-567.

- Bilici, D., Suleyman, H., Banoglu, Z.N., Kiziltunc, A., Avci, B., Ciftcioglu, A., Bilici, S. 2002. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Digestive Diseases and Sciences* 47, 856-861.
- Bispo, M.D., Mourao, R.H.C., Franzotti, E.M., Bomfim, K.B., Arrigoni-Blank, M.F., Moreno, M.P., Marchioro, M., Antonioli, A.R., 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 81-86.
- Blake, D.R., Allen, R.E., Lunec, J., 1987. Free radicals in biological systems--a review orientated to inflammatory processes. *British Medical Bulletin* 43, 371-385.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brown, J.F., Keats, A.C., Hanson, P.J., Whittle, B.J., 1993. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *American Journal of Physiology* 265, 418-422.
- Brzozowski, T., 2003. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements. *Journal of Physiology and Pharmacology* 54, 99-126.
- Brzozowski, T., Konturek, P.C., Konturek, S.J., Brzozowska, I., Pawlik, T., 2005. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 33-55.
- Brzozowski, T., Tarnawski, A., Hollander, D., Sekhon, S., Krause, W.J., Gergely, H., 2005. Comparison of prostaglandin and cimeidine in protection of isolated gastric

- glands against indomethacin injury. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 75-88.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. 113, 484-499.
- Carvalho, A.C.B., Balbino, E.E., Maciel, A., Perfeito, J.P.S., 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18, 314-319.
- Castro, L.P., Coelho, L.G.V., Vieira, W.L.S.V., Rodrigues, M.A.G., 2009. Úlcera Péptica Gastroduodenal. *Tratado de Clínica Médica*. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Roca.
- Chan, F.K., Leung, W.K., 2002. Peptic-ulcer disease. *The Lancet* 360, 933-941.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L., 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13926-13931.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49, 481-493.
- Cho, C.H., 2001. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *Journal of Physiology, Paris* 95, 253-256.
- Chow, D.K., Sung, J.J., 2007. Is the prevalence of idiopathic ulcers really on the increase? *Natural Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology* 4, 176-177.
- Conner, E.M., Grisham, M.B., 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12, 274-277.

- Corrêa, M.P., 1931. Dicionário das plantas úteis e das tóxicas cultivadas. Rio de Janeiro / RJ – Brasil, Imprensa Nacional.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Allen, A., 1984. Antioxidant protection - a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *The Lancet* 1, 1328-1330.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica chimica acta* 80, 1144-1152.
- Curtis, G.H., ManNaughton, W.K., Gall, D.G., Wallace, J.L., 1995. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 73, 130-134.
- d'Accampora, J.A., Lima, D.A.N., Sousa, M.V., Aquino, A.C., Russi, R.F., Vieira, J., Lopes, A., 2008. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perforada atendidos no centro cirúrgico do Hospital Florianópolis. *Revista do Médico Residente* 10, 141-146.
- Dajani, E.Z., Klamut, E.Z., 2000. Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9, 1537-1544.
- Das, D., Bandyopadhyay, D., Bhattacharjee, M., Banerjee, R.K., 1997. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 8-18.
- Das, D., Banerjee, R.K., 1993. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Molecular and Cellular Biochemistry* 125, 115-125.
- Das, D.K., Maulik, N., 2004. Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. *Biochemistry-Moscow* 69, 10-17.

- Das, S.K., Vasudevan, D.M., 2007. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences* 81, 177-187.
- de la Lastra, C.A., Cabeza, J., Motilva, V., Martin, M.J. , 1997. Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Pineal Research* 23, 47-52.
- de las Heras, B., Hortelano, S., 2009. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflammation and Allergy-Drug Targets* 8, 28-39.
- de Jesus, N.Z.T., Lima, J.C.D., da Silva, R.M., Espinosa, M.M., Martins, D.T.D., 2009. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e anti-inflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 130-139.
- de Sousa Falcão, H., Leite, J.A., Barbosa-Filho, J.M., de Athayde-Filho, P.F., de Oliveira Chaves, M.C., Moura, M.D., Ferreira, A.L., de Almeida, A.B., Souza-Brito, A.R., de Fátima Formiga Melo Diniz, M., Batista, L.M., 2008. Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: a review. *Molecules* 13, 3198-3223.
- de Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 202-226.
- Derin, N., Agac, A., Bayram, Z., Asar, M., Izgut-Uysal, V.N., 2006. Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochemistry and Function* 24, 437-442.
- Dey, I., Lejeune, M., Chadee, K., 2006. Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology* 149, 611-623.
- Dohadwalla, A.N., 1985. Natural product pharmacology - strategies in search of leads for new drug designs. *Trends in Pharmacological Sciences* 6, 49-53.

- Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research* 21, 308-323.
- Elliott, S.N., Wallace, J.L., 1998. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *Journal of Gastroenterology* 33, 792-803.
- Falcão, D.Q., Menezes, F.S., 2003. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 83, 69-74.
- Falcão, H.S., Lima, I.O., Santos, V.L., Dantas, H.F., Diniz, M.F.F.M., Barbosa-Filho, J.M., Batista, L.M., 2005. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15, 381-391.
- Faure, P., Landford, J.L., 1995. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In *Analysis of free radicals in biological systems*. Favier A. E. et al. Eds. Verla Bostonp, p. 237-248.
- Fialkow, L., Wang, Y.C., Downey, G.P., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine* 42, 153-164.
- Fragoso-Serrano, M., González-Chimeo, E., Pereda-Miranda, R., 1999. Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis spicigera*. *Journal of Natural Products* 62, 45-50.
- Fukuda, T., Arakawa, T., Shimizu, Y., Ohtani, K., Higuchi, K., Kobayashi, K., 1995. Effects of lansoprazole on ethanol-induced injury and PG synthetic activity in rat gastric mucosa. *Journal of Clinical Gastroenterology* 20, 5-7.
- Ganguly, K., Kundu, P., Banerjee, A., Reiter, R.J., Swarnakar, S., 2006. Hydrogen peroxide-mediated downregulation of matrix metalloprotease-2 in indomethacin-induced acute

- gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 41, 911-925.
- Ganguly, K., Swarnakar, S., 2009. Induction of matrix metalloproteinase-9 and-3 in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute gastric ulcers in mice: regulation by melatonin. *Journal of Pineal Research* 47, 43-55.
- Garner, A., Flemström, G., Allen, A., Heylings, J.R., Mcqueen, S., 1984. Gastric-mucosal protective mechanisms - Roles of epithelial bicarbonate and mucus secretions. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 19, 79-86.
- Garner, A., Flemström, G., Heylings, J.R., 1979. Effects of anti-inflammatory agents and prostaglandins on acid and bicarbonate secretions in the amphibian-isolated gastric-mucosa. *Gastroenterology* 77, 451-457.
- Glavin, G.B., Szabo, S., 1992. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *The FASEB Journal* 6, 825-831.
- Gotlieb, O.R., 1981. New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. *Interciencia* 6, 22-29.
- Grisham, M.B., Hernandez, L.A., Granger, D.N., 1986. Xanthine-oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *American Journal of Physiology* 251, 567-574.
- Guarim Neto, G.G., Morais, R.G., 2003. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botânica Brasileira* 17, 561-584.
- Gudis, K., Sakamoto, C., 2005. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. *Digestive Diseases and Sciences* 50, 16-23.
- Gupta, M.P., Monge, A., Karikas, G.A., Lopez De Cerain, A., Solis, P.N., De Leon, E., Trujillo, M., Suarez, O., Wilson, F., 1996. Screening of Panamanian medicinal plants

- for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. *International Journal of Pharmacognosy* 34, 19-27.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- Gustavsson, S., Nyren, O., 1989. Time trends in peptic-ulcer surgery, 1956 to 1986 - a nation-wide survey in Sweden. *Annals of Surgery* 210, 704-709.
- Guth, P.H., 1992. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. *Yale Journal Biological Medicine* 65, 677-688.
- Halliwell, B., 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews* 55, 44-49.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free-radicals and catalytic metal-ions in human-disease - an overview. *Methods in Enzymology* 186, 1-85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed., New York: Oxford University Press Inc.
- Halter, F., Schmassmann, A., Peskar, B.M., 2001. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut* 49, 443-453.
- Hansson, M., Olsson, I., Nauseef, W.M., 2006. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445, 214-224.
- Harley, R.M., 1988. Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq. and its allies. *Botanical Journal of the Linnean Society* 98, 87-95.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67-202.

- Hawkey, C.J., Rampton, D.S., 1985. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology* 89, 1162-1188.
- Hayden, L.J., Thomas, G., West, G.B., 1978. Inhibitors of gastric lesions in the rat. *Journal of Pharmacology* 30, 244-246.
- Hendry, E.R., Worthington, T., Conway, B.R., Lambert, P.A., 2009. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64, 1219-1225.
- Hernandez-Munoz, R., Montiel-Ruiz, C., Vazquez-Martinez, O., 2000. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Laboratory Investigation* 80, 1161-1169.
- Hiraishi, H., Shimada, T., Ivey, K.J., Terano, A., 1999. Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 103-109.
- Hiraishi, H., Terano, A., Ota, S., Mutoh, H., Sugimoto, T., Harada, T., Razandi, M., Ivey, K.J., 1994. Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. *Gastroenterology* 106, 1199-1207.
- Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Nunes, D.S., Souza Brito, A.R.M., 1999. Effects of an essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51, 341-346.
- Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Rodríguez, J.A., Haun, M., Nunes, D.S., Souza Brito, A.R.M., 2000. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 69, 229-234.

- Holzer, P., 1998. Afferent nerve-mediated protection against deep mucosal damage in the rat stomach. *Gastroenterology* 114, 823-839.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 1841-1856.
- Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 145-169.
- Iwu, M.M., Ezeugwu, C.O., Okunji, C.O., Sanson, D.R., Tempesta, M.S., 1990. Antimicrobial activity and terpenoids of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *International Journal of Crude Drug Research* 28, 73-76.
- Johnson, F., Giulivi, C., 2005. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 340-352.
- Kahraman, A., Erkasap, N., Koken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap, S., 2003. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 183, 133-142.
- Kawano, S., Tsuji, S., 2000. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15, 1-6.
- Koch, O.R., Pani, G., Borrello, S., Colavitti, R., Cravero, A., Farre, S., Galeotti, T., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 191-198.
- Konturek, P.C., Burnat, G., Brzozowski, T., Zopf, Y., Konturek, S.J., 2008. Tryptophan Free Diet Delays Healing of Chronic Gastric Ulcers in Rat. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59, 53-65.

- Konturek, P.K., Brzozowski, T., Konturek, S.J., Dembinski, A., 1990. Role of epidermal growth-factor, prostaglandin, and sulfhydryls in stress-induced gastric-lesions. *Gastroenterology* 99, 1607-1615.
- Konturek, S.J., Brzozowski, T., Majka, J., Dembinski, A., Slomiany, A., Slomiany, B.L., 1992. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in protection and healing of gastric mucosal injury. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 27, 649-655.
- Konturek, S.J., 1985. Gastric cytoprotection - review. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 20, 543-553.
- Konturek, S.J., Konturek, P.C., Brzozowski, T., 2005. Prostaglandins and ulcer healing. *Journal Physiology and Pharmacology* 56, 5-31.
- Kountouras, J., Chatzopoulos, D., Zavos, C., 2001. Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. *Hepatogastroenterology* 48, 743-751.
- Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity - assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344-1350.
- Kvietys, P.R., Twohig, B., Danzell, J., Specian, R.D., 1990. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. *Gastroenterology* 98, 909-920.
- Kwiecien, S., Brzozowski, T., Konturek, P.C., Konturek, S.J., 2002. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *Journal of Physiology and Pharmacology* 53, 761-773.

- La Casa, C., Villegas, I., arcon de la, L.C., Motilva, V., Martin Calero, M.J., 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 45-53.
- Ladan, Z., Amupitan, J.O., Okonkwo, E.M., Aimola, I.A., Habila, N., 2009. Antimicrobial potency of *Hyptis spicigera* leaf extracts against some pathogenic microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research* 3, 905-908.
- Laine, L., Takeuchi, K., Tarnawski, A., 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 135, 41-60.
- Lazar, M., Rychly, J., Klimo, V., Pelikán, P., Valko, L., 1989. Free radicals in chemistry and biology. Florida: CRC Press.
- Lee, J.S., Oh, T.Y., Kim, Y.K., Baik, J.H., So, S., Hahm, K.B., Surh, Y.J., 2005. Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 579, 214-224.
- Lee, K.H., Lin, Y.M., Wu, T.S., Zhang, De.C., Yamagishi, T., Hayashi, T., Hall, I.H., Chang, J.J., Wu, R.Y., Yang, T.H., 1988. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Medica* 54, 308-311.
- Leong, R.W., 2009. Differences in peptic ulcer between the East and the West. *Gastroenterology Clinics of North America* 38, 363-379.
- Leong, R.W., Chan, F.K.L., 2004. Duodenal ulcer. *Encyclopedia of gastroenterology*. 1st Ed. Memphis: Academic Press.

- Levison, K.K., Takayama, K., Okabe, K., Nagai, T., 1994. Formulation optimization of indomethacin gels containing a combination of three kinds of cyclic monoterpenes as percutaneous penetration enhancers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 83, 1367-1372.
- Li, J.W.H., Vederas, J.C., 2009. Drug Discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325, 161-165.
- Loguercio, C., Taranto, D., Beneduce, F., Del Vecchio, B.C., de, V.A., Nardi, G., Romano, M., 1993. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut* 34, 161-165.
- Lorenzi, H., 2000. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3^a Ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum.
- Luczaj, W., Skrzydlewska, E., 2004. Antioxidant properties of black tea in alcohol intoxication. *Food and Chemical Toxicology* 42, 2045-2051.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613, 1-19.
- Maia, J.G.S., Andrade, E.H.A., 2009. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. *Quimica Nova* 32, 595-622.
- Malan, K., Pelissier, Y., Marion, C., Blaise, A., Bessiere, J.M., 1988. The essential oil of *Hyptis pectinata*. *Planta Medica* 54, 531-532.
- Marshall, B.J., Warren, J.R., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic-ulceration. *The Lancet* 1, 1311-1315.
- Martin, G.R., Wallace, J.L., 2006. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Experimental Biology and Medicine* 231, 130-137.

- Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., Pellicer, F., López-Muñoz, F.J., Navarrete, A., 2009. Antinociceptive effect and GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. *Planta Medica* 75, 508-511.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 6056-6063.
- Melchiorri, D., Sewerynek, E., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Poeggeler, B., Nistico, G., 1997. Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. *British Journal of Pharmacology* 121, 264-270.
- Menezes, I.A.C., Marques, M.S., Santos, T.C., Dias, K.S., Silva, A.B.L., Mello, I.C.M., Lisboa, A.C.C.D., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C.H., Marçal, R.M., Antonioli, A.R., 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. *Fitoterapia* 78, 192-195.
- Menguy, R., Desbaillets, L, Masters, Y.F., 1974. Mechanism of stress ulcer - influence of hypovolemic shock on energy metabolism in gastric-mucosa. *Gastroenterology* 66, 46-55.
- Mercier, B., Prost, J., Prost, M., 2009. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *International journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 22, 331-342.
- Milani, S., Calabro, A., 2001. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microscopy Research and Technique* 53, 360-371.
- Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihajlović, B., Matavulj, M., 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica* 69, 413-419.

- Mitić-Ćulafić, D., Žegura, B., Nikolić, B., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., Filipič, M., 2009. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against *t*-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food and Chemical Toxicology* 47, 260-266.
- Mittermeier, R.A., Da Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B., Brandon, K., 2005. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. *Conservation Biology* 19, 601-607.
- Miyamoto, Y., Koh, Y.H., Park, Y.S., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y., Ookawara, T., Suzuki, K., Honke, K., Taniguchi, N., 2003. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biological Chemistry* 384, 567-574.
- Mizui, T., Doteuchi, M., 1986. Lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sciences* 38, 2163-2167.
- Moghadasian, M.H., Godin, D.V., 1996. Ethanol-induced gastrointestinal damage - Influence of endogenous antioxidant components and gender. *Digestive Diseases and Sciences* 41, 791-797.
- Molina, M.F., Sanchez-Reus, I., Iglesias, I., Benedi, J., 2003. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26, 1398-1402.
- Moraes, T.M., Kushima, H., Moleiro, F.C., Santos, R.C., Machado Rocha, L.R., Marques, M.O., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2009. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions* 180, 499-505.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., Sukamoto, T., 1991. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive

- factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. Japanese Journal of Pharmacology 57, 495-505.
- Mota, K.S., Dias, G.E., Pinto, M.E., Luiz-Ferreira, A., Souza-Brito, A.R., Hiruma-Lima, C.A., Barbosa-Filho, J.M., Batista, L.M., 2009. Flavonoids with gastroprotective activity. Molecules 14, 979-1012.
- Mukherjee, K.S., Mukherjee, R.K., Gosh, P.K., 1984. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. Journal of Natural Products 47, 377-378.
- Murakami, K., Okajima, K., Uchiba, M., Harada, N., Johno, M., Okabe, H., Takatsuki, K., 1997. Rebamipide attenuates indomethacin-induced gastric mucosal lesion formation by inhibiting activation of leukocytes in rats. Digestive Diseases and Sciences 42, 319-325.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., 2002. Molecular and cellular mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced inflammation and oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine 33, 323-336.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Yagi, N., Arai, M., Nakamura, Y., Kaneko, T., Yoshida, N., Kondo, M., 1998. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. Free Radical Biology and Medicine 24, 494-502.
- Napolitano, L., 2009. Refractory Peptic Ulcer Disease. Gastroenterology Clinics of North America 38, 267-288.
- Nascimento, P.F.C., Alviano, W.S., Nascimento, A.L.C., Santos, P.O., Arrigoni-Blank, M.F., de Jesus, R.A., Azevedo, V.G., Alviano, D.S., Bolognese, A.M., Trindade, R.C., 2008. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. Oral Diseases 14, 485-489.

- Nauseef, W.M., 2001. Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: More than an antimicrobial system. *International Journal of Hematology* 74, 125-133.
- Neves, A., Rosa, S., Gonçalves, J., Rufino, A., Judas, F., Salgueiro, L., Lopes, M.C., Cavaleiro, C., Mendes, A.F., 2010. Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced NF κ B activation and NO production in human chondrocytes: characterization of the inhibitory activity of α -pinene. *Planta Medica* 76, 303-308.
- Ng, S.C., Chan, F.K.L., 2010. NSAID-induced gastrointestinal and cardiovascular injury. *Current Opinion in Gastroenterology* 26, 611-617.
- Ngo Bum, E., Taiwe, G.S., Nkainsa, L.A., Moto, F.C.O., Seke Etet, P.F., Hiana, I.R., Bailabar, T., Rouyatou, Papa Seyni, Rakotonirina, A., Rakotonirina, S.V., 2009. Validation of anticonvulsant and sedative activity of six medicinal plants. *Epilepsy and Behavior* 14, 454-458.
- Nieto, N., Torres, M.I., Fernandez, M.I., Giron, M.D., Rios, A., Suarez, M.D., Gil, A., 2000. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Digestive Diseases and Sciences* 45, 1820-1827.
- Oberley, L.W., 2005. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 59, 143-148.
- Ohkawa, H., Nobuko, O., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351-358.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., Imanishi, J., 2003. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 8, 207-215.

- Okabe, S., Amagase, K., 2005. An overview of acetic ulcer models – The history and state of the art of peptic ulcer research. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28, 1321-1341.
- Oliveira, P.S., Marquis, R.J., 2002. *The Cerrados of Brazil – Ecology and natural history of a neotropical savanna*. New York: Columbia University Press.
- Omisore, N.O.A., Adewunmi, C.O., Iwalewa, E.O., Ngadjui, B.T., Adenowo, T.K., Abegaz, B.M., Ojewole, J.A., Watchueng, J., 2005. Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 1087-1094.
- Onayade, O.A., Looman, A., Scheffer, J.J.C., Svendsen, A.B., 1990. Composition of the herb essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. *Flavour Fragrance Journal* 5, 101-105.
- Orlando, L.A., Lenard, L., Orlando, R.C., 2007. Chronic hypergastrinemia: causes and consequences. *Digestive Diseases Sciences* 52, 2482-2489.
- Ou, B.X., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4619-4626.
- Paimela, H., Goddard, P.J., Silen, W., 1995. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Digestive Diseases and Sciences* 40, 2495-2496.
- Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D., Dixit, S.N., 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Plant Disease and Protection* 89, 344-349.
- Paula, A.C.B., Toma, W., Gracioso, J.S., Hiruma-Lima, C.A., Carneiro, E.M., Souza Brito, A.R.M., 2006. The gastroprotective effect of the essential oil of *Croton cajucara* is

- different in normal rats than in malnourished rats. *British Journal of Nutrition* 96, 310-315.
- Pereda-Miranda, R., Delgado, G., 1990. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products* 53, 182-185.
- Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Cerda-García-Rojas, C.M., 2001. Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenyl-5,6-dihydro- α -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* 57, 47-53.
- Peskar, B.M., 2005. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. *Inflammopharmacology* 13, 15-26.
- Porter, R.B.R., Reese, P.B., Williams, L.A.D., Williams, D.J., 1995. Acaricidal and insecticidal activities of cadina-4,10(15)-dien-3-one. *Phytochemistry* 40, 735-738.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L.W., Wu, X.L., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D.J., Ou, B.X., Jacob, R., 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3273-3279.
- Proença, C., Oliveira, R.S., Silva, A.P., 2000. Flores e frutos do Cerrado. Brasília: Ed. UnB.
- Puntarulo, S., Stoyanovsky, D.A., Cederbaum, A.I., 1999. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with antioxidant enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 372, 355-359.
- Rafatullah, S., Tariq, M., Al-Yahya, M.A., Mossa, J.S., Ageel, A.M., 1990. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 29, 25-34.

- Repetto, M., Maria, A., Guzman, J., Giordano, O., Llesuy, S., 2003. Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55, 551-557.
- Repetto, M.G., Llesuy, S.F., 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 523-534.
- Ribeiro, J.F., Walter, B.M.T., 1998. *Fitofisionomias do Bioma Cerrado*. Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Rodrigues, P.A., de Moraes, S.M., de Souza, C.M., Silva, A.R., de Andrade, G.M., Silva, M.G., Albuquerque, R.L., Rao, V.S., Santos, F.A., 2010. Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 725-730.
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., Mata, R., 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 275-283.
- Rozza, A.L., Moraes, T.D., Kushima, H., Tanimoto, A., Marques, M.O., Bauab, T.M., Hiruma-Lima, C.A., Pellizzon, C.H., 2010. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: involvement of heat-shock protein-70; vasoactive intestinal peptide; glutathione; sulfhydryl compounds; nitric oxide and prostaglandin E₂. *Chemico-Biological Interactions*, doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.031.
- Ruberto, G., Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69, 167-174.

- Rukkumani, R., Aruna, K., Varma, P.S., Menon, V.P., 2004. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55, 551-561.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91, 621-632.
- Sacchetti, G., Medici, A., Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S., Braccioli, E., Bruni, R., 2004. Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum mictanthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3486-3491.
- Saklani, A., Kutty, S.K., 2008. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today* 13, 161-171.
- Salim, A.S., 1990. Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. *Gigestion* 47, 24-28.
- Salim, A.S., 1992. Sulphydryl-containing agents: a new approach to the problem of refractory peptic ulceration. *Pharmacology* 45, 301-306.
- Salvador, M.J., Ferreira, E.O., Mertens-Talcoll, S.U., Castro, W.V., Butterweck, V., Derendorf, H., Dias, D.A., 2006. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Zeitschrift für Naturforschung C* 61, 19-25.
- Santos, F.A., Rao, V.S.N., 2000. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy research* 14, 240-244.

- Santos, F.A., Silva, R.M., Campos, A.R., de Araújo, R.P., Lima Júnior, R.C.P., Rao, V.S.N., 2004. 1,8-Cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chemistry and Toxicology* 42, 579-584.
- Schmidt, B., Ribnicky, D.M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W.T., Raskin, I., 2008. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental* 57, 3-9.
- Schnaubelt, K., 2005. Essential oil therapy according to traditional Chinese medical concepts. *The International Journal of Aromatherapy* 15, 98-105.
- Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* 23, 197-223.
- Sener-Muratoglu, G., Paskaloglu, K., Arbak, S., Hurdag, C., Yanoglu-Dulger, G., 2001. Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 46, 318-330.
- Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M., Siplet, H., 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5, 43-61.
- Silva, A.B.L., Dias, K.S., Marques, M.S., Menezes, I.A.C., Santos, T.C., Mello, I.C.M., Lisboa, A.C.C.D., Cavalcanti, S.C.H., Marçal, R.M., Antonioli, A.R., 2006. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 475-479.
- Silva, C.G., Raulino, R.J., Cerqueira, D.M., Mannarino, S.C., Pereira, M.D., Panek, A.D., Silva, J.F.M., Menezes, F.S., Eleutherio, E.C.A., 2009. *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. *Phytomedicine* 16, 761-767.

- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2004. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC.
- Singh, G., Upadhyav, R.K., Rao, G.P., 1992. Fungitoxic activity of the volatile oil of *Hyptis suaveolens*. Fitoterapia 63, 462-465.
- Smith, R.J., Sam, L.M., Justen, J.M., Leach, K.L., Epps, D.E., 1987. Human polymorphonuclear neutrophil activation with arachidonic acid. British Journal of Pharmacology 91, 641-649.
- Souza Brito, A.R.M., 1994. Manual de ensaios toxicológicos *in vivo*. Campinas/ SP – Brasil: Editora da Unicamp.
- Souza Brito, A.R.M., 1996. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. Journal of Ethnopharmacology 54, 131-138.
- Souza Brito, A.R.M., Nunes, D.S., 1997. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. Ciência e Cultura 49, 402-408.
- Souza Brito, A.R.M., Cota, R.H.S., Nunes, D.S., 1997. Gastric antiulcerogenic effects of *Dalbergia monetaria* L in rats. Phytotherapy Research 11, 314-316.
- Souza, V.C., Lorenzi, H., 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum.
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Hibi, T., 2010. *Helicobacter pilory* eradication therapy. Future Microbiology 5, 639-648.
- Szabo, S., Brown, A., 1987. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous

- sulphydryls. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine* 4, 493-497.
- Szabo, S., Goldberg, I., 1990. Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 174, 1-8.
- Szabo, S., Trier, J.S., Brown, A., Schnoor, J., 1985. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 88, 228-236.
- Szelenyi, I., Brune, K., 1988. Possible role of oxygen free-radicals in ethanol-induced gastric-mucosal damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 33, 865-871.
- Takeuchi, K., Okada, M., Niida, H., Okabe, S., 1988. 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, 836-841.
- Tatemichi, M., Ogura, T., Sakurazawa, N., Nagata, H., Sugita, M., Esumi, H., 2003. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers. *International Journal of Experimental Pathology* 84, 213-220.
- Tarnawski, A.S., 2005. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive Diseases and Sciences* 50, 24-33.
- Tarnawski, A.S., Szabo, I.L., Husain, S.S., Soreghan, B., 2001. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factor and signal transduction pathways. *Journal of Physiology, Paris* 95, 337-344.
- Tham, D.M., Whitin, J.C., Cohen, H.J., 2002. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatric Research* 51, 641-646.

- Tomei, R.R., Silva, N.S., Salvador, M.J., 2007. Estresse oxidativo: metodologias atuais para avaliação da atividade antioxidante. *Revista UniVap* 14, 26-31.
- Ueki, S., Takeuchi, K., Okabe, S., 1998. Gastric motility is an important factor in the pathogenesis of indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 33, 209-216.
- Vacca, L.L., 1985. *Laboratory Manual of Histochemistry*. New York, USA: Raven Press.
- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.F., Manfredini, V., Benfato, M.S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* 30, 1323-1338.
- Veiga-Junior, V.F., 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 308-313.
- Vonkeman, H.E., van de Laar, M.A., 2010. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 39, 294-312.
- Wallace, J.L., 2008. Prostaglandins, NSAID, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiological Reviews* 88, 1547-1565.
- Wallace, J.L., Ma, L., 2001. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 226, 1003-1015.
- Wallace, J.L., McKnight, W., Wilson, T.L., Del Soldato, P., Cirino, G., 1997. Reduction of shock-induced gastric damage by a nitric oxide-releasing aspirin derivative: role of neutrophils. *American Journal of Physiology* 273, 1246-1251.
- Wallace, J.L., Miller, M.J., 2000. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119, 512-520.

- Wei, A., Shibamoto, T., 2010. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 7218-7225.
- Whittle, B.J.R., Kauffman, G.L., Moncada, S., 1981. Vasoconstriction with thromboxane-A₂ induces ulceration of the gastric-mucosa. *Nature* 292, 472-474.
- Whittle, B.J.R., Lopezbelmonte, J., Moncada, S., 1990. Regulation of gastric-mucosal integrity by endogenous nitric-oxide - interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *British Journal of Pharmacology* 99, 607-611.
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M., Carrel, R.W., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 85, 337-341.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4026-4037.
- Yoshida, N., Yoshikawa, T., Nakamura, Y., Arai, M., Matsuyama, K., Inuma, S., Yagi, N., Naito, Y., Miyasaka, M., Kondo, M., 1995. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences* 40, 2300-2304.
- Yoshikawa, T., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Takahashi, S., Naito, Y., Motoharu, K., 1993. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indometacin in rats. *Gut* 3, 732-737.
- Yuan, Y.H., Padol, I.T., Hunt, R.H., 2006. Peptic ulcer disease today. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology* 3, 80-89.

Zablocka, A., Janusz, M., 2008. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* 62, 118-124.

Zimmerman, B.J., Granger, D.N., 1994. Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: role in ischemia-reperfusion injury. *Hepato-gastroenterology* 41, 337-342.