



**Atividade gastroprotetora do óleo essencial de *Citrus lemon* (Rutaceae),
de seus componentes principais Limoneno e β -pineno
e do óleo essencial de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae).**

ARIANE LEITE ROZZA

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon

Co-orientadora: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da UNESP de Botucatu para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de Concentração:
Farmacologia).

Botucatu/SP

- 2009 -

**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Instituto de Biociências**

**Atividade gastroprotetora do óleo essencial de *Citrus lemon* (Rutaceae),
de seus componentes principais Limoneno e β -pineno
e do óleo essencial de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae).**

ARIANE LEITE ROZZA

**Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon
Co-orientadora: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da UNESP de Botucatu para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de Concentração:
Farmacologia).

Botucatu/SP

- 2009 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Rozza, Ariane Leite.

Atividade gastroprotetora do óleo essencial de *Citrus lemon* (Rutaceae), de seus componentes principais Limoneno e β -pineno e do óleo essencial de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae) / Ariane Leite Rozza. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Cláudia Helena Pellizzon

Co-orientadora: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Assunto CAPES: 21000000

1. Plantas medicinais - Uso terapêutico 2. Sistema gastrointestinal - Doenças - Tratamento 3. Produtos naturais - Efeito fisiológico

CDD 581.63

Palavras-chave: *Citrus lemon*; Limoneno; β -pineno; *Croton cajucara*; Úlceras gástricas.

Auxílio Financeiro



Processo 07/53128-3

Epígrafe

*“Todo saber e todo aumento de saber,
em vez de terminar em uma solução,
dá antes início a nova dúvida.
Aumentar o saber significa aumentar as dúvidas.
E a cada resposta, nova pergunta se segue.”*

Hermann Hesse

Dedicatória

Aos meus pais e minha irmã, que continuam sendo os grandes motivos dos meus pequenos esforços,

Aos pesquisadores que se dedicam ao estudo das plantas medicinais, em todos os seus aspectos, seja etnológico, farmacológico, botânico, químico... espero ter colaborado um pouquinho para o crescimento dessa teia!

As pessoas que se interessam pelos estudos sobre plantas medicinais, as pessoas que se utilizam delas para sua saúde, e até aquelas que repetem a falsa e absurda crença de que “se não fizer bem, mal não faz”.

“O seu fruto servirá de alimento, e a sua folha, de remédio.”

Ezequiel 47, 12.

Agradecimentos

A Deus, o único e verdadeiro *mestre* no real sentido da palavra,

Ao meu pai, minha mãe, minha irmã e minha avó que, vendo o trabalho pronto, devem entender melhor minha ausência em tantas datas, agradeço por tudo, inclusive pela bolsa-pai e bolsa-mãe (rs),

A minha orientadora Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon, a quem devo tudo o que aprendi nessa caminhada pela pesquisa, e também pela amizade, companhia, paciência e, claro, muitas gargalhadas,

A minha co-orientadora Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima, sempre com respostas prontas as minhas perguntas (principalmente aquela: ‘o que eu faço agora?’), com carinho e paciência,

Aos membros titulares e suplentes da banca de defesa, Profa. Dra. Maria de Lourdes Mendes Vicentini Paulino, Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima e Dra. Maira Cola Miranda, por atenderem ao nosso convite, valorizando o nosso trabalho,

Aos meus amigos do laboratório: Paulo Rita Kdillac, Jean Monje, Alexandre Kitasato, Bianca Joplin e Gustavo Sinhá, pelas ajudas nos experimentos, pela amizade e pelas baladinhas e cervejinhas, não menos importantes!

Aos amigos Thiago Mingo, Hélio Pon Pon e Flávia Kalose, pela ajuda braçal e intelectual nos experimentos, pela companhia e amizade,

Aos amigos Lucas Ku, Rodrigo Aerolito, Renato Lazarento e Eduardo Popetar, não tenho palavras pra dizer o quanto vocês me fazem feliz (meus *parças!*),

Aos demais amigos da pós-graduação Catarine, Fábio Kuika, Celso Saks, Anthony, Diego, Mariana, e do departamento de Morfologia Flávia, Kelly, Lívia, Joyce, Allan, a secretária Luciana e o técnico Ricardo,

A XXXIX turma de Biologia da Unesp de Botucatu, a gloriosa, a última das trigésimas, pessoas com quem compartilhei os melhores anos e são parte do que eu sou,

A Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, do Instituto Agrônômico de Campinas, pela identificação dos componentes do óleo essencial de *Citrus lemon*,

A Profa. Dra. Taís Maria Bauab, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pelos testes microbiológicos,

Ao Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes, da Universidade Federal de Ponta Grossa, pela extração do óleo essencial de *Croton cajucara*,

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio di Stasi, sempre emprestando de boa vontade o espectrofotômetro,

Ao Prof. Dr. André Sampaio Pupo e Profa. Dra. Maeli Dal-Pai Silva, que foram banca da minha qualificação e me ajudaram muito com seus comentários e sugestões,

Aos funcionários da seção de pós-graduação Serginho, Lucilene, Maria Helena e Herivaldo, sempre dispostos, ajudando e quebrando os galhos!

A FAPESP, pelo auxílio financeiro,

Enfim... a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho. E também aos que não contribuíram com o trabalho, mas me deram força para seguir adiante!

Muito obrigada a todos!

"Um amigo é uma única alma, que vive em dois corpos." Aristóteles

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos testar a atividade gastroprotetora de úlceras gástricas e mecanismos de ação do óleo essencial de *Croton cajucara* (CC), do óleo essencial de *Citrus lemon* (CL) e dos constituintes majoritários de CL, que são o Limoneno (L) e o β -pineno (P). Assim, foram realizados modelos de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto para CL, L, P e CC e por droga anti-inflamatória não esteroide (Indometacina) para CL, L e P. Todos os resultados foram expressos em média \pm epm ($p < 0.05$). No modelo de indução de úlceras por etanol absoluto, a área das lesões (mm^2) foi $0.00 \pm 0.00^{**}$ para CL, L e CC (100% de gastroproteção), 73.20 ± 27.32 para P, que não exerceu efetiva gastroproteção (53.26%), $22.27 \pm 8.21^{**}$ para o controle positivo (85.80%) e 156.60 ± 36.30 para o veículo. O escore microscópico indicou excelente preservação da mucosa por CL^{**}, L^{***} e CC^{***}. A área de marcação imunoistoquímica para *heat shock protein 70* foi estatisticamente maior nos grupos CL, L, P e CC e para peptídeo intestinal vasoativo foi maior nos grupos CL, L e P. Os níveis de glutatona (GSH, em $\mu\text{g/ml}$) foram $1182.00 \pm 52.47^{**}$ para CL, $1316.6 \pm 67.75^{**}$ para L, $1286.5 \pm 93.15^*$ para CC, $1195.60 \pm 37.57^{**}$ para o controle positivo, $982.8 \pm 79.07^{**}$ para o veículo e 1704.30 ± 149.03 para o grupo branco. Na indução de úlcera por Indometacina, CL exerceu gastroproteção de 98.3% com área de lesão (mm^2) $0.85 \pm 0.85^{**}$, L exerceu gastroproteção de 50.1% (área lesada $24.34 \pm 5.3^{**}$), P não exerceu efetivo efeito gastroprotetor (37%) com área lesada 30.66 ± 4.22 , contra 66.6% de gastroproteção e $16.27 \pm 4.49^{**}$ para o controle positivo e 48.72 ± 6.64 de área lesada para o veículo. CL administrado isoladamente manteve os níveis gástricos de PGE_2 (em ng/ml) em $18,25 \pm 2,58$, mesmo com a administração em conjunto com Indometacina (droga que inibe a síntese de PGE_2) (17.89 ± 1.55), contra 14.56 ± 1.58 para o veículo e $7.00 \pm 1.31^{**}$ para o veículo + Indometacina e 21.14 ± 1.14 para o branco. Já L manteve elevados os níveis de PGE_2 (16.54 ± 1.77), mas não quando administrado em conjunto com Indometacina ($10.21 \pm 2.17^{**}$). O efeito gastroprotetor de CC é dependente dos compostos sulfidrílicos (SH), mas não do óxido nítrico (NO). CL e CC apresentaram concentração inibitória mínima de 125 $\mu\text{g/ml}$ e L de 75 $\mu\text{g/ml}$ para a bactéria *Helicobacter pylori*. CL e L têm eficácias semelhantes na gastroproteção contra úlceras induzidas por etanol e Indometacina, então L contido no óleo essencial CL é o responsável isolado pelo efeito gastroprotetor que CL exerce. O mecanismo de ação gastroprotetor de CL e L envolve ativação de HSP-70 e VIP e manutenção de PGE_2 , mas não está envolvido com a glutatona. CC tem excelente atividade gastroprotetora contra etanol e Indometacina, ativando HSP-70 e SH mas não NO, VIP nem glutatona.

ABSTRACT

This study aimed to test the gastroprotective activity and the mechanism of action of the essential oil of *Croton cajucara* (CC), the essential oil of *Citrus lemon* (CL) and the majoritary substances present in CL, wich are Limonene (L) and β -pinene (P). Then, gastric ulcers in rats were induced by absolute ethanol after oral treatment with CL, L, P and CC and by indometacin (non-steroidal anti-inflammatory drug) after oral treatment with CL, L and P. All results were expressed in mean \pm standard error mean ($p < 0.05$). In ethanol-induced gastric ulcer, the ulcer area (mm^2) were $0.00 \pm 0.00^{**}$ for CL, L and CC (100% of gastroprotection), 73.20 ± 27.32 for P (53.26% of the ulcer area was reduced, however there was no effective gastroprotection), $22.27 \pm 8.21^{**}$ for the positive control (85.80%) and 165.60 ± 36.30 for the vehicle. The microscopic score showed gastric mucosa was preserved in CL^{**}, L^{***} and CC^{***}. The marked area for heat shock protein 70 (HSP-70) and vasoactive intestinal peptide (VIP) immunohistochemistries were statistically augmented in CL, L and P groups. The levels of glutathione (GSH, $\mu\text{g/ml}$) were $1182.00 \pm 52.47^{**}$ for CL, $1316.6 \pm 67.75^{**}$ for L, $1286.5 \pm 93.15^*$ for CC, $1195.60 \pm 37.57^{**}$ for the positive control, $982.8 \pm 79.07^{**}$ for the vehicle and 1704.30 ± 149.03 for the sham group. In the indomethacin-induced gastric ulcer, CL offered 98.3% gastroprotection (ulcer area $0.85 \pm 0.85^{**}$), L offered 50.1% gastroprotection (ulcer area $24.34 \pm 5.3^{**}$), P did not show gastroprotective effect (37%) and presented ulcer area 30.66 ± 4.22 . The positive control offered 66.6% gastroprotection (ulcer area $16.27 \pm 4.49^{**}$) and the vehicle presented ulcer area 48.72 ± 6.64 . CL was able to maintain the PGE₂ levels (ng/ml) 18.25 ± 2.58 near to sham group (21.14 ± 1.14), even with indomethacin (PGE₂ inhibitor) administration (17.89 ± 1.55), compared with 14.56 ± 1.58 for the vehicle and $7.00 \pm 1.31^{**}$ for the vehicle + indomethacin. Furthermore, L kept high levels of PGE₂ (16.54 ± 1.77), however not when administered with indomethacin ($10.21 \pm 2.17^{**}$). The gastroprotective effect of CC is involved with the sulfhydryl compounds (SH) but is not involved with nitric oxide (NO). CL and CC presented minimum inhibitory concentration (MIC) against *Helicobacter pylori* equal to 125 $\mu\text{g/ml}$. L presented MIC 75 $\mu\text{g/ml}$. CL and L have showed equivalent efficacy in gastroprotection against absolute ethanol and indomethacin-induced gastric ulcers, therefore L contained in the CL essential oil is the responsible for the gastroprotective effect offered by CL. CL and L mechanism of action involves HSP-70 and VIP activation and maintenance of PGE₂ levels, but is not involved with glutathione. CC has gastroprotective effect against ethanol and indomethacin, activating HSP-70 and SH compounds, but not VIP neither NO nor maintaining the glutathione levels.

ÍNDICE

Capítulo I – Introdução.....	1
1. Úlceras Pépticas.....	1
2. Gastroproteção.....	2
3. Terapêutica Atual.....	4
4. Plantas Medicinais.....	6
5. Referências Bibliográficas.....	8
Capítulo II – Avaliação do efeito gastroprotetor do óleo essencial de <i>Citrus lemon</i> e de seus componentes Limoneno e β-Pinoeno.....	13
1. <i>Citrus lemon</i>	13
2. Material e Métodos.....	14
3. Resultados e Discussão.....	18
4. Conclusões.....	29
5. Referências Bibliográficas.....	30
6. Anexos.....	39
Capítulo III – Avaliação do efeito gastroprotetor do óleo essencial da casca de <i>Croton cajucara</i>.....	42
1. <i>Croton cajucara</i>	42
2. Material e Métodos.....	43
3. Resultados e Discussão.....	46
4. Conclusões.....	53
5. Referências Bibliográficas.....	53
6. Anexos.....	59

CAPÍTULO I

Introdução

1. ÚLCERAS PÉPTICAS

O trato gastrointestinal é um ambiente dinâmico que permite a entrada de nutrientes enquanto restringe a entrada de antígenos, toxinas e microrganismos, e responde a agentes luminais potencialmente prejudiciais, num processo de defesa da mucosa (Wallace & Devchand, 2005). O desequilíbrio entre fatores agressores à mucosa e a habilidade da mucosa em defender-se e curar-se leva à formação de úlcera péptica (Repetto & Llesuy, 2002; Lu & Graham, 2006). Entre os fatores agressores, incluem-se hábitos alimentares inadequados, ingestão excessiva de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, consumo de bebidas alcoólicas, estresse, predisposição genética, elevada secreção de ácido clorídrico, pepsina e sais biliares e infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (Peckenpaugh, 1997). Mesmo a secreção ácida normal pode causar ulceração na mucosa quando alguns fatores gastroprotetores estão prejudicados (Jainu & Devi, 2006; Laine et al., 2008).

Úlcera péptica é uma área lesada na mucosa gástrica ou duodenal causada pela ação do suco gástrico. É uma doença crônica e recorrente (Guyton & Hall, 2006) e o distúrbio gastrointestinal mais comum na prática clínica (Bafna & Balaraman, 2004). É uma das doenças crônicas mais comuns em adultos, ocorrendo em 5% a 10% da população. Embora apresente chance de cura superior a 95%, a chance de reincidência está entre 65% a 80% até um ano após a cura e quase 100% até dois anos (Fan et al., 2005).

Apesar dos grandes avanços no conhecimento dela, sua etiologia ainda não é totalmente conhecida. As hipóteses mais prováveis da etiopatogênese da doença ulcerosa agrupam fatores genéticos (hereditariedade), distúrbios fisiopatológicos (retardo do esvaziamento gástrico e o refluxo biliar duodeno gástrico) e fatores ambientais (Carvalho, 2000).

Desse modo, por estar associada a alguns hábitos comuns nos dias atuais, alguns autores consideram-na uma nova epidemia do século XXI (O'Malley, 2003). A úlcera péptica já foi considerada a maior causa de morbidade e mortalidade por mais de um século (Chan & Leung, 2002), e ainda é considerada um grande fator sério de morbidade, havendo alto índice de morte em casos extremos, como em úlceras hemorrágicas promovidas pelo estresse (Sontaj, 1997; Spirt, 2004). A úlcera gástrica é responsável por altos custos com saúde. Nos Estados Unidos, as estimativas de gastos com faltas ao trabalho, hospitalização e cuidados

com pacientes, excluindo custos com medicamentos, somam mais de US\$ 5 bilhões por ano (Wallace & Devchand, 2005). Aproximadamente 4 milhões de pessoas têm úlceras pépticas, sendo que a cada ano 350 mil novos casos são diagnosticados, cerca de 100 mil pacientes são hospitalizados e pelo menos 3000 pessoas morrem em decorrência dessa enfermidade (Crawford, 2000). No Brasil, não existem números oficiais, mas segundo dados do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, calcula-se que 10% da população têm, tiveram ou terão úlcera péptica (Eisig & Laudanna, 2001).

2. GASTROPROTEÇÃO

É sabido que o estômago pode se defender de injúrias causadas por uma variedade de agentes irritantes e nocivos devido à ativação de várias linhas de defesa, num processo conhecido como defesa da mucosa (do inglês *mucosal defense*) (Brzozowski et al., 2005). Este termo é usado para descrever os vários fatores e componentes que permitem a mucosa permanecer intacta apesar de sua freqüente exposição à substâncias com larga variação de temperatura, pH e osmolaridade, assim como substâncias com ações detergentes ou citotóxicas e produtos bacterianos capazes de causar reações inflamatórias sistêmicas e locais (Wallace & Granger, 1996). Esse processo de defesa inclui mecanismos locais e neurohormonais. Entre os mecanismos locais, os mais importantes incluem a barreira muco-bicarbonato-fosfolipídeos, as células epiteliais de superfície e sua capacidade de regeneração rápida, o fluxo alcalino, a geração contínua de prostaglandinas E_2 e I_2 (PGE_2 e PGI_2), a microcirculação na mucosa (Brzozowski et al., 2005; Laine et al., 2008) e a liberação de óxido nítrico e compostos sulfidrílicos (Paula, 2003).

A barreira formada por muco, bicarbonato e fosfolipídeos surfactantes constitui a primeira linha de defesa da mucosa (Allen & Flemström, 2005). O muco é secretado pelas células epiteliais secretoras de muco e células mucosas do colo e seus principais constituintes são glicoproteínas, mucinas e água (Phillipson et al., 2008). Sua secreção é estimulada pelos hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, PGE_2 e agentes colinérgicos (Allen & Flemström, 2005; Montrose et al., 2006). Substâncias ulcerogênicas dissipam o muco e a camada de fosfolipídeos, levando a re-difusão de ácido e injúria a mucosa (Darling et al., 2004). A camada muco-bicarbonato-fosfolipídeos retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais, mantendo um microambiente de pH neutro na superfície das células e prevenindo a penetração de pepsina e consequente proteólise do epitélio (Tarnawski et al., 2001; Valcheva-Kuzmanova et al., 2005). O muco também atua como lubrificante para reduzir o dano físico

ao epitélio causado pelos materiais ingeridos e como armadilha para as bactérias, diminuindo a possibilidade de que bactérias acessem o epitélio (Belley et al., 1999; Wallace, 2008) A superfície do muco é coberta por uma película de fosfolipídeos surfactantes com fortes propriedades hidrofóbicas. Ela é a única barreira pré-epitelial entre o lúmen e o epitélio. Quando ela está prejudicada, a próxima série de mecanismos protetores entra em ação, incluindo a neutralização intracelular de ácido, rápido reparo epitelial e manutenção e distribuição de fluxo sanguíneo na mucosa (Laine et al., 2008).

A próxima linha de defesa é formada por uma camada contínua de células epiteliais de superfície, que secreta muco e bicarbonato e gera prostaglandinas e proteínas *heat-shock*. Devido à presença dos fosfolipídios na superfície, essas células são hidrofóbicas, repelindo agentes danosos solúveis em ácido ou água (Lichtenberger, 1999). Essas células formam uma barreira que previne a re-difusão de ácido e pepsina (Tarnawski, 1998; Allen & Flemström, 2005) e sua renovação é contínua.

O chamado fluxo alcalino ocorre porque células parietais que secretam ácido clorídrico no lúmen da glândula gástrica simultaneamente secretam bicarbonato no interstício e lúmen dos capilares sanguíneos adjacentes. Esse bicarbonato é transportado para a base das células epiteliais superficiais e para o lúmen gástrico, onde contribui para a manutenção da camada muco-bicarbonato (Laine et al., 2008).

A contínua geração de PGE₂ e PGI₂ também é crucial para manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes. Quase todos os mecanismos de defesa são estimulados ou facilitados pelas prostaglandinas. Elas inibem a secreção ácida, estimulam produção de muco e bicarbonato, aumentam o fluxo sanguíneo, aumentam os componentes sulfidrílicos na mucosa e aceleram restituição epitelial e cicatrização da mucosa (Brzozowski et al., 2005). Robert et al. (1979) descobriu que as prostaglandinas, o principal produto do metabolismo do ácido aracdônico através da atividade da enzima ciclooxigenase (COX), poderiam ser cruciais para a manutenção da integridade da mucosa. Ele chegou a essa conclusão através de experimentos em que a prostaglandina aplicada exogenamente prevenia danos a mucosa gástrica induzidos por diferentes agentes, como etanol, ácido forte (HCl), base (NaOH), solução hiperosmótica (NaCl hipertônico), bile concentrada e até água fervente. Assim ele criou a expressão “citoproteção”.

Já a microcirculação na mucosa é essencial para entrega de oxigênio e nutrientes e remoção de substâncias tóxicas. Quando a mucosa gástrica é exposta a um agente irritante ou quando ocorre a re-difusão de ácido, há rápido aumento no fluxo sanguíneo, que permite remover ou diluir o retorno do ácido gástrico. Essa resposta parece ser essencial para a defesa

da mucosa porque a restrição mecânica do fluxo sanguíneo leva a necrose hemorrágica (Laine et al., 2008).

No início da década de 90, o óxido nítrico (NO) emergiu como importante mediador de defesa da mucosa gástrica (Tadic et al., 2008). O NO, que é gerado pela enzima NO-sintase, é responsável pelo aumento no fluxo sanguíneo na mucosa em resposta à secreção ácida, modulando a microcirculação (Peskar, 2001; Holzer, 2006). NO endógeno ou exógeno protege a mucosa gástrica de lesão por etanol e endotelina-1, enquanto a inibição de NO-sintase (resultando em queda na produção de NO) aumenta a injúria à mucosa gástrica (Tarnawski, 1998; Holzer, 2006).

Os compostos sulfidrílicos (SH) estimulam a formação de muco, ligam-se as espécies reativas de oxigênio (que estão envolvidas no dano tecidual) e ainda participam da síntese de proteínas (Salim, 1992). O desenvolvimento de úlceras induzidas por etanol leva a queda na concentração de compostos SH, que são neutralizados quando se ligam aos radicais livres que são produzidos a partir da injúria tecidual causada pelo etanol (Reyes-Trejo et al., 2008).

Somados aos fatores locais, a defesa da mucosa gástrica é regulada, em parte, também pelo sistema nervoso central e fatores hormonais (regulação neurohormonal) (Ham & Kaunitz, 2007; Peskar, 2001; Brzozowski et al., 2005 b). Vários peptídeos, como gastrina e colecistoquinina, tem função gastroprotetora (Laine et al., 2008). A ativação vagal estimula produção de muco e aumenta o pH intracelular no estômago dos ratos (Tanaka et al., 1997). Entretanto, as vias neural e hormonal também podem estimular a secreção de ácido gástrico através de receptores na membrana basolateral das células parietais e enzimas localizadas na superfície das células parietais. Os mediadores para as vias neural e hormonal são acetilcolina (ACh), liberada pelo nervo vago, gastrina, liberada pelas células G, e histamina, liberada pelas células *enterochromaffin-like* (ECL) (Aihara et al., 2003).

3. TERAPÊUTICA ATUAL

Muitos produtos farmacêuticos têm sido utilizados para o tratamento de úlceras, resultando em quedas na taxas de mortalidade e morbidade, mas eles não são completamente efetivos e produzem uma série de efeitos colaterais (Rates, 2001).

Na tentativa de proteger a mucosa do ácido gástrico, acelerar a cicatrização e prevenir a recorrência da úlcera, o controle farmacológico da secreção ácida tem representado um alvo importante. Vários fármacos, como os antagonistas dos receptores histaminérgicos e colinérgicos, inibidores da H⁺/K⁺-ATPase e agentes citoprotetores têm sido desenvolvidos, e muito deles ativamente utilizados para o tratamento de doenças gástricas (Aihara et al., 2003).

Nos casos em que a úlcera péptica está relacionada à presença da bactéria *H. pylori*, os fármacos antiúlcera são então associadas com antibióticos (Hoogerwerf & Pasricha, 2003; McQuaid, 2005).

O primeiro antagonista dos receptores H_2 foi desenvolvido por Black et al. (1972) e, com pequenas alterações, Brimblecombe et al. (1975) desenvolveram a cimetidina, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}N_6S$, a qual foi amplamente prescrita para o tratamento de úlceras pépticas no mundo inteiro. Através da modificação da estrutura química da cimetidina, foram desenvolvidas a ranitidina ($C_{13}H_{22}N_4O_3S$), a famotidina ($C_8H_{15}N_7O_2S_3$) e a nizatidina ($C_{12}H_{21}N_5O_2S_2$) (Aihara et al., 2003). Esses fármacos inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores na membrana basolateral das células parietais (Hoogerwerf & Pasricha, 2003). O desenvolvimento dessa classe de fármacos trouxe marcante melhora na qualidade de vida para grande número de pacientes, além de redução dramática no uso de intervenção cirúrgica para o tratamento da úlcera (Aihara et al., 2003). Porém, dados na literatura indicam que as úlceras cicatrizadas espontaneamente ou depois do uso de cimetidina (antagonista H_2) são precariamente vascularizadas e têm de 2 a 3 vezes menos densidade de vasos sanguíneos novos do que no tecido normal ao redor, o que pode ser uma das razões da alta taxa de reincidência das úlceras gástricas (Szabo & Vincze, 2000).

A identificação da chamada bomba de prótons, $H^+/K^+-ATPase$, como o passo final da secreção ácida gástrica proporcionou uma oportunidade única para o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos que hoje são os supressores da secreção ácida gástrica mais eficazes. Fellenius et al. (1981) descobriram que os derivados benzimidazóis inibiam fortemente a secreção ácida gástrica. Depois da triagem de um vasto número de derivados, o primeiro inibidor da bomba foi descoberto: o omeprazol, cuja fórmula molecular é $C_{17}H_{19}N_3O_3S$. Atualmente, existem vários inibidores da bomba de próton disponíveis para o uso clínico: omeprazol, lansoprazol ($C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$), rabeprazol ($C_{18}H_{21}N_3O_3S$) e pantoprazol ($C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$), apresentando potente e persistente efeito antissecretor (Aihara et al., 2003; Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

Assim, os fármacos anti-secretórios e bloqueadores dos receptores histamínicos H_2 têm sido exaustivamente usados para controlar a secreção ácida aumentada e o desenvolvimento das úlceras gástricas, porém, eles resultam em efeitos adversos e reincidência em longo prazo (Martelli et al., 1998; Wolfe & Sachs, 2000). Estudos têm mostrado que o uso prolongado de antagonistas H_2 e inibidores da bomba de prótons pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer (La Vecchia & Tavani, 2002; Raghunath et al.,

2005). Além disso, podem causar outros efeitos indesejáveis, tais como arritmia cardíaca, impotência sexual masculina, ginecomastia, alterações hematopoiéticas, náuseas, dores abdominais, prisão de ventre, flatulência, diarreia e cefaléia (Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

A carbenoxolona ($C_{34}H_{50}O_7$), um derivado do ácido glicirrízico encontrado na raiz de *Glycyrrhiza glabra* (família Fabaceae), conhecida popularmente como alcaçuz, tem sido utilizada com relativo sucesso no tratamento das úlceras na Europa. Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado, mas acredita-se que esteja envolvido com alteração na composição e quantidade de muco (Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

4. PLANTAS MEDICINAIS

Devido aos efeitos colaterais apresentadas pelos fármacos antiulcerogênicos atuais, há crescente interesse em terapias alternativas como o uso de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas (Rates, 2001; Schmeda-Hirschmann & Yesilada, 2005). A maioria dos fármacos derivados de plantas reduz os fatores agressores à mucosa e é segura, clinicamente eficaz, mais tolerável para o paciente, relativamente barata e globalmente competitiva (Goel & Sairam, 2002).

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (Maciel *et al.*, 2002). Os primeiros registros do uso de plantas provêm da China (cerca de 3000 a.C.), onde o Imperador Shen Nung compilou o *Pen Tsao* (Compêndio de Matéria Médica Chinesa). Este livro teve várias edições subsequentes, e muitas das 1000 ou mais drogas descritas ainda são utilizadas na China (Langmead & Rampton, 2001).

Ao longo do tempo, têm sido registrados vários procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (Veiga Jr *et al.*, 2005), subsidiando a importância do estudo farmacológico das plantas medicinais.

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65% a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Veiga Jr et al., 2005). Cerca de 25% dos fármacos prescritos a redor do mundo vêm das plantas, 121 como compostos ativos em uso corrente. Entre os 252 fármacos considerados como básicos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente vegetal e um número significativo são fármacos sintéticos obtidos de precursores naturais (Rates, 2001).

As informações existentes sobre a magnitude do mercado de compostos de origem vegetal são pouco precisas. Estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 20 bilhões são originados de substâncias ativas derivadas de plantas (Robbers et al., 1996). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), devido ao baixo poder aquisitivo ou a falta de acesso a medicamentos modernos, cerca de 60 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas para os cuidados primários com a saúde (Akerlele, 1993). Esta é a base da importância científica e social do estudo das plantas medicinais.

Segundo Mahady (2001), as plantas medicinais tornaram-se um tópico de importância global crescente nos últimos anos, tendo repercussões tanto sobre a saúde mundial quanto no comércio internacional. Tal fato pode se dever ao interesse das populações na medicina preventiva e ao desapontamento com o alto custo e os efeitos colaterais dos medicamentos alopáticos sintéticos.

As plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, sendo consideradas um promissor caminho para a descoberta de novos fármacos. Na natureza, os óleos essenciais têm importante função na proteção das plantas, com ação antibacteriana, antiviral, antifúngica, inseticida e também contra herbívoros por reduzir o apetite deles por essas plantas. Eles também atraem alguns insetos que favorecem a dispersão de pólen e sementes e repelem insetos prejudiciais. São extraídos de várias plantas aromáticas, geralmente localizadas em países temperados a quentes e tropicais, onde eles representam parte importante da farmacopéia tradicional. São líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos e com densidade geralmente menor que a água. Caracterizam-se por forte aroma e são formados como metabólitos especiais de plantas aromáticas. Conhecidos por sua propriedade anti-séptica e propriedades medicinais de sua fragrância (aromaterapia), eles são usados na preservação de alimentos, antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos, anestésicos locais, entre outros usos (Bakkali et al., 2008).

Os óleos essenciais podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta e são estocados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Geralmente, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os componentes incluem dois grupos de origens biossintéticas distintas (Pichersky et al., 2006). O grupo principal é composto de terpenos e terpenóides e outro grupo, de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (Bakkali et al., 2008).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aihara T, Nakamura E, Amagase K, Tomita K, Fujishita T, Furutani K, Okabe S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacology & Therapeutics*, 98: 109-127, 2003.

Akerele O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbalgram*, 28: 13-19, 1993.

Allen A & Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288: C1–C19, 2005.

Bafna PA & Balaraman R. Anti-ulcer and antioxidant activity of DHC-1, a herbal formulation. *J Ethnopharmacol*, 90: 123–127, 2004.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol*, 46: 446–475, 2008.

Belley A, Keller K, Gottke M, Chadee K. Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am J Trop Med Hyg*, 60(4): 10–15, 1999.

Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature*, 236: 385-390, 1972.

Brimblecombe RW, Duncan WAM, Durant DJ, Ganellin CR, Parsons EM. Cimetidine, a non-thiourea H₂-receptors. *J Int Med Res*, 3: 86-92, 1975.

Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol*, 56(5): 33-55, 2005.

Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D, Konturek SJ, Pawlik M, Sliwowski Z, Pawlik WW, Hahn EG. Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defense. *Inflammopharmacology*, 13(1-3): 45–62, 2005 b.

Carvalho AST. Artigo de Revisão: Úlcera Péptica. *Jornal de Pediatria*, 76(2): 127-134, 2000.

- Chan FL & Leung WK. Peptic ulcer disease. *Lancet*, 360: 933-941, 2002.
- Crawford JM. O trato gastrointestinal. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 697-758, 2000.
- Darling RL, Romero JJ, Dial EJ, Akunda JK, Langenbach R, Lichtenberger LM. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. *Gastroenterology*, 127: 94–104, 2004.
- Eisig JN & Laudanna AA. Úlcera péptica. Programa de saúde da família, 2001. Disponível em: http://ids.saude.uol.com.br/psf/medicina/tema5/texto81_definicao.asp Acesso em: 25/01/2007
- Fan TY, Feng QQ, Jia CR, Fan Q, Li CA, Bai XL. Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. *World J Gastroenterol*, 11(8): 1204-1209, 2005.
- Fellenius E, Berglindh T, Sachs G, Olbe L, Elander B, Sjostrand SE, Wallmark, B. Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H⁺/K⁺) ATPase. *Nature*, 290: 159-161, 1981.
- Goel RK & Sairam K. Antiulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasna*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. *Indian J Pharmacol*, 34: 100–110, 2002.
- Guyton AC & Hall JE. Fisiologia dos Distúrbios Gastrointestinais. In: Tratado de Fisiologia Médica, 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 820: 2006.
- Ham M & Kaunitz JD. Gastroduodenal defense. *Curr Opin Gastroenterol*, 23: 607–616, 2007.
- Holzer P. Neural regulation of gastrointestinal blood flow. In: Johnson LR, ed. Physiology of the gastrointestinal tract. 4^a ed. New York: Academic Press, 817–839, 2006.
- Hoogerwerf WA & Pasricha PJ. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: Hardman JG & Limbird LE. Goodman & Gilman, As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.
- Jainu M & Devi CSS. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. *J Ethnopharmacol*, 104: 156–163, 2006.
- La Vecchia C & Tavani A. A review of epidemiological studies on cancer in relation to the use of anti-ulcer drugs. *Eur J Cancer Prev*, 11(2): 117-123, 2002.

Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology*, 135: 41–60, 2008.

Langmead L & Rampton DS. Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease: benefits and dangers. *Aliment Pharmacol Ther*, 15: 1239-1252, 2001.

Lichtenberger LM. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*, 15: 463–472, 1999.

Lu H & Graham DY. New development in the mechanistic understanding of peptic ulcer diseases. *Drug Discov Today*, 3(4): 431-437, 2006.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*, 25 (3): 429-438, 2002.

Mahady GB. Global harmonization of herbal health claims. *J Nutr*, 131: 1120S-1123S, 2001.

Martelli A, Mattlioli F, Mereto E, Brambilla CG, Sini D, Bergamaschi R, Brabilla G. Evaluation of omeprazole genotoxicity in a battery of in vitro and in vivo assays. *Toxicol*, 30: 29–41, 1998.

McQuaid KR. Fármacos utilizados no tratamento das doenças gastrointestinais. In: Katzung BG. *Farmacologia básica & clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 867-891, 2005.

Montrose MH, Yasutada A, Takeuchi K, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense. In: Johnson LR. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 4^a ed. New York: Academic Press, 1259–1291, 2006.

O'Malley P. Gastric ulcers and GERD: the new "plagues" of the 21st century update for the clinical nurse specialist. *Clin Nurse Spec*, 17(6): 286-289, 2003.

Paula ACB. Correlação entre a desnutrição protéica e o processo de formação e reparação de úlceras gástricas: efeito protetor/curativo do óleo essencial de *Croton cajucara Benth*. Tese de doutorado UNICAMP, 2003.

Peckenpaugh NJ. *Nutrição: Essência e Dietoterapia*, 7^a Ed. São Paulo: Roca, 1997.

Peskar BM. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. *J Physiol Pharmacol*, 52: 555–568, 2001.

Phillipson M, Johansson MEV, Henriksnas J, Petersson J, Gendler SJ, Sandler S, Persson AEG, Hansson GC, Holm L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295: G806–G812, 2008.

Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311: 808–811, 2006.

Raghunath AS, O'Morain C, Mcloughlin RC. Review article: the long-term use of proton-pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther*, 22 (1): 55-63, 2005.

Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613, 2001.

Repetto MG & Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res*, 35: 523-534, 2002.

Reyes-Trejo B, Sánchez-Mendoza ME, Becerra-García AA, Cedillo-Portugal E, Castillo-Henkel C, Arrieta J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *J Pharm Pharmacol*, 60: 931-936, 2008.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterol*, 77: 433-440, 1979.

Salim AS. Sulphydryl-containing agents: a new approach to the problem of refractory peptic ulceration. *Pharmacology*, 45(6): 301-306, 1992.

Schmeda-Hirschmann G, Yesilada E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *J Ethnopharmacol*, 100: 61-66, 2005.

Sontaj SJ. Guilty as charged: bugs and drugs in gastric ulcer. *Am J Gastroenterol*, 92(8): 1255-1261, 1997.

Spiert MJ. Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy. *Clin Ther*, 26 (2): 197-213, 2004.

Szabo S & Vincze Á. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *J Physiol*, 94: 77-81, 2000.

Tadic VM, Dobric S, Markovic GM, Dordevic SM, Arsic IA, Menkovic NR, Stevic T. Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of Hawthorn berries ethanol extract. *J Agric Food Chem*, 56: 7700-7709, 2008.

Tanaka S, Taché Y, Kaneko H, Guth PH, Kaunitz JD. Central vagal activation increases mucus gel thickness and surface cell intracellular pH in rat stomach. *Gastroenterology*, 122(2): 409-417, 1997.

Tarnawski A. Cellular and molecular mechanisms of mucosal defense and repair. In: Yoshikawa T, Arakawa T. Bioregulation and its disorders in gastrointestinal tract. Tokyo, Japan: Blackwell Science, 3-17, 1998.

Tarnawski A, Szabo IL, Husain SS, Soreghan B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *J Physiol Paris*, 95(1-6): 337-344, 2001.

Valcheva-Kuzmanova S, Marazova K, Krasnaliev I, Galunska B, Borisova P, Belcheva A. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 56(6): 385-392, 2005.

Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. *Plantas medicinais: cura segura? Quim. Nova*, 28(3): 519-528, 2005.

Wallace JL & Devchand PR. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. *Br J Pharmacol*, 145(3): 275-282, 2005.

Wallace JL & Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J*, 10: 731-740, 1996.

Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? *Physiol Rev*, 88: 1547-1565, 2008.

Wolfe MM & Sachs G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. *Gastroenterology*, 118: S9-S31, 2000.

CAPÍTULO II

Avaliação do efeito gastroprotetor do óleo essencial de Citrus lemon e de seus componentes Limoneno e β -Pineno

1. *Citrus lemon*

Citrus lemon (Burm. f.) pertence à família Rutaceae e é popularmente conhecido como limão-siciliano. É uma árvore que atinge de 3 a 6 metros de altura com grande número de ramos e espinhos. Neste estudo, utilizamos o óleo essencial extraído da casca dos frutos (figura 1). Seu óleo essencial é responsável por induzir vários efeitos comportamentais em ratos (redução de comportamentos estresse-induzidos, tempo de sono e dor em fêmeas) e humanos (efeitos antidepressivos, melhora na criatividade, humor e batimentos cardíacos alterados) (Aloisi et al., 2002; Cecarelli et al., 2004).



Figura 1: O fruto de *Citrus lemon*. Fonte: www.patio-plants.co.uk/lemon_tree.html, acesso em 02/03/2009.

De acordo com a técnica de cromatografia gasosa, os principais componentes desse óleo são dois monoterpenos, o Limoneno e o β -Pineno. O monoterpeno limoneno é o principal constituinte de vários óleos essenciais do gênero Citrus (limão, laranja, tangerina, lima e pomelo). Ele tem sido usado para alívio de gastrite e de refluxo gastroesofágico devido ao seu efeito neutralizador do ácido gástrico e estimulante do peristaltismo. Também é indicado para dissolver cálculos biliares que contenham colesterol, por ser um solvente do colesterol (Sun, 2007). O limoneno demonstrou atividade quimiopreventiva contra vários tipos de câncer, incluindo mamário (Elegbede et al., 1984; Elson et al., 1988), gástrico (Uedo et al., 1999; Yano et al., 1999) e colorretal (Vigushim et al., 1998).

Riyazi et al. (2007) demonstraram que o monoterpeno β -pineno extraído do óleo essencial dos rizomas de *Zingiber officinale* exerce efeito antiespasmódico no fêto de ratos e Liapi et al. (2007) demonstraram que o β -pineno extraído do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus camaldulensis* tem atividade antinociceptiva. Ainda, Li et al. (2008 a) sugerem que o β -pineno contido no ar das florestas aumenta o número e a atividade da célula *natural killer* do sistema imune e eleva os níveis de proteínas anticâncer dentro das células de humanos.

Partindo-se do princípio que os terpenos apresentam comprovado efeito antiulcerogênico em algumas espécies, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o mecanismo de ação antiulcerogênico do óleo essencial de *Citrus lemon* e dos seus componentes principais, Limoneno e β -Pineno. Ainda, esclarecer se a atividade antiulcerogênica desse óleo se deve exclusivamente ao componente majoritário Limoneno ou à atividade sinérgica de todos os componentes do óleo essencial de *Citrus lemon*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Para todos os experimentos realizados, foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250g) provenientes do Biotério Central da UNESP, aclimatados às condições do biotério do Departamento de Morfologia por cerca de duas semanas antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados. Os animais foram alimentados com ração Guabi e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais n° 002/04-CEEA submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

A identificação das substâncias contidas no óleo essencial de *Citrus lemon* foi conduzida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μm), operando por impacto de elétrons (70 eV).

Condições de análise: Injetor 240°C ; Detector: 230°C ; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,7 mL/min; Diluição: 1 mg de óleo/1 mL de Hexano; Volume de Injeção: 1 μL ; Split: 1/30; Programa de Temperatura: $50^\circ\text{C} - 280^\circ\text{C}$, $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.), literatura (Mc Lafferty & Stauffer, 1989) e índice de retenção (Adams, 2001).

Esta etapa foi realizada através da colaboração da Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, pesquisadora do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

2.3. Cálculos das doses utilizadas

A dose de 250 mg/kg para *Citrus lemon* (CL) foi determinada através de experimento de indução de úlcera em modelo agudo, no qual essa dose foi a mais efetiva dentre as várias doses testadas. Para as substâncias isoladas, foi feito cálculo da dose proporcional à quantidade da substância presente em 250 mg/kg do óleo essencial. O óleo é composto de 70,75% de limoneno (L) e 13,19% de β -pineno (P), segundo técnica de cromatografia gasosa. Proporcionalmente, determinou-se a dose para cada um deles: 177 mg/kg para L e 33 mg/kg para P.

2.4. Obtenção de CL, L, P

Os frutos foram identificados e colhidos pela equipe executora desse projeto. Suas cascas foram submetidas à extração do óleo essencial por arraste por vapor d'água com a utilização de um aparelho do tipo Clevenger (Marconi S.A.). Para isso, foram misturadas com água destilada dentro de um balão volumétrico (5 L) e colocadas sobre manta aquecedora até a ebulição. O óleo essencial obtido foi armazenado em frasco âmbar a 5°C. Os dois compostos majoritários foram adquiridos do laboratório Sigma Aldrich, E.U.A.

2.5. Indução de úlceras gástricas por Etanol absoluto

Este método baseia-se na metodologia descrita por Morimoto et al. (1991). Após 24 horas de jejum, ratos Wistar machos (n=7) foram submetidos aos tratamentos com veículo (Tween 80 a 8%, controle negativo), Carbenoxolona (100 mg/kg, controle positivo), CL 250 mg/kg, L 177 mg/kg ou P 33 mg/kg via oral 1 hora antes da administração de 1 mL de etanol absoluto via oral por animal. Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram sacrificados, tiveram os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, prensados em placa de vidro e escaneados. As lesões foram medidas com auxílio do programa AVSoft BioView. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (em mm²). Depois, foram destinados à confecção de lâminas para observação do caráter morfológico,

histológico (coloração em Hematoxilina & Eosina – HE – e Ácido periódico-Schiff – PAS) e imunoistoquímico das lesões. Determinou-se um escore microscópico (Jahovic et al., 2007) para os seguintes parâmetros da mucosa: descamação, hemorragia, dano glandular e infiltração eosinofílica, que variou de 0 (ausência do caráter em questão) a 3 (maior presença observada do caráter em questão, corresponde ao controle negativo). O escore total correspondeu a 12. Essa análise foi realizada com as lâminas identificadas por códigos para evitar interferência do autor.

2.6. Determinações imunoistoquímicas

Foram realizadas reações imunoistoquímicas consideradas mais adequadas para este modelo, que são VIP (peptídeo intestinal vasoativo, inibidor de secreção gástrica) e HSP-70 (*heat shock protein*, proteínas citoprotetoras).

Cinco lâminas histológicas representativas de cada grupo de tratamento foram desparafinizadas, reidratadas e reveladas com o método ABC (complexo biotina-avidina). O bloqueio de reação inespecífica foi feito com soro normal de cabra a 1% e leite desnatado a 3% e anticorpo para VIP ou HSP-70 (1:100). Depois de lavados em solução salina tamponada de fosfato (PBS 0,01 mol/L, pH 7,4), os cortes foram incubados em anti-soro secundário. Foram então enxaguados em PBS e incubados em ABC (kit ABC - Vector) e incubados em reação de peroxidase (3,3'-diaminobenzidina tetraclorido- Sigma) contendo 0,01% de H₂O₂ em tampão PBS.

2.7. Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)

Este modelo visou verificar se ocorre dependência de GSH no efeito gastroprotetor de CL e L. A metodologia foi desenvolvida segundo Anderson et al. (1985). Após o escaneamento dos estômagos no modelo de indução de úlceras por etanol absoluto, foi coletado um pequeno fragmento de cada estômago, que foi raspado, pesado e homogeneizado em tampão. As amostras foram alíquotadas e a determinação da concentração de GSH foi feita através da reação com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (412 nm). Este modelo não foi realizado para o grupo P devido a ausência de efeito gastroprotetor no modelo de indução de úlcera por etanol.

2.8. Indução de úlceras pelo uso de Droga Anti-inflamatória Não-Esteroidal - Indometacina

A metodologia foi desenvolvida segundo Puscas et al. (1997). Administraram-se via oral veículo, cimetidina 100 mg/kg, CL 250 mg/kg, L 177 mg/kg, P 33 mg/kg e 30 minutos depois as lesões gástricas foram induzidas pela administração oral de indometacina 100 mg/Kg em ratos Wistar machos (n=7) submetidos a jejum por 24 horas. Os animais foram sacrificados na câmara de CO₂ 5 horas após o estímulo lesivo, tendo seus estômagos removidos e abertos ao longo da maior curvatura. Foram prensados em placa de vidro, escaneados e a área das lesões medidas com auxílio do programa AVSoft BioView. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (em mm²).

2.9. Determinação bioquímica dos níveis de Prostaglandina E₂ (PGE₂)

A metodologia foi desenvolvida segundo o método descrito por Curtis et al. (1995). Ratos Wistar machos (n=7) foram divididos aleatoriamente nos grupos branco, veículo, veículo + indometacina, CL 250 mg/kg, CL 250 mg/kg + indometacina, L 177 mg/kg, L 177 mg/kg + indometacina. No tempo 0, os grupos +indometacina receberam Indometacina (inibidor de PGE₂) 30 mg/kg subcutânea e os outros grupos receberam veículo subcutâneo. No tempo 30, os animais receberam CL, L ou veículo por gavagem. O grupo branco apenas passou pelos procedimentos experimentais, porém sem receber droga ou tratamento algum. Após os procedimentos, os animais foram sacrificados, tiveram os estômagos retirados, as mucosas raspadas, o tecido foi picotado e suspenso em 1 ml de tampão fosfato de sódio a 10 mm, pH 7,4. A solução obtida foi incubada a 37° C por 20 minutos. A prostaglandina no tampão foi mensurada com um kit de dosagem imunoenzimático de prostaglandina E₂ (R&D Systems) e a leitura realizada em espectrofotômetro (420 nm).

2.10. Avaliação de CL, L e P na inibição do crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*

A metodologia foi desenvolvida segundo modelos de Ellof (1998) e Palomino et al. (2002), utilizando-se a cepa ATCC43629 isolada de duodeno de indivíduos ulcerados. Foram utilizadas diluições seriadas de CL, L e P e se observou até qual diluição a bactéria se desenvolveu, para assim determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias analisadas. Esta etapa foi realizada no laboratório da Profa. Dra. Taís Maria Bauab, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP de Araraquara.

2.11. Análise Estatística

Dados paramétricos foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste a posteriori de

Dunnett, comparados com o controle negativo (veículo). Dados não-paramétricos (escore histológico) foram expressos na forma de mediana (range) e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrico) seguido pelo teste a posteriori de Dunn, comparados com o controle negativo (veículo). Todas as análises foram feitas pelo software GraphPad InStat com nível de significância mínimo de $p < 0,01$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de cromatografia gasosa acusou a presença de 17 substâncias no óleo essencial de *Citrus lemon*, das quais 13 puderam ser identificadas. O cromatograma acusou que o principal componente é o monoterpene Limoneno, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, com abundância relativa de 70,75%. O monoterpene β -Pineno, cuja fórmula molecular também é $C_{10}H_{16}$, aparece com a segunda maior abundância relativa: 13,19%. A relação completa dos componentes e suas abundâncias relativas estão apresentadas na tabela 1. As estruturas químicas dos dois componentes principais estão representadas na figura 2.

Tabela 1: Identificação dos componentes do óleo essencial de *Citrus lemon* e suas abundâncias relativas (em %)

Pico	Substância	%
1	α -tujeno	0,26
2	α -pineno	1,72
3	sabineno	1,71
4	β -pineno	13,19
5	β -mirceno	1,35
6	α -terpinoleno	0,11
7	p-cimeno	0,10
8	limoneno	70,75
9	n.i.	0,11
10	γ -terpineno	9,19
11	terpinoleno	0,22
12	n.i.	0,14
13	n.i.	0,32
14	neral	0,30
15	α -trans-bergamoteno	0,20
16	β -bisaboleno	0,16
17	n.i.	0,17

n.i.: substância não-identificada

Figura 2: Estrutura química do limoneno e β -pineno, constituintes majoritários de *Citrus lemon*



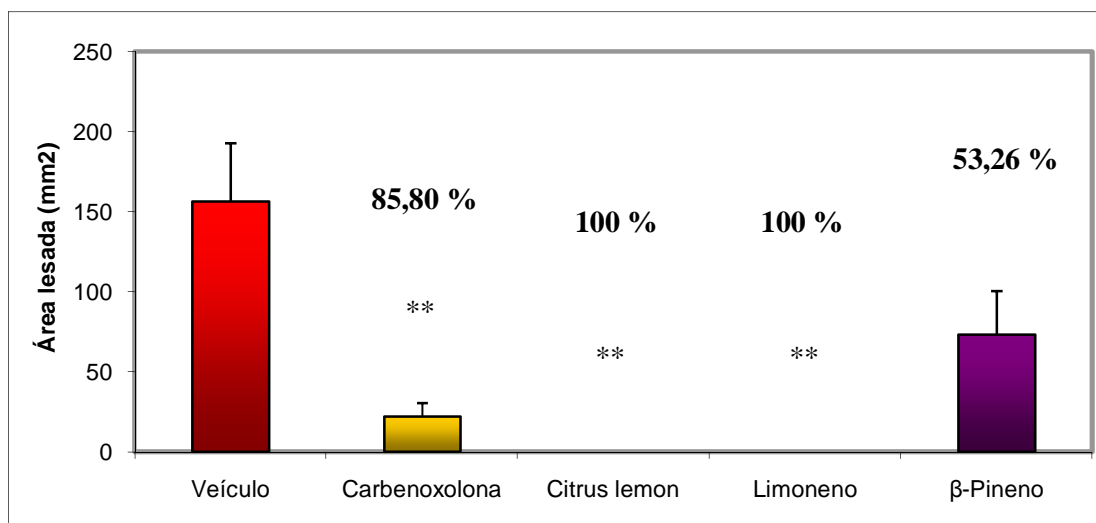
(a) Fonte: http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/extra_nobel2001.html acesso em 22/07/08

(b) Fonte: Bakkali et al., 2008

A indução de úlceras gástricas por etanol absoluto tem sido largamente utilizada para a avaliação do potencial gastroprotetor de uma substância (Li et al., 2008b). As lesões gástricas induzidas por etanol são predominantes na parte glandular do estômago. A administração de etanol aumenta a peroxidação lipídica, reduz os níveis de SOD (superóxido dismutase), catalase e glutatona reduzida (fatores protetores da mucosa gástrica) (Bafna & Balaramam, 2004), depleta o muco contido na parede gástrica (Al-Howiriny et al., 2003), estimula a formação do leucotrieno C4 (LTC4), de produtos secretados por mastócitos (Oates & Hakkinen, 1988) e de espécies reativas de oxigênio (Mizui et al., 1987), causa distúrbios na microcirculação gástrica, isquemia e liberação de radicais livres, liberação de endotelina e inibição da liberação de prostaglandinas (Abdel-Salam et al., 2001), resultando em dano à mucosa gástrica.

No modelo de indução de úlceras por etanol absoluto, os grupos CL (250 mg/kg) e L (177 mg/kg) demonstraram 100% de gastroproteção macroscópica, ou seja, ausência de lesões hemorrágicas que pudessem ser vistas macroscopicamente. Já o P (33 mg/kg) não exerceu efetiva gastroproteção (53,26%, contra 85,80% de gastroproteção oferecida pelo controle positivo Carbenoxolona). A área das lesões, expressa em mm², pode ser vista na figura 3.

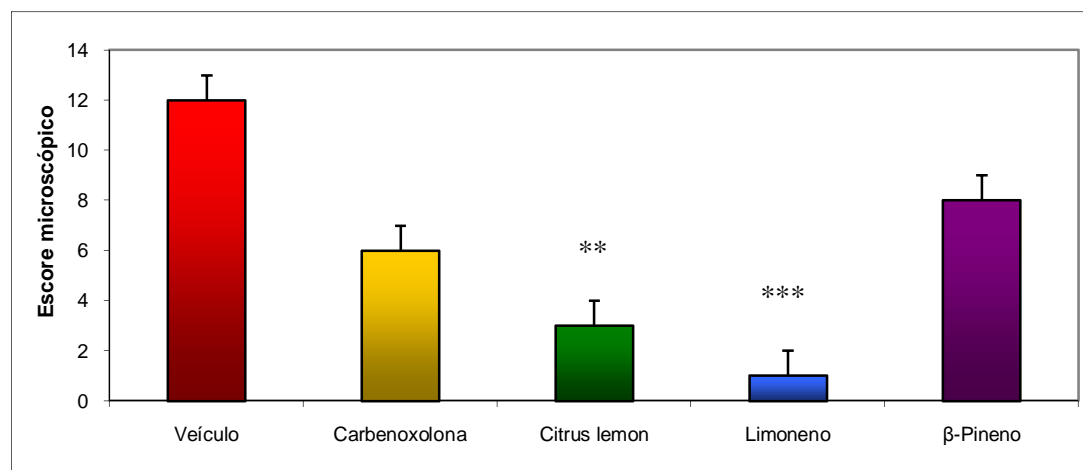
Figura 3: Área de úlcera gástrica em ratos submetidos a indução de úlcera gástrica por etanol absoluto após tratamento com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg), *Citrus lemon* (250 mg/kg), Limoneno (177 mg/kg) ou β -Pineno (33 mg/kg)



Veículo $156,60 \pm 36,30$, Carbenoxolona $22,27 \pm 8,21$ **, *Citrus lemon* $0,00 \pm 0,00$ **, Limoneno $0,00 \pm 0,00$ ** e β -Pineno $73,20 \pm 27,32$. $F_{(4; 22)} = 4,863$. $p < 0,01$. Valores no gráfico indicam a porcentagem de gastroproteção.

Microscopicamente, CL e L tiveram resultados semelhantes em relação à manutenção da integridade da mucosa gástrica. Ambos apresentaram pouca descamação e total ausência de infiltração eosinofílica, L não apresentou hemorragia nem dano glandular. O grupo P apresentou preservação de mucosa semelhante ao grupo Carbenoxolona, embora macroscopicamente ele apresentasse mais lesões hemorrágicas. Isso pode significar que, apesar da ausência de efeito gastroprotetor macroscópico, P possui alguma ação de preservação sobre a mucosa gástrica. O aspecto histológico das lesões pode ser visto na figura 4 e o escore das lesões microscópicas pode ser visto na figura 5.

Figura 5: Escore microscópico das úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto após tratamento com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg), *Citrus lemon* (250 mg/kg), Limoneno (177 mg/kg) ou β -Pineno (33 mg/kg)



Veículo 12(11-12), Carbenoxolona 6(5-7), *Citrus lemon* 3(2-3)**, Limoneno 1(0-1)***, β -Pineno 8(7-9). KW: 32,877. $p < 0,01$.

A barreira muco-bicarbonato fosfolipídeos constitui a primeira linha de defesa da mucosa (Lichtenberger, 1999; Atuma et al., 2001; Allen & Flemstron, 2005). O muco secretado na superfície estomacal atua como lubrificante, para reduzir o dano físico ao epitélio causado pelos alimentos ingeridos, e como armadilha para as bactérias, diminuindo a possibilidade de que a bactéria acesse o epitélio (Belley et al., 1999; Wallace, 2008). Substâncias ulcerogênicas dissipam o muco e a camada de fosfolipídeos, levando a re-difusão de ácido e injúria a mucosa (Darling et al., 2004).

CL e L foram responsáveis pela formação de uma camada de muco PAS-positiva, cobrindo a superfície da mucosa e as glândulas gástricas. O grupo CL apresentou produção de muco mais profundamente nas glândulas gástricas, fato que não foi observado no grupo L mas sim no grupo P, embora o grupo P não tenha estimulado adequadamente a produção de muco em quantidade, mostrando um aspecto similar aos grupos controle (figura 6).

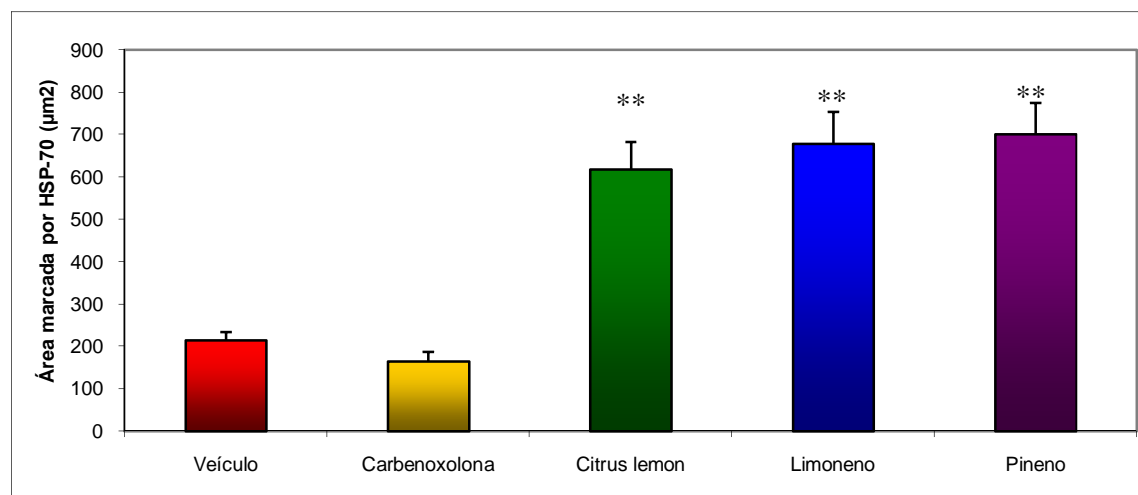
As análises imunoistoquímicas são importantes para verificar o mecanismo de ação da substância em questão. Neste modelo, foram realizadas reações imunoistoquímicas para HSP-70 e VIP.

Heat-shock protein 70 (HSP-70) é uma proteína das células de mamíferos, com 70 kDa de peso molecular, abundantemente produzida dentro das células em resposta a diferentes

formas de estresse (Shichijo et al., 2003; Chang et al., 2007), apresentando função importante na citoproteção adaptativa. Ela protege os processos homeostáticos celulares de injúrias fisiológicas e ambientais através da preservação de estruturas normais de proteínas e reparo ou remoção de proteínas danificadas. Por isso, o acúmulo intracelular de HSP-70 induzido fisiologicamente, farmacologicamente, geneticamente ou por administração direta, protege o organismo de uma grande variedade de condições patológicas, incluindo a úlcera gástrica (Tytell & Hooper, 2001). Ainda, a acupuntura em determinados pontos induz a expressão de HSP-70 e acúmulo de prostaglandina E₂, gerando efeito gastroprotetor (Chang et al., 2007). Entretanto, os mecanismos responsáveis por esse fenômeno não são bem conhecidos. Ele pode ocorrer por um mecanismo citoprotetor que aumenta o fluxo sanguíneo e divisão celular na mucosa gástrica (Shichijo et al., 2003) ou através de proteção mitocondrial e interferência no programa de apoptose celular estresse-induzido. A indução de úlcera é uma situação de estresse celular, então, fármacos que induzem acúmulo de HSP-70 exercem benefícios para prevenção e tratamento de úlceras (Rokutan, 2000). A expressão de HSP-70 está associada a proteção celular adaptativa à ingestão de etanol (Tsukimi & Okabe, 2001; Al Moutaery, 2003).

Houve imunomarcagem em todos os grupos, o que indica que ocorreu participação das proteínas HSP-70 no processo citoprotetor observado. Ainda, a imunomarcagem ficou concentrada nas áreas lesadas, indicando que os diferentes tratamentos utilizados estimulam a proteção celular adaptativa através das proteínas HSP-70 (figura 7). A medida da área marcada para cada grupo (figura 8) confirma que CL, L e P estimularam significativamente a proteção celular adaptativa induzida pelas proteínas HSP-70, este sendo então um dos mecanismos de ação pelos quais esses tratamentos atuam no processo gastroprotetor.

Figura 8: Área de imunomarcção (μm^2) para HSP-70 em estômagos de ratos submetidos à indução de úlcera gástrica por etanol absoluto após tratamento com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg), *Citrus lemon* (250 mg/kg), Limoneno (177 mg/kg) ou β -Pinoeno (33 mg/kg)



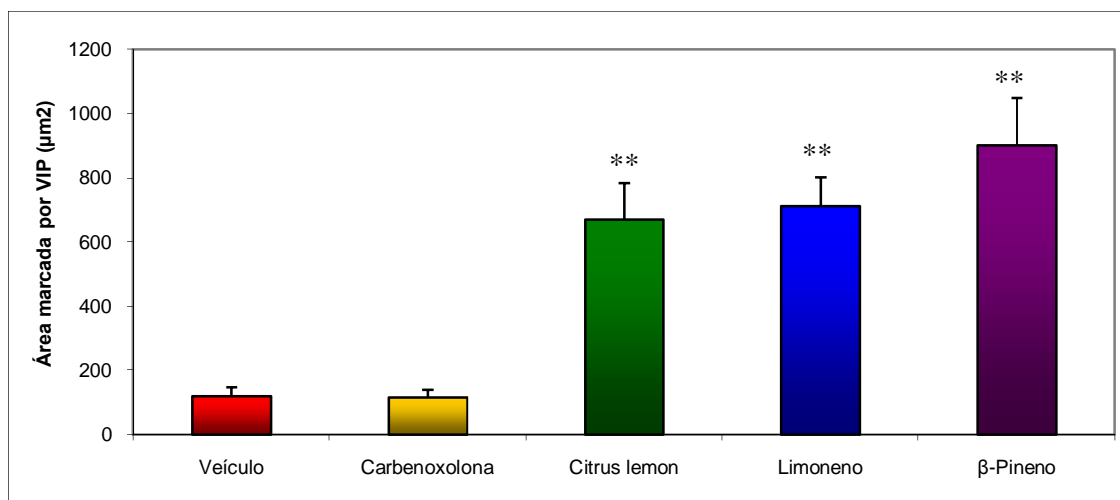
Veículo $214,3 \pm 19,6$, Carbenoxolona $164,8 \pm 23,2$, *Citrus lemon* $618 \pm 64,7$ **, Limoneno $678,1 \pm 75,3$ **, β -Pinoeno $700,6 \pm 73,9$ **. $F_{(4; 34)} = 29,163$. $p < 0,01$.

O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) foi descoberto por Said & Mutt (1970). Ele apresenta muitas funções fisiológicas, envolvendo atividades nos sistemas digestivo, respiratório, circulatório, urogenital e nervoso (Iwanaga, 2002; Groneberg et al., 2004). Ele atua como molécula sinalizadora entre o sistema nervoso e o sistema imune, e pode regular a função dos mastócitos da mucosa intestinal através da regulação da secreção neuroendócrina e parácrina (Wu et al., 2008). VIP previne a formação de úlceras gástricas, inibindo a degranulação de mastócitos e protegendo o tecido gástrico da peroxidação lipídica. O mecanismo de ação do VIP nos níveis de histamina no tecido gástrico pode ser explicado por seu efeito inibitório sobre a liberação do hormônio gastrina (que estimula liberação de histamina) e sobre a atividade de mastócitos e células ECL, compartimentos que armazenam histamina no tecido gástrico. Regulando síntese e inativação de histamina, VIP equilibra os efeitos benéficos e prejudiciais dela, que é um importante mediador para reparo e cicatrização dos tecidos, apesar de estimular a secreção ácida gástrica. Ainda, VIP atua como antioxidante e anti-inflamatório, prevenindo a mucosa gástrica da formação de úlceras (Tunçel et al., 2003).

Pode-se notar imunomarcção em todos os grupos, concentrada nas áreas lesadas (figura 9). Novamente, a medida da área marcada para cada grupo (figura 10) confirma que CL, L e P estimularam significativamente a proteção celular adaptativa induzida por VIP; este

sendo então um dos mecanismos de ação pelos quais essas substâncias atuam no processo gastroprotetor.

Figura 10: Área de imunomarcção (μm^2) para VIP em estômagos de ratos submetidos à indução de úlcera gástrica por etanol absoluto após tratamento com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg), *Citrus lemon* (250 mg/kg), Limoneno (177 mg/kg) ou β -Pineno (33 mg/kg)



Veículo $118,5 \pm 28,7$, Carbenoxolona $114,9 \pm 24,5$, *Citrus lemon* $671 \pm 113,6$ **, Limoneno 713 ± 89 **, β -Pineno $902 \pm 148,1$ **. $F_{(4; 31)}=17,302$. $p < 0,01$.

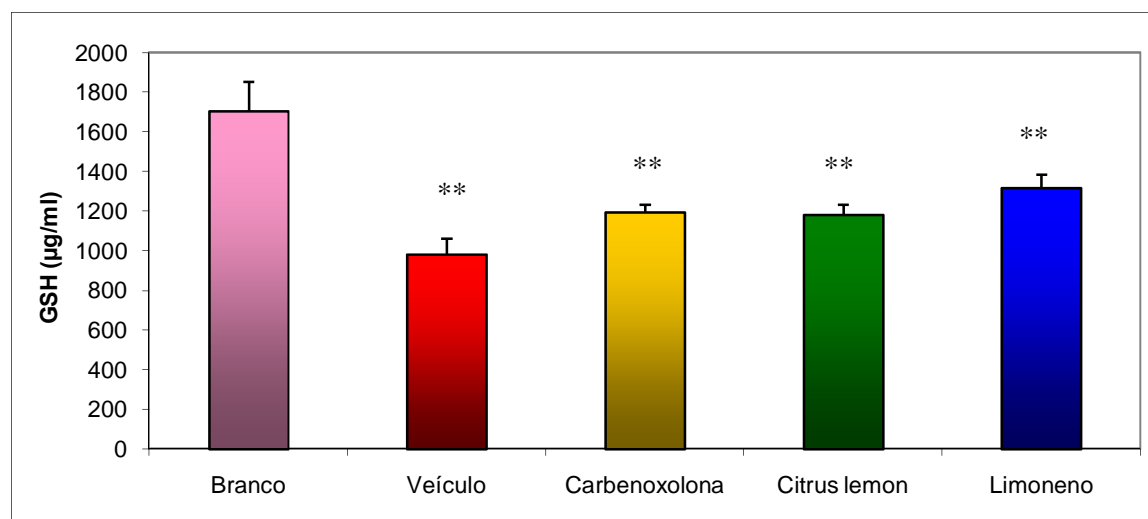
Outro mecanismo de agressão da mucosa gástrica pelo etanol é a diminuição dos níveis de glutathiona (GSH) (Szabo & Brown, 1987). GSH é um importante antioxidante encontrado na maioria das células dos mamíferos (Devi et al., 2007). Ela é essencial para a manutenção da integridade da mucosa gástrica, prevenindo lesões causadas por agentes nocivos. GSH protege a célula dos danos induzidos pelos radicais livres através de proteção contra peroxidação lipídica ou protegendo grupamentos sulfidrílicos de se tornarem irreversivelmente oxidados após injúria oxidante. O excesso de peroxidação lipídica causa aumento no consumo de GSH (Banerjee et al., 1994; Li et al., 2008 b). A habilidade das células de manter seu estado reduzido deve-se, em parte, à sua habilidade de sintetizar GSH (Mehta et al., 1998; Matthews & Butler, 2005). Estudos revelam que os níveis de GSH são reduzidos no processo ulcerativo (Ozbakis Dengiz, 2007).

Vários estudos têm mostrado propriedades antioxidantes de óleos essenciais *in vitro*. Eles podem ser benéficos para a saúde humana já que muitas doenças se devem a sobrecarga de reações de estresse oxidativo que ocorrem após consumo exagerado de gordura, açúcar, carne, etc. Antioxidantes são diretamente antimutagênicos (Clark, 2002) e anticarcinogênicos

devido as suas propriedades de combater os radicais livres (Ames et al., 1993; Birt et al., 2001; Surh, 2002; Ferguson et al., 2004; Collins, 2005, Bakkali et al., 2005).

O resultado da determinação dos níveis de GSH para CL e L pode ser visto na figura 11. Os tratamentos utilizados não foram capazes de manter a GSH em níveis próximos ao grupo Branco após administração de etanol absoluto, que depletou os níveis de GSH. Esse dado permite concluir que o efeito gastroprotetor dos diferentes tratamentos não atua por essa via antioxidante.

Figura 11: Determinação dos níveis de Glutathiona (GSH, em $\mu\text{g/ml}$) na mucosa gástrica de ratos tratados com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg), *Citrus lemon* (250 mg/kg) ou Limoneno (177 mg/kg)



Branco 1704,30 \pm 149,03, Veículo 982,8 \pm 79,07 **, Carbenoxolona 1195,60 \pm 37,57 **, *Citrus lemon* 1182,00 \pm 52,47 **, Limoneno 1316,6 \pm 67,75 **. $F_{(5; 29)} = 7,922$. $p < 0,01$.

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados clinicamente, e a sua habilidade de causar ulceração gastrointestinal foi demonstrada há mais de 60 anos (Wallace, 2001). Toxicidade gastrointestinal associada à AINEs é um importante problema no campo médico, apesar dos recentes avanços farmacêuticos (Hawkins & Hanks, 2000; Hawkey & Langman, 2003). A indústria farmacêutica reconhece essas falhas nos anti-inflamatórios atuais e responde à necessidade de fármacos mais seguros modificando quimicamente a estrutura deles ou alterando a produção farmacêutica deles para evitar efeitos gástricos adversos (Whittle, 1999).

AINEs são largamente utilizadas no tratamento de osteoartrite e artrite reumatóide. Entretanto, seu uso está relacionado com amplo espectro de efeitos colaterais no trato

gastrointestinal, como hemorragia, perfuração (Griffin et al., 1991), indução de úlceras e agravamento de úlceras pré-existentes (Jones et al., 1999; Halter et al., 2001). Estudos têm revelado que múltiplos elementos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento dessas úlceras, como depleção de prostaglandinas através da inibição da enzima ciclooxigenase (COX) (Whittle, 1981; Wallace et al., 2000; Tanaka et al., 2002), supressão da microcirculação gástrica (Suzuki et al., 2000), aumento de apoptose (Slomiany et al., 1997), ativação de neutrófilos (Wallace et al., 1990), formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Wallace, 2001) e liberação de óxido nítrico (NO) (Nishida et al.; 1998), direcionando novos caminhos para a prevenção de danos gástricos induzido por AINEs. Motawi et al. (2008) recentemente demonstrou que a secreção aumentada de ácido, infiltração de neutrófilos, alterações na produção de NO e estresse oxidativo são mecanismos que contribuem para a ulceração induzida por AINEs.

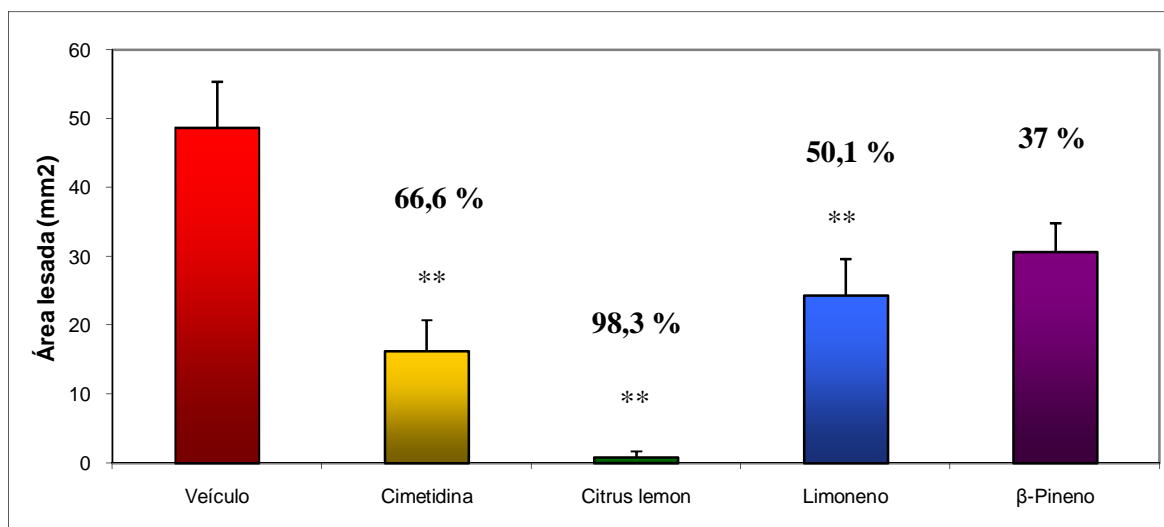
A inibição da liberação de COX causada por AINEs leva à queda na biossíntese das prostaglandinas. Essa queda é responsável pela redução do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, que pode provocar lesão (Wallace et al., 2000). A redução na síntese de prostaglandinas prejudica também a integridade da camada muco-bicarbonato na superfície epitelial, prejudicando a liberação de muco (Lichtenberger et al., 1995; Hawkins & Hanks, 2000; Hawkey & Langman, 2003).

A inibição seletiva de COX-1 ou de COX-2 não causa lesão na mucosa gástrica. A lesão apenas ocorre quando as duas isoformas são simultaneamente inibidas (Wallace et al., 2000). AINEs inibem ambas isoformas, diminuindo os níveis de PGE₂ na mucosa, causando ulceração (Banerjee et al., 2008 a).

A Indometacina, um AINE, induz úlceras gástricas através de vários processos, incluindo geração de ROS, inibição da síntese de PGE₂, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, indução de apoptose, iniciação da peroxidação lipídica (Yoshikawa et al., 1993) e diminuição da produção de muco resultando em úlceras hemorrágicas (Bech et al., 2000).

No modelo de indução de úlcera gástrica por Indometacina, CL exerceu 98,3% de gastroproteção, L ofereceu 50,1% e P novamente não exerceu efetiva gastroproteção (37%), enquanto o controle positivo Cimetidina ofereceu 66,6%. CL e L se mostraram capazes de anular o efeito colateral da Indometacina, prevenindo a formação de úlceras gástricas (figura 12).

Figura 12: Área de úlcera gástrica em animais submetidos a indução de úlcera por Indometacina após tratamento com *Citrus lemon* (250 mg/kg), Limoneno (177 mg/kg) ou β -Pineno (33 mg/kg)



Veículo $48,72 \pm 6,64$, Cimetidina $16,27 \pm 4,49$ **, *Citrus lemon* $0,85 \pm 0,85$ **, Limoneno $24,34 \pm 5,3$ **, β -Pineno $30,66 \pm 4,22$. $F_{(4; 43)} = 10,857$. $p < 0,01$. Valores no gráfico indicam a porcentagem de gastroproteção.

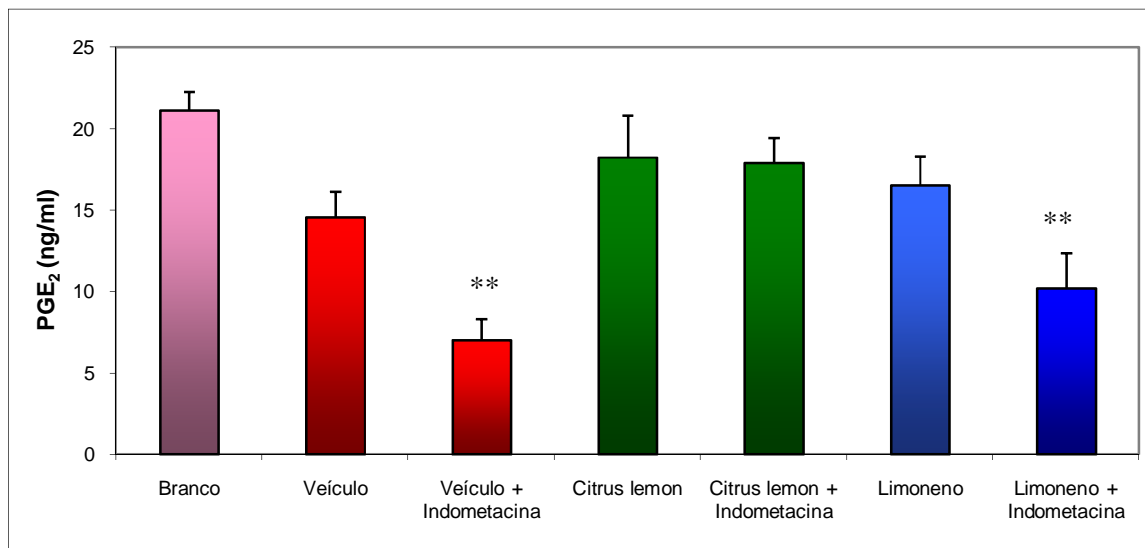
Considerando que a inibição da síntese de PGE_2 faz parte dos mecanismos ulcerogênicos da Indometacina, foi realizada a determinação bioquímica dos níveis de PGE_2 para CL e L, que apresentaram efeito gastroprotetor contra a Indometacina.

Prostaglandinas são produzidas em resposta a vários estímulos extrínsecos e regulam crescimento e diferenciação celular e homeostasia. Estão presentes fisiologicamente nos fluidos corporais em concentrações picomolares a nanomolares (Fukushima, 1990). É reconhecido seu efeito protetor para a mucosa gástrica como consequência de vários mecanismos, que incluem aumento da secreção de muco, melhora do fluxo sanguíneo na mucosa (Motilva et al., 2005), divisão celular, regulação do pH na superfície gástrica (Banerjee et al., 2008 b), estímulo de muco e bicarbonato gástricos, aumento dos componentes sulfidrílicos na mucosa (Brzozowski et al., 2005). Ainda, PGE_2 estimula a expressão de VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) em fibroblastos gástricos de rato através dos receptores EP4 (Hatazawa et al., 2007).

CL e L, quando administrados isoladamente, foram capazes de manter o nível de PGE_2 próximo ao nível do grupo Branco. Ainda, CL manteve elevado o nível de PGE_2 mesmo no grupo que recebeu administração de Indometacina, droga inibidora de PGE_2 . Isso comprova que o efeito gastroprotetor de CL inclui em seu mecanismo de ação a manutenção do nível de

PGE₂. Já L apresentou queda significativa no nível de PGE₂ quando administrado em conjunto com Indometacina, indicando que seu mecanismo de ação não está relacionado à manutenção do nível de PGE₂ quando administrado isoladamente. O grupo veículo + indometacina prova que a droga provoca redução significativa no nível de PGE₂ (figura 13).

Figura 13: Determinação dos níveis de Prostaglandina E₂ (ng/ml) na mucosa gástrica de animais tratados com veículo, *Citrus lemon* (250 mg/kg) ou Limoneno (177 mg/kg)



Branco 21,14 ± 1,14, Veículo 14,56 ± 1,58, Veículo + Indometacina 7,00 ± 1,31 **, *Citrus lemon* 18,25 ± 2,58, *Citrus lemon* + Indometacina 17,89 ± 1,55, Limoneno 16,54 ± 1,77, Limoneno + Indometacina 10,21 ± 2,17 **. $F_{(6, 30)} = 6,512$. $p < 0,01$.

A análise desses resultados sugere que CL pode ser administrado em conjunto com os AINEs, com o intuito de minimizar seu efeito colateral sobre a mucosa gástrica.

Desde a descoberta da bactéria *Helicobacter pylori* como agente etiológico da úlcera gástrica por Marshall & Warren em 1982 (coroados com o prêmio Nobel de Medicina em 2005), tem sido demonstrado que essa bactéria é causadora de doenças com vários graus de severidade, incluindo gastrite crônica, úlcera péptica, adenocarcinoma, linfoma e câncer gástricos (Furuta et al., 2002; Queiroz et al., 2005; Peek & Crabtree, 2006; Ustün et al., 2006).

Além disso, nos países em desenvolvimento, a infecção por *Helicobacter pylori* na infância é alta (Mergraud et al., 1989; Kehrt et al., 1997; Goodman et al., 1996) e resulta em hipocloridria (Takashima et al., 2001). A hipocloridria, inclusive a que é causada por inibidores da bomba de prótons (Laine et al., 2000), aumenta a suscetibilidade a infecções entéricas (Howden & Hunt, 1987) principalmente nos países em desenvolvimento, onde tais

infecções são endêmicas. Outra potencial consequência da hipocloridria é a anemia ferropriva, já que a absorção de ferro fica comprometida se há alterações na secreção ácida gástrica. A diarreia resultante de infecção aguda por *Helicobacter pylori* leva à subnutrição e retardo no crescimento em crianças (Bravo et al., 2003; Passaro et al., 2002; Tasar et al., 2006). Portanto, a prevenção da infecção por *Helicobacter pylori* pode ter importante impacto nas doenças diarreicas nos países em desenvolvimento (Windle et al., 2007).

CL e L apresentaram excelente atividade anti-*Helicobacter pylori*, com concentração inibitória mínima de 125 µg/ml e 75 µg/ml respectivamente. Já a CIM para P mostrou-se bastante elevada: 500 µg/ml. A literatura tem mostrado que CIM igual ou menor a 250 µg/ml é interessante para produtos naturais (Lima et al., 2008 a, 2008 b; Moraes et al., 2008). Então, CL e L apresentam excelente atividade antimicrobiana contra um dos mais importantes fatores causadores de úlcera gástrica e poderiam ser administrados como suplemento para aumentar a eficácia das terapias antibacterianas atuais.

4. CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *Citrus lemon* e seu componente majoritário Limoneno têm eficácias semelhantes na gastroproteção contra úlceras induzidas por etanol;

- O componente β-Pineno não apresentou atividade gastroprotetora nesse mesmo modelo;

- O mecanismo de ação gastroprotetor de todos os tratamentos testados inclui ativação de proteínas *heat-shock* e liberação de peptídeo intestinal vasoativo, inclusive para β-Pineno, que não exerceu efeito gastroprotetor, o que nos leva a concluir que a liberação dessas substâncias não pode ser então o único mecanismo responsável pela gastroproteção nos demais tratamentos e que atua em conjunto com outros mecanismos para promover a gastroproteção;

- Os três tratamentos testados estimulam a produção de muco, mas β-Pineno não estimula a secreção dele, diferente do Limoneno e do *Citrus lemon*;

- A manutenção dos níveis de glutathione não pode ser considerada mecanismo de ação gastroprotetor de *Citrus lemon* nem de seus componentes;

- O óleo essencial de *Citrus lemon* e seu componente majoritário Limoneno têm eficácias semelhantes na gastroproteção contra úlceras induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal (indometacina);

- O componente β-Pineno não apresentou atividade gastroprotetora também nesse modelo;

- A manutenção dos níveis de prostaglandina E₂ faz parte do mecanismo gastroprotetor de *Citrus lemon*, mas não do Limoneno;

- Esses resultados nos levam a concluir que o Limoneno contido no óleo essencial de *Citrus lemon* é o responsável isolado pelo efeito gastroprotetor do óleo essencial;

- *Citrus lemon* e Limoneno apresentaram excelente atividade anti-*Helicobacter pylori*, bactéria que coloniza o estômago e é responsável pelo desenvolvimento de úlceras gástricas, mas a atividade do β-Pineno na inibição do crescimento dessa bactéria não foi satisfatória.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Salam OM, Czimmer J, Debreceni A, Szolcsányi J, Mózsik G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J Physiol Paris*, 95(1-6): 105-127, 2001.

Adams RP. Identification of essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. *Allured Publ Corp*, Carol Stream, Illinois, 1995.

Al Moutaery AR. Protective effect of ketoconazole against experimentally induced gastric ulcers in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 113-114: 5-23, 2003.

Al-Howiriny T, Al-Sohaibani M, El-Tahir K, Rafatullah S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of “Parsley” *Petroselinum crispum*. *The Am J Chin Med*, 31(5): 699–711, 2003.

Allen A & Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288: C1–C19, 2005.

Aloisi AM, Ceccarelli I, Masi F, Scaramuzzino A. Effects of the essential oil from citrus lemon in male and female rats exposed to a persistent painful stimulation. *Behav Brain Res*, 136(1): 127-135, 2002.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7915–7922, 1993.

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*, 113: 548-555, 1985.

Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastric mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280: G922–G929, 2001.

Bafna PA & Balaraman R. Anti-ulcer and antioxidant activity of DHC-1, a herbal formulation. *J Ethnopharmacol*, 90: 123–127, 2004.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475, 2008.

Banerjee S, Hawks C, Miller S, Dahill S, Beattie D, McColl KEI. Effect of *Helicobacter pylori* and its eradication on gastric juice ascorbic acid. *Gut*, 35: 317–322, 1994.

Banerjee D, Bhattacharya S, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S. Biochemical mechanism of healing activity of the natural phenolic, allylpyrocatechol, against indomethacin-induced gastric ulceration in mice. *Dig Dis Sci*, 53: 2868–2877, 2008 a.

Banerjee D, Maity B, Nag SK, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S. Healing potential of *Picrorhiza kurroa* (Scrofulariaceae) rhizomes against indomethacin-induced gastric ulceration: a mechanistic exploration. *BMC Complement Altern Med*, 8: 3, 2008 b.

Bech PL, Xavier R, Lu N, Nanda NN, Dinauer M, Podolsky DK, Seed B. Mechanism of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. *Gastroenterology*, 119: 699–705, 2000.

Belley A, Keller K, Gottke M, Chadee K. Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am J Trop Med Hyg*, 60(4): 10–15, 1999.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Therap*, 90: 157–177, 2001.

Bravo LE, Mera R, Reina JC, Pradilla A, Alzate A, Fonham E, Correa P. Impact of *Helicobacter pylori* infection on growth of children: a prospective cohort study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 37: 614–619, 2003.

Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol*, 56(5): 33-55, 2005.

Ceccarelli I, Lariviere WR, Fiorenzani P, Sacerdote P, Aloisi AM. Effects of long-term exposure of lemon essential oil odor on behavioral, hormonal and neuronal parameters in male and female rats. *Brain Res*, 1001(1-2): 78-86, 2004.

Chang XR, Peng L, Yi SX, Peng Y, Yan J. Association of high expression in rat gastric mucosal heat shock protein 70 induced by moxibustion pretreatment with protection against stress injury. *World J Gastroenterol*, 13(32): 4355-4359, 2007.

Clark SF. The biochemistry of antioxidants revisited. *Nutr Clin Pract*, 17: 5–17, 2002.

Collins AR. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *Eur J Cancer*, 41: 1923–1930, 2005.

Curtis GH, Macnaughton WK, Gall DG, Wallace JL. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Can J Physiol Pharmacol*, 73: 130-134, 1995.

Darling RL, Romero JJ, Dial EJ, Akunda JK, Langenbach R, Lichtenberger LM. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobic, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. *Gastroenterology*, 2004; 127: 94–104.

Devi RS, Narayan S, Vani G, Shyamala Devi CS. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chem Biol Interact*, 167(1): 71-83, 2007.

Elegbede JA, Elson CE, Qureshi A, Tanner MA, Gould MN. Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpene d-limonene. *Carcinogenesis*, 5: 661-664, 1984.

Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*, 64(8): 711-713, 1998.

Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN. A anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 9: 331-332, 1988.

Ferguson LR, Philpott M, Karunasinghe N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198: 147–159, 2004.

Fukushima M. Prostaglandin J2-anti-tumour and anti-viral activities and the mechanisms involved. *Eicosanoids*, 3: 189-199, 1990.

Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimurra H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology*, 123: 92–105, 2002.

Goodman K, Correa P, Tengana Aux HJ, Ramírez H, DeLany JP, Guerrero Pepinosa O, López Quiñones M, Collazos Parra T. Helicobacter infection in the Columbian Andes: a population based study of transmission pathways. *Am J Epidemiol*, 144: 290–299, 1996.

Griffin MR, Piper JM, Daugherty JR, Snowden M, Ray WA. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and increased risk for peptic ulcer disease in elderly persons. *Ann Intern Med*, 114: 257–263, 1991.

Groneberg DA, Rabe KF, Wagner U, Fischer A. Vasoactive intestinal polypeptide in the respiratory tract: physiology and pathophysiology. *Pneumologie*, 58: 330–338, 2004.

Halter F, Schamassman A, Peskar BM, Tarnawski AS. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversies and perspectives. *Gut*, 49: 443-453, 2001.

Hatazawa R, Tanigami M, Izumi N, Kamei K, Tanaka A, Takeuchi K. Prostaglandin E₂ stimulates VEGF expression in primary rat gastric fibroblasts through EP4 receptors. *Inflammopharmacol*, 15(5): 214-217, 2007.

Hawkey CJ & Langman MJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: overall risks and management. Complementary roles for COX-2 inhibitors and proton pump inhibitors. *Gut*, 52: 600–608, 2003.

Hawkins C & Hanks GW. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature. *J Pain Symp Manag*, 20: 140-151, 2000.

Howden CW & Hunt RH. The relationship between gastric acid secretion and infection. *Gut*, 28: 96–107, 1987.

Iwanaga T. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Nippon Rinsho*, 60(6): 35–38, 2002.

Jahovic N, Erkanli G, Işeri S, Arbak S, Alican I. Gastric protection by alpha-melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: involvement of somatostatin. *Life Sci*, 80(11): 1040-1045, 2007.

Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med*, 5: 1418-1423, 1999.

Kehrt R, Becker M, Brosicke H, Kruger N, Helge H. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Nicaraguan children with persistent diarrhoea, diagnosed by the C-13 urea breath test. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 25: 84–88, 1997.

Laine L, Ahnen D, McLain C, Solcia E, Walsh JH. Review article: potential gastrointestinal effects of long-term acid suppression with proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther*, 14: 651–668, 2000.

Li Q, Morimoto K, Kobayashi M, Inagaki H, Katsumata M, Hirata Y, Hirata K, Suzuki H, Li YJ, Wakayama Y, Kawada T, Park BJ, Ohira T, Matsui N, Kagawa T, Miyazaki Y, Krensky AM. Visiting a forest, but not a city, increases human natural killer activity and expression of anti-cancer proteins. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 21(1): 117-127, 2008 a.

Li CY, Xu HD, Zhao BT, Chang HI, Rhee HI. Gastroprotective effect of cyanidin 3-glucoside on ethanol-induced gastric lesions in rats. *Alcohol*, 42: 683-687, 2008 b.

Liapi C, Anifantis G, Chinou I, Kourounakis AP, Theodosopoulos S, Galanopoulou P. Antinociceptive properties of 1,8-Cineole and beta-pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Med*, 73(12): 1247-54, 2007.

Lichtenberger LM, Wang ZM, Romero JJ, Ulloa C, Perez JC, Giraud MN, Barreto JC. Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastric intestinal injury. *Nat Med*, 1(2): 154–158, 1995.

Lichtenberger LM. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*, 15: 463–472, 1999.

Lima ZP, Calvo TR, Silva EF, Pellizzon CH, Vilegas W, Brito ARMS, Bauab TM, Hiruma-Lima CA. Brazilian Medicinal Plant Acts on Prostaglandin Level and *Helicobacter pylori*. *J Med Food*, 11(4): 701–708, 2008 a.

Lima ZP, Dos Santos RD, Torres TU, Sannomiya M, Rodrigues CM, Dos Santos LC, Pellizzon CH, Rocha LR, Vilegas W, Souza Brito AR, Cardoso CR, Varanda EA, de Moraes HP, Bauab TM, Carli C, Carlos IZ, Hiruma-Lima CA. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *J Ethnopharmacol*, 120: 149–160, 2008 b.

Matthews GM & Butler RN. Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: a review of the role of glutathione and the oxidative pentose pathway. *Helicobacter*, 10(4): 298-306, 2005.

McLafferty FW & Stauffer D. The Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data. John Wiley Sons, New York, 1989.

Mehta A, Singh S, Ganguly NK. Impairment of intestinal mucosal antioxidant defense system during *Salmonella typhimurium* infection. *Dig Dis Sci*, 43(3): 646–651, 1998.

Mergraud F, Brassens-Rabbe MP, Denis F, Belbouri A, Hoa DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol*, 27: 1870–1873, 1989.

Mizui T, Sato H, Hirose F, Doteuchi M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci*, 41: 755–763, 1987.

Moraes TM, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegas W, Pellizzon CH, Brito ARMS, Hiruma-Lima CA. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *J Ethnopharmacol*, 120: 161–168, 2008.

Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jap J Pharmacol*, 57: 495-505, 1991.

Motawi TK, Abd Elgawad HM, Shahin NN. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. *J Biomed Sci*, 15: 405–412, 2008.

Motilva V, La Lastra CA, Bruseghini L, Herrerias JM, Sánchez-Fidalgo S. COX expression and PGE(2) and PGD(2) production in experimental acute and chronic gastric lesions. *Int Immunopharmacol*, 5(2): 369-379, 2005.

Nishida K, Ohta Y, Ishiguro Y. Contribution of NO synthases to neutrophils infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Lett*, 425: 243–248, 1998.

Oates PJ & Hakkinen JP. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterol*, 94: 10–21, 1988.

Ozbakis Dengiz G, Odabasoglu F, Halici Z, Cadirci E, Suleyman H. Gastroprotective and antioxidant effects of Montelukast on Indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Pharmacol Sci*, 105: 94–102, 2007.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(8): 2720–2722, 2002.

Passaro DJ, Taylor DN, Gilman RH, Cabrera L, Parsonnet J. Growth slowing after acute *Helicobacter pylori* infection is age-dependent. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 35: 522–526, 2002.

Peek RM Jr & Crabtree JE. Helicobacter infection and gastric neoplasia. *J Pathol*, 208: 233–248, 2006.

Puscas I, Puscas C, Coltau M, Pasca R, Torres J, Marquez M, Herrero E, Fillat O, Ortiz JA. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung*, 47: 568–72, 1997.

Queiroz DM, Bittencourt P, Guerra JB, Rocha AM, Rocha GA, Carvalho AS. IL1RN polymorphism and cagA-positive *Helicobacter pylori* strains increase the risk of duodenal ulcer in children. *Pediatr Res*, 58: 892–896, 2005.

Riyazi A, Hensel A, Bauer K, Geissler N, Schaaf S, Verspohl EJ. The effect of the volatile oil from ginger rhizomes (*Zingiber officinale*), its fractions and isolated compounds on the 5-HT₃ receptor complex and the serotonergic system of the rat ileum. *Planta Med*, 73(4): 355–362, 2007.

Rokutan K. Role of heat-shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol*, 15: D12–19, 2000.

Said S & Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, 169: 1217–1218, 1970.

Shichijo K, Ihara M, Matsuu M, Ito M, Okumura Y, Sekine I. Overexpression of heat-shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. *Dig Dis Sci*, 48(2): 340–348, 2003.

Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Induction of tumor necrosis factor-alpha and apoptosis in gastric mucosal injury by indometacin: effect of omeprazole and ebrotidine. *Scand J Gastroenterol*, 32: 638–642, 1997.

Sun J. D-Limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev*, 12(3): 259-264, 2007.

Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol*, 40: 1091–1097, 2002.

Suzuki K, Araki H, Komoike Y, Takeuchi K. Permissive role of neutrophils in pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Med Sci Monit*, 6: 908–914, 2000.

Szabo S & Brown A. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulfhydryls. *Proc Soc Exp Biol Med*, 185(4): 493-497, 1987.

Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut*, 48: 765–773, 2001.

Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, Ohno R, Takeuchi K. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events. *J Pharmacol Exp Ther*, 303: 1248–1254, 2002.

Tasar A, Kibrisli E, Dallar Y. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in children with constitutional height retardation. *Turk J Gastroenterol*, 17: 7–12, 2006.

Tsukimi Y & Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull*, 24: 1-9, 2001.

Tunçel N, Tunçel M, Aboul-Enein HY. Effects of the vasoactive intestinal peptide on stress-induced mucosal ulcers and modulation of methylation of histamine in gastric tissue of the rats. *Il Fármaco*, 58: 449-454, 2003.

Tytell M & Hooper PL. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets*, 5(2): 267-287, 2001.

Uedo N, Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Sakai N, Yano H, Otani T. Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett*, 137: 131-136, 1999.

Ustün O, Özçelik B, Akyön Y, Abbasoglu U, Yesilada E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *J Ethnopharmacol*, 108: 457–461, 2006.

Vigushim DM, Poon GK, Boddy A, English J, Halbert GW, Pagonis C, Jarman M, Coombes RC. Phase I and pharmacokinetic study of d-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Reseach Campaign PhaseI/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother Pharmacol*, 42: 111-117, 1998.

Wallace JL, Keenam CM, Granger DM. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol*, 259: G462–G467, 1990.

Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, 119: 706–714, 2000.

Wallace JL. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 15(5): 691-703, 2001.

Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev*, 88: 1547–1565, 2008.

Whittle BJ. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indometacin in the rat. *Gastroenterology*, 80: 94–98, 1981.

Whittle BJR. Pharmacological approach to the prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy. *Ital J Gastroenterol Hepatol*, 31(1): 43–47, 1999.

Windle HJ, Kelleher D, Crabtree JE. Review article. Childhood *Helicobacter pylori* infection and growth impairment in developing countries: a vicious cycle? *Pediatrics*, 119: e754-e759, 2007.

Wu HG, Jiang B, Zhou EH, Shi Z, Shi DR, Cui YH, Kou ST, Liu HR. Regulatory mechanism of electroacupuncture in irritable bowel syndrome: preventing MC activation and decreasing SP VIP secretion. *Dig Dis Sci*, 53: 1644–1651, 2008.

Yano H, Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Sakai N, Uedo N. Attenuation by d-limonene of sodium chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Int J Cancer*, 82: 665-668, 1999.

Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Inuma S, Ichikawa H, Yasuda M, Takahash S, Kondo M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the

pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut*, 34: 732-737, 1993.

ANEXOS

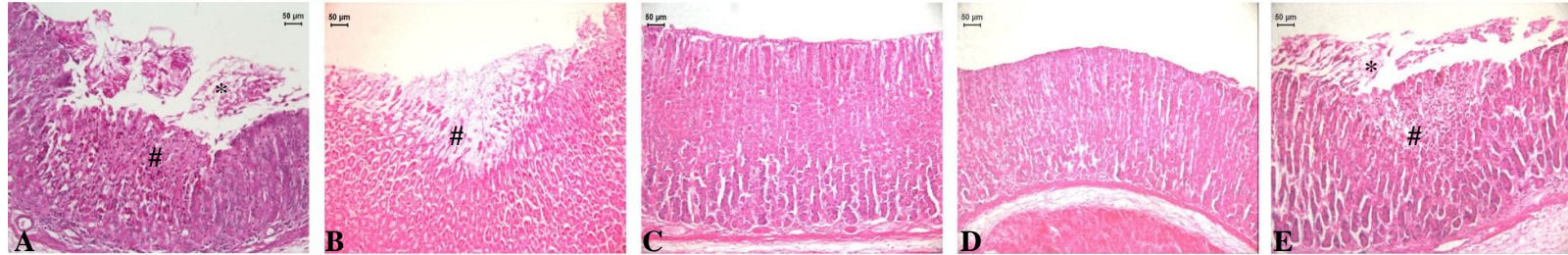


Figura 4: Fotomicrografia de estômagos submetidos à indução de úlceras por etanol absoluto após tratamento com (A) Veículo, (B) Carbenoxolona (100 mg/kg), (C) *Citrus lemon* (250 mg/kg), (D) Limoneno (177 mg/kg) ou (E) β -Pineno (33 mg/kg). Coloração HE. * indica descamação e # indica dano glandular.

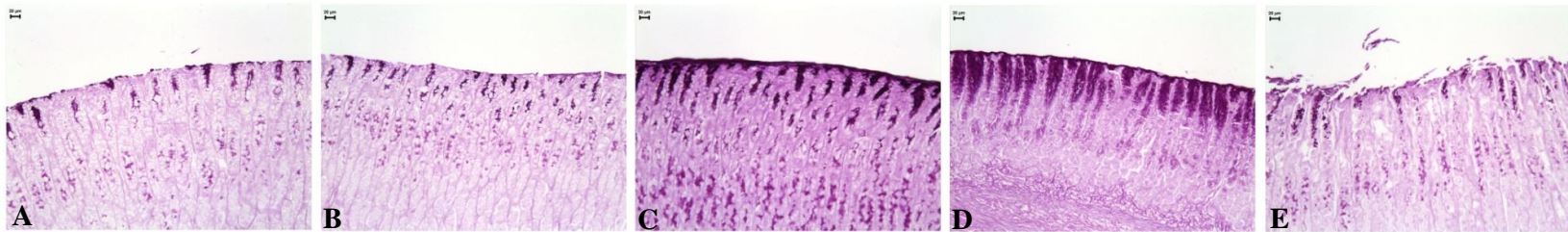


Figura 6: Fotomicrografia de estômagos submetidos à indução de úlceras por etanol absoluto após tratamento com (A) Veículo, (B) Carbenoxolona (100 mg/kg), (C) *Citrus lemon* (250 mg/kg), (D) Limoneno (177 mg/kg) ou (E) β -Pineno (33 mg/kg). Coloração PAS. A cor púrpura indica o muco.

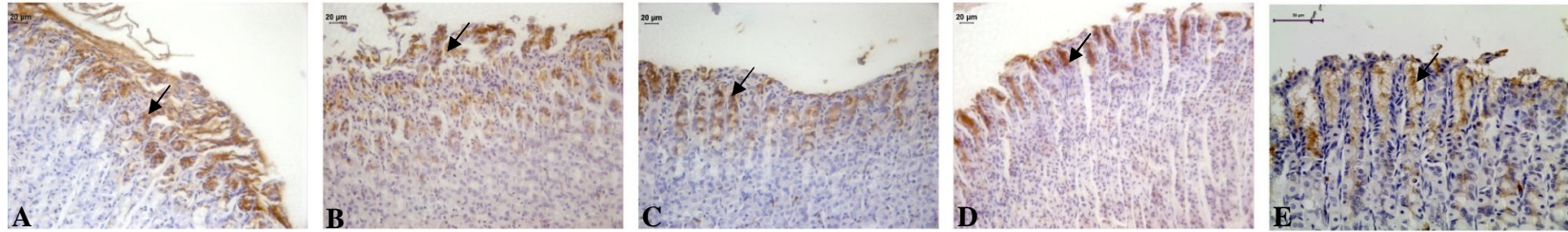


Figura 7: Imunoistoquímica para **HSP-70** em estômago de ratos submetidos à indução de úlcera por etanol absoluto após tratamento com (A) veículo, (B) Carbenoxolona (100 mg/kg), (C) *Citrus lemon* (250 mg/kg), (D) Limoneno (177 mg/kg), (E) β-pineno (33 mg/kg). Setas indicam imunomarcção.

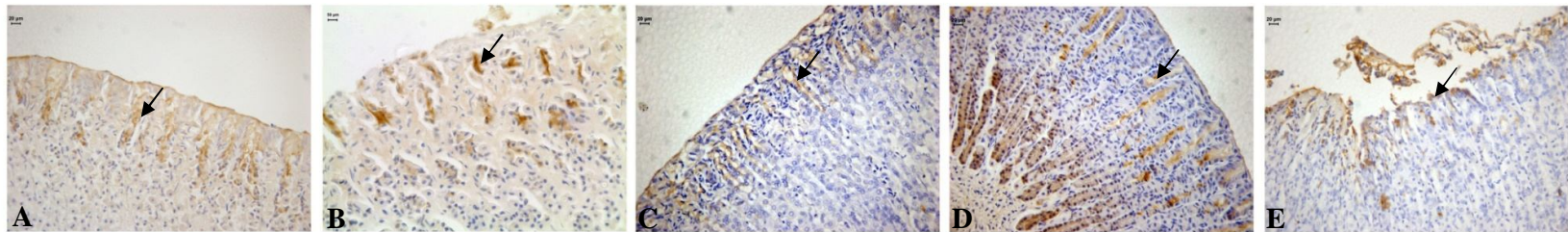


Figura 9: Imunoistoquímica para **VIP** em estômago de ratos submetidos à indução de úlcera por etanol absoluto após tratamento com (A) veículo, (B) Carbenoxolona (100 mg/kg), (C) *Citrus lemon* (250 mg/kg), (D) Limoneno (177 mg/kg), (E) β-pineno (33 mg/kg). Setas indicam imunomarcção.

CAPÍTULO III

Avaliação do efeito gastroprotetor do óleo essencial da casca de Croton cajucara

1. *Croton cajucara*

Croton cajucara Benth. (Euphorbiaceae), popularmente conhecido por “sacaca” (feitiço, na língua Tupi), é uma planta nativa da Amazônia que representa um recurso medicinal de grande importância no tratamento e cura de várias doenças, tais como: controle de índices elevados de colesterol, diabetes, diarreia, inflamações do fígado (Simões et al., 1979; Di Stasi et al., 1989; Carvalho et al., 1996), febre, gastrite, úlcera péptica, inflamações dos rins e vesícula, malária, icterícia e hepatite (Van Den Berg, 1993; Di Stasi et al., 1994). A casca do caule de *Croton cajucara* é preparada como infusão nos casos de azia, gastrite e úlcera péptica (Souza-Brito & Nunes, 1997). Esta é uma das mais importantes plantas medicinais brasileiras da atualidade (Maciel et al., 2002).

O tratamento oral com óleo essencial de *Croton cajucara* aumentou os níveis de prostaglandina E₂ e secreção de muco no estômago de ratos, prevenindo a formação de lesões agudas e acelerando a cicatrização de úlceras induzidas por ácido acético, efeito que foi atribuído à presença de sesquiterpenos de baixo peso molecular (Hiruma-Lima et al., 1999, 2002; Nunes et al., 1993), que consistem principalmente em C₁₅H₂₄. Os componentes principais desse óleo são α -copaeno (20,9%) e cipereno (29,0%) (Hiruma-Lima et al., 2002; Paula et al., 2006).

Assim, este trabalho teve como objetivo testar a atividade gastroprotetora de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto e os mecanismos de ação do óleo essencial de *Croton cajucara*.



Figura 1: *Croton cajucara* Benth. Retirado de http://www.museu-goeldi.br/museuempauta/noticias/agencia_museu_goeldi/25092008/manchete.html, acesso em 24/03/2009

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Para todos os experimentos realizados, foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250g) provenientes do Biotério Central da UNESP, aclimatados às condições do biotério do Departamento de Morfologia por cerca de duas semanas antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados. Os animais foram alimentados com ração Guabi e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais nº 002/04-CEEA submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

2.2. Obtenção de *Croton cajucara* e determinação da dose

As cascas do caule de *Croton cajucara* (CC) foram coletadas por um mateiro experiente na cidade de Santarém, Pará. Uma exsicata já havia sido depositada no Herbário IAN, de Belém, Pará, sob o número 247. O óleo essencial das cascas de CC foi extraído pelo método de destilação por arraste com vapor d'água. Ao final de cada extração, o óleo obtido foi separado da fase aquosa com auxílio do solvente éter etílico. A solução orgânica (etérea) foi secada com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada a baixa pressão e temperatura. O rendimento médio de cada extração foi de 0,8%.

Esta etapa foi desenvolvida no laboratório do Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (PR), Setor de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Química.

A dose de CC segue a literatura de referência (De Paula et al., 2008): 100 mg/kg.

2.3. Indução de úlceras gástricas por Etanol absoluto

Este método baseia-se na metodologia descrita por Morimoto *et al.* (1991). Após 24 horas de jejum, ratos Wistar machos (n=7) foram submetidos aos tratamentos com veículo (Tween 80 a 8%, controle negativo), Carbenoxolona (100 mg/kg, controle positivo) ou CC 100 mg/kg 1 hora antes da administração de 1 mL de etanol absoluto por animal. Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram sacrificados na câmara de CO₂, tiveram os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, prensados em placa de vidro e escaneados. As lesões foram medidas com auxílio do programa AVSoft BioView. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (em mm²). Depois, foram destinados à confecção de lâminas para observação do caráter morfológico, histológico (coloração em Hematoxilina & Eosina – HE – e Ácido periódico-Schiff – PAS) e imunistoquímico das lesões. Determinou-se um escore microscópico (Jahovic et al., 2007) para os seguintes parâmetros da mucosa: descamação, hemorragia, dano glandular e infiltração eosinofílica, que variou de 0 (ausência do caráter em questão) a 3 (maior presença observada do caráter em questão, corresponde ao controle negativo). O escore total correspondeu a 12.

2.4. Determinações imunistoquímicas

Foram realizadas reações imunistoquímicas consideradas mais adequadas para este modelo, que são VIP (peptídeo intestinal vasoativo, inibidor de secreção gástrica) e HSP-70 (*heat shock protein*, proteínas citoprotetoras).

Cinco lâminas histológicas representativas de cada grupo de tratamento foram desparafinizadas, reidratadas e reveladas com o método ABC (complexo biotina-avidina). O bloqueio de reação inespecífica foi feito com soro normal de cabra a 1% e leite desnatado a 3% e anticorpo para VIP ou HSP-70 (1:100). Depois de lavados em solução salina tamponada de fosfato (PBS 0,01mol/L, pH 7,4), os cortes foram incubados em anti-soro secundário. Foram então enxaguados em PBS e incubados em ABC (kit ABC - Vector) e incubados em reação de peroxidase (3,3'-diaminobenzidina tetracloridro- Sigma) contendo 0,01% de H₂O₂ em tampão PBS.

2.5. Determinação do envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos (SH) na citoproteção

Este método baseia-se na metodologia descrita por Matsuda et al. (1999). Ratos machos Wistar (n=7) foram divididos em 4 grupos. Os ratos foram pré-tratados com salina ou com NEM (N-ethylmaleimide, 10 mg/kg), um bloqueador dos grupamentos SH, por via

intraperitoneal. Trinta minutos depois, receberam por via oral veículo ou CC (100 mg/kg) e após 60 minutos todos os grupos foram tratados com 1 ml de etanol absoluto, via oral, para a indução de úlceras gástricas. Uma hora depois da administração do etanol, os animais foram sacrificados para a determinação e comparação da área das úlceras gástricas.

2.6. Determinação do envolvimento do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção

Este método baseia-se na metodologia descrita por Matsuda et al. (1999). Ratos machos Wistar (n=7) foram divididos em 4 grupos onde os animais foram pré-tratados com salina ou com L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester 70 mg/kg), um inibidor da NO-sintase, por via intraperitoneal. Trinta minutos depois, receberam por via oral veículo ou CC (100 mg/kg) e após 60 minutos todos os grupos foram tratados com 1 ml de etanol absoluto, via oral, para a indução de úlceras gástricas. Uma hora depois da administração do etanol, os animais foram sacrificados para determinação e comparação da área das úlceras gástricas.

2.7. Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)

Este método baseia-se na metodologia descrita por Anderson et al. (1985) e tem como objetivo verificar se ocorre dependência de GSH no efeito gastroprotetor de CC. Após o escaneamento dos estômagos no modelo de indução de úlceras por etanol absoluto, foi coletado um pequeno fragmento de cada estômago, que foi raspado, pesado e homogeneizado em tampão. As amostras foram aliqüotadas e a determinação da concentração de GSH foi feita através da reação com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (412 nm).

2.8. Avaliação de CC na inibição do crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*

A metodologia foi desenvolvida segundo modelos de Ellof (1998) e Palomino et al. (2002), utilizando-se a cepa ATCC43629 isolada de duodeno de indivíduos ulcerados. Foram utilizadas diluições seriadas de CC e se observou até qual diluição a bactéria se desenvolveu, para assim determinar a sua concentração inibitória mínima (CIM). Esta etapa foi realizada no laboratório da Profa. Dra. Taís Maria Bauab, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

2.9. Análise Estatística

Dados paramétricos foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste a posteriori de

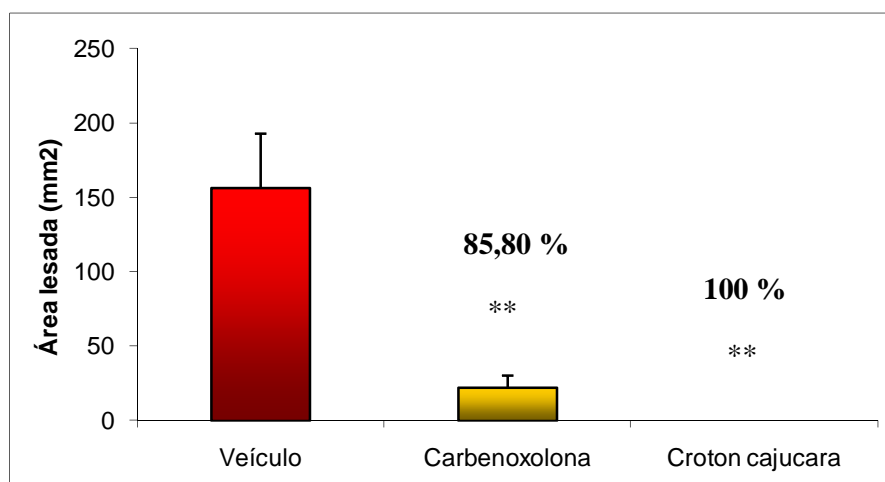
Dunnett. Dados não-paramétricos (escore histológico) foram expressos na forma de mediana (range) e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrico) seguido pelo teste a posteriori de Dunn. Todas as análises foram feitas pelo software GraphPad InStat com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lesões gástricas induzidas por etanol são predominantes na parte glandular do estômago. A administração de etanol aumenta a peroxidação lipídica, reduz os níveis de SOD (superóxido dismutase), catalase e glutatona reduzida (fatores protetores da mucosa gástrica) (Bafna & Balaramam, 2004), depleta o muco contido na parede gástrica (Al-Howiriny et al., 2003), estimula a formação do leucotrieno C4 (LTC4), de produtos secretados por mastócitos (Oates & Hakkinen, 1988) e de espécies reativas de oxigênio (Mizui et al., 1987), causa distúrbios na microcirculação gástrica, isquemia e liberação de radicais livres, liberação de endotelina e inibição da liberação de prostaglandinas (Abdel-Salam et al., 2001), resultando em dano à mucosa gástrica. As doenças do trato gastrointestinal relacionadas ao álcool possuem importante papel na gastroenterologia clínica (Siegmund et al., 2003).

No modelo de indução de úlceras por etanol absoluto, CC (100 mg/kg) demonstrou 100% de gastroproteção macroscópica, ou seja, ausência de lesões hemorrágicas que pudessem ser vistas macroscopicamente. O controle positivo Carbenoxolona exerceu 85,80% de gastroproteção. A área das lesões, expressa em mm^2 , pode ser vista na figura 2.

Figura 2: Área de úlcera gástrica em ratos submetidos à indução de úlcera gástrica por etanol absoluto após tratamento com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg) ou *Croton cajucara* (100 mg/kg)

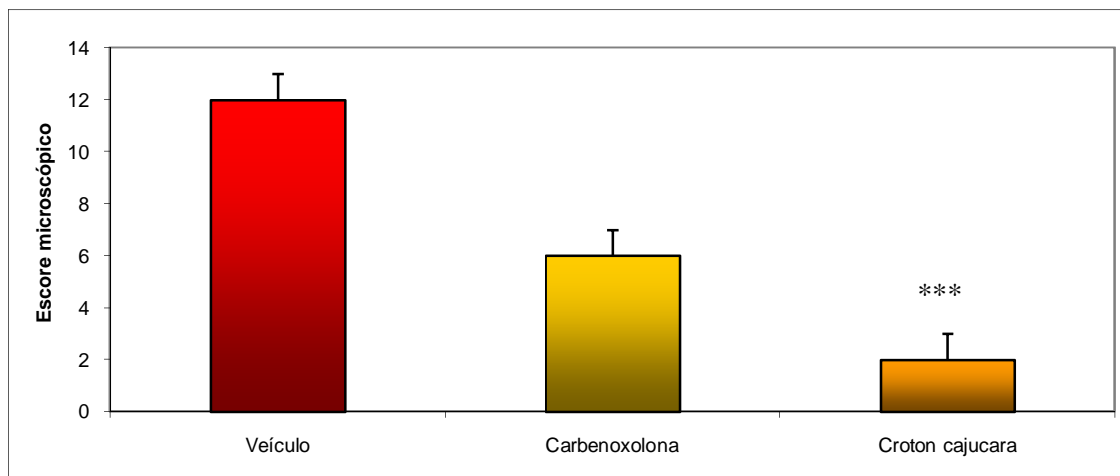


Veículo $156,60 \pm 36,30$, Carbenoxolona $22,27 \pm 8,21$ ** e *Croton cajucara* $0,00 \pm 0,00$ **. $F_{(2; 22)} = 4,863$. Valores no gráfico indicam a porcentagem de gastroproteção.

Microscopicamente, CC apresentou boa manutenção da integridade da mucosa gástrica, apresentando pouca descamação e dano glandular e ausência de infiltração eosinofílica e hemorragia. Já a carbenoxolona, embora tenha apresentado bom efeito gastroprotetor macroscópico, apresentou descamação, hemorragia e dano glandular moderados e pouca infiltração eosinofílica.

O aspecto histológico das lesões pode ser visto na figura 3 e o escore das lesões microscópicas, na figura 4.

Figura 4: Escore microscópico (0 – 12) das úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto após tratamento com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg) ou *Croton cajucara* (100 mg/kg).



Veículo 12(11-12), Carbenoxolona 6(5-7) e *Croton cajucara* 2(1-3)***. KW: 18,245, $p < 0,001$.

A barreira muco-bicarbonato fosfolipídeos constitui a primeira linha de defesa da mucosa (Lichtenberger, 1999; Atuma et al., 2001; Allen & Flemstron, 2005). O muco secretado na superfície estomacal atua como lubrificante, para reduzir o dano físico ao epitélio causado pelos alimentos ingeridos, e como armadilha para as bactérias, diminuindo a possibilidade de que a bactéria acesse o epitélio (Belley et al., 1999; Wallace, 2008). Substâncias ulcerogênicas dissipam o muco e a camada de fosfolipídeos, levando a re-difusão de ácido e injúria a mucosa (Darling et al., 2004).

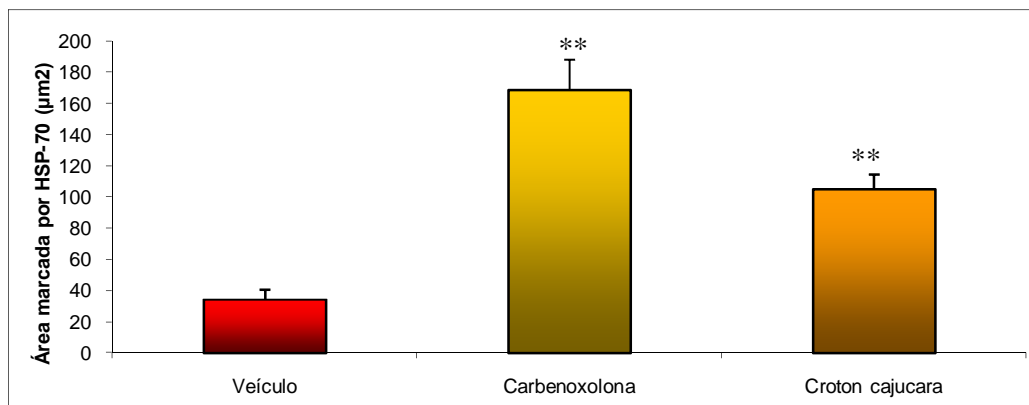
O tratamento com CC gerou uma substancial camada de muco PAS-positiva cobrindo a superfície da mucosa e as glândulas gástricas, indicando que CC estimulou a produção de muco (figura 5). Este dado está de acordo com Hiruma-Lima et al. (2002), que mostrou que o tratamento com CC estimulou a produção de muco em camundongos e a secreção de prostaglandina E₂ em ratos, que também estimula a produção de muco.

As análises imunoistoquímicas são importantes para verificar o mecanismo de ação da substância em questão. Neste modelo, foram realizadas reações imunoistoquímicas para HSP-70 e VIP.

Heat-shock protein 70 (HSP-70) é uma proteína das células de mamíferos, com 70 kDa de peso molecular, abundantemente produzida dentro das células em resposta a diferentes formas de estresse (Shichijo et al., 2003; Chang et al., 2007), apresentando função importante na citoproteção adaptativa. Ela protege os processos homeostáticos celulares de injúrias fisiológicas e ambientais através da preservação de estruturas normais de proteínas e reparo ou remoção de proteínas danificadas. Por isso, o acúmulo intracelular de HSP-70 induzido fisiologicamente, farmacologicamente, geneticamente ou por administração direta, protege o organismo de uma grande variedade de condições patológicas, incluindo a úlcera gástrica (Tytell & Hooper, 2001). Ainda, a acupuntura em determinados pontos induz a expressão de HSP-70 e acúmulo de prostaglandina E₂, gerando efeito gastroprotetor (Chang et al., 2007). Entretanto, os mecanismos responsáveis por esse fenômeno não são bem conhecidos. Ele pode ocorrer por um mecanismo citoprotetor que aumenta o fluxo sanguíneo e divisão celular na mucosa gástrica (Shichijo et al., 2003) ou através de proteção mitocondrial e interferência no programa de apoptose celular estresse-induzido. A indução de úlcera é uma situação de estresse celular, então, drogas que induzem acúmulo de HSP-70 exercem benefícios para prevenção e tratamento de úlceras (Rokutan, 2000). A expressão de HSP-70 está associada a proteção celular adaptativa à ingestão de etanol (Tsukimi & Okabe, 2001; Al Moutaery, 2003).

Analisando as lâminas histológicas, é possível perceber que houve imunomarcção em todos os grupos (figura 6) e a imunomarcção ficou concentrada nas áreas lesadas. A medida da área marcada para cada grupo (figura 7) mostra que tanto o controle positivo quanto CC estimularam significativamente a proteção celular adaptativa induzida pelas proteínas HSP-70; este sendo então um dos mecanismos de ação pelos quais essas drogas atuam no processo gastroprotetor.

Figura 7: Área de imunomarcção (μm^2) para HSP-70 em estômagos de ratos submetidos à indução de úlcera gástrica por etanol absoluto após tratamento com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg) ou *Croton cajucara* (100 mg/kg)

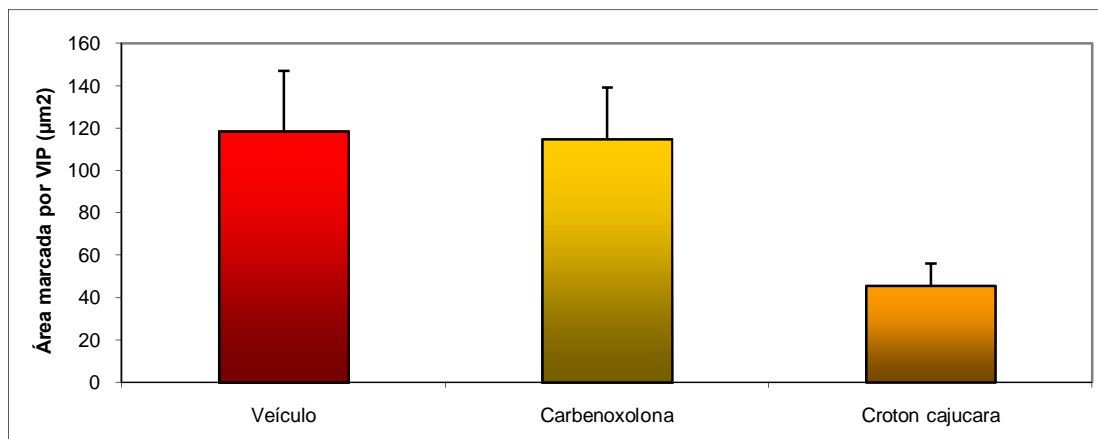


Veículo $34,3 \pm 6,3$, Carbenoxolona $168,9 \pm 19,4$ ** e *Croton cajucara* $105,1 \pm 9,4$ **. $F_{(2; 22)} = 29,063$.

O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) foi descoberto por Said & Mutt (1970). Ele apresenta muitas funções fisiológicas, envolvendo atividades nos sistemas digestivo, respiratório, circulatório, urogenital e nervoso (Iwanaga, 2002; Groneberg et al., 2004). Ele atua como molécula sinalizadora entre o sistema nervoso e o sistema imune, e pode regular a função dos mastócitos da mucosa intestinal através da regulação da secreção neuroendócrina e parácrina (Wu et al., 2008). VIP previne a formação de úlceras gástricas, inibindo a degranulação de mastócitos e protegendo o tecido gástrico da peroxidação lipídica. O mecanismo de ação do VIP nos níveis de histamina no tecido gástrico pode ser explicado por seu efeito inibitório sobre a liberação do hormônio gastrina (que estimula liberação de histamina) e sobre a atividade de mastócitos e células ECL, compartimentos que armazenam histamina no tecido gástrico. Regulando síntese e inativação de histamina, VIP equilibra os efeitos benéficos e prejudiciais dela, que é um importante mediador para reparo e cicatrização dos tecidos, apesar de estimular a secreção ácida gástrica. Ainda, VIP atua como antioxidante e anti-inflamatório, potencializando seu efeito gastroprotetor (Tunçel et al., 2003).

Novamente, pode-se notar imunomarcção em todos os grupos, concentrada nas áreas lesadas (figura 8). A medida da área marcada para cada grupo (figura 9) mostra que, embora a área marcada de CC tenha sido um pouco menor, não houve diferença estatística entre os três grupos, o que leva à conclusão de que o mecanismo de ação de CC não envolve aumento dos níveis de VIP para prevenção da formação de úlceras gástricas.

Figura 9: Área de imunomarcção (μm^2) para VIP em estômagos de ratos submetidos à indução de úlcera gástrica por etanol absoluto após tratamento com veículo, carbenoxolona (100 mg/kg) ou *Croton cajucara* (100 mg/kg)



Veículo $118,5 \pm 28,7$, Carbenoxolona $114,8 \pm 24,5$ e *Croton cajucara* $45,7 \pm 10,6$. $F_{(2; 19)} = 2,655$, $p > 0,05$.

Compostos sulfidrílicos endógenos não-protéicos (NP-SH) também são importantes agentes na gastroproteção contra úlceras induzidas por etanol absoluto (Szabo & Vattay, 1990). Geralmente, o aumento no dano é acompanhado por queda na concentração de compostos NP-SH, porque os grupos SH se ligam aos radicais livres formados por ação dos agentes nocivos. Compostos NP-SH devem estar envolvidos na remoção de radicais livres derivados de oxigênio e na produção de muco (Salim, 1993). O pré-tratamento com NEM, um bloqueador de compostos SH, aumentou significativamente a área das lesões gástricas dos animais tratados com CC, e seu efeito gastroprotetor (99,6%) foi parcialmente revertido pela administração de NEM (71%) (tabela 1). Esses resultados comprovaram que há envolvimento dos compostos endógenos NP-SH no efeito gastroprotetor de CC. Muitos produtos naturais apresentam dependência de compostos SH em seu efeito gastroprotetor. Entre eles, estão o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima fagifolia* (Lima et al., 2008 a), extrato da casca de *Hancornia speciosa* (Moraes et al., 2008) e até um diterpenóide isolado do extrato das folhas de *Croton reflexifolius* (Reyes-Trejo et al., 2008).

O óxido nítrico (NO) também tem importante função em manter a integridade da mucosa gástrica e na regulação da secreção de ácido, bicarbonato, muco e do fluxo sanguíneo na mucosa (Chandranath et al., 2002). Estudos mostraram que o NO é um importante fator gastroprotetor, que é liberado em alta quantidade e contribui para a redução da área e número das lesões (Kwiecien et al., 2008). Os mecanismos através dos quais ele protege a mucosa

gástrica e promove cicatrização de úlceras não são inteiramente compreendidos, mas acredita-se que seja através da manutenção do fluxo sanguíneo gastrointestinal e inibindo aderência e ativação de leucócitos na microcirculação gástrica (Tadic et al., 2008). Porém, o pré-tratamento com L-NAME, um bloqueador da enzima NO-sintase, precursora do NO, não alterou significativamente a área das lesões gástricas dos animais tratados com CC (tabela 1), não havendo grande queda na porcentagem de gastroproteção (92,2%). Assim, foi possível concluir que não há envolvimento do NO no efeito gastroprotetor de CC. Resultado semelhante foi obtido por Leite et al. (2009) com óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker e por Dias et al. (2001) com as partes aéreas de *Artemisia annua*, cujo potencial gastroprotetor não foi atenuado com a administração de L-NAME.

Tabela 1: Efeito do óleo essencial de *Croton cajucara* (100 mg/kg) em úlceras induzidas por etanol absoluto em ratos pré-tratados com NEM (bloqueador de SH) ou L-NAME (inibidor de NO)

Pré-tratamento (i.p)	Salina	NEM	L-NAME
Tratamento (p.o)	Veículo	Veículo	Veículo
Área lesada (mm ²)	139.05 ± 19.21	1229.7 ± 141.25 <i>b</i>	511.94 ± 80.96 <i>b</i>
Tratamento (p.o)	<i>Croton cajucara</i>	<i>Croton cajucara</i>	<i>Croton cajucara</i>
Área lesada (mm ²)	0.55 ± 0.30 <i>a</i>	356.63 ± 53.69 <i>a, c</i>	40.08 ± 18.23 <i>a</i>
Gastroproteção (%)	99.6	71	92.2

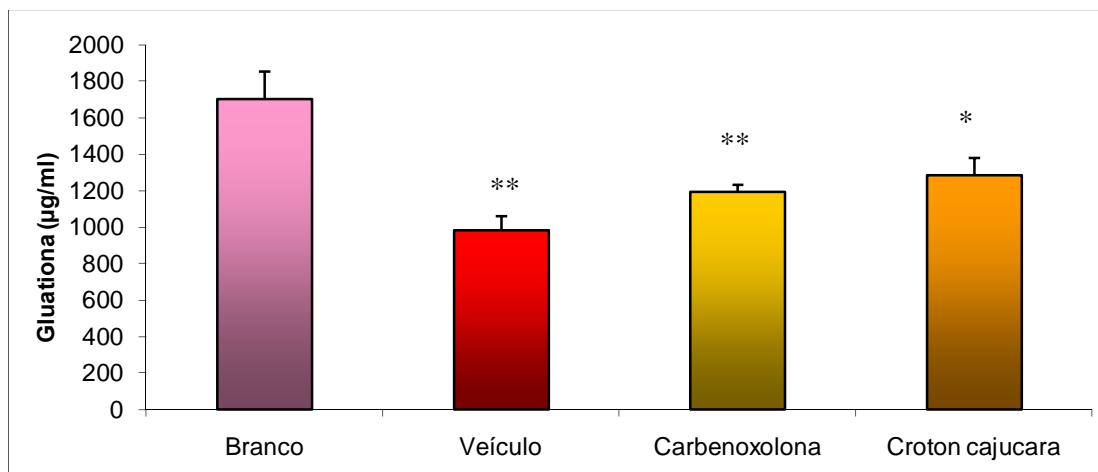
Teste t não-pareado. *a* indica $p < 0,01$ na mesma coluna (entre o mesmo pré-tratamento). *b* indica $p < 0,01$ na mesma linha (entre o mesmo tratamento oral - veículo). *c* indica $p < 0,01$ na mesma linha (entre o mesmo tratamento oral - *Croton cajucara*).

Outro mecanismo de agressão da mucosa gástrica pelo etanol é a diminuição dos níveis de glutathiona (GSH) (Szabo & Brown, 1987). GSH é um importante antioxidante encontrado na maioria das células dos mamíferos (Devi et al., 2007). Ela é essencial para a manutenção da integridade da mucosa gástrica, prevenindo lesões causadas por agentes nocivos. GSH protege a célula dos danos induzidos pelos radicais livres através de proteção contra peroxidação lipídica ou protegendo grupamentos sulfidrílicos de se tornarem irreversivelmente oxidados após injúria oxidante. A habilidade das células de manter seu estado reduzido deve-se, em parte, à sua habilidade de sintetizar GSH (Mehta et al., 1998;

Matthews & Butler, 2005). Estudos revelam que os níveis de GSH são reduzidos no processo ulcerativo (Ozbakis Dengiz et al., 2007).

O resultado da determinação dos níveis de GSH para CC pode ser visto na figura 10. O tratamento não foi capaz de manter a GSH em níveis próximos ao grupo Branco após administração de etanol absoluto, que depletou os níveis de GSH. Isso significa que o efeito gastroprotetor de CC não atua por essa via antioxidante.

Figura 10: Determinação dos níveis de Glutathione (GSH, em $\mu\text{g/ml}$) na mucosa gástrica de ratos tratados com veículo, Carbenoxolona (100 mg/kg) ou *Croton cajucara* (100 mg/kg).



Branco $1704,30 \pm 149,03$, Veículo $982,8 \pm 79,07^{**}$, Carbenoxolona $1195,60 \pm 37,57^{**}$ e *Croton cajucara* $1286,5 \pm 93,15^*$. $F_{(3; 18)} = 10,421$, $p < 0,05$.

Helicobacter pylori é uma bactéria espiroqueta gram-negativa que coloniza o estômago de mais de 80% da população de países em desenvolvimento e quase 40% em países industrializados. A infecção por *H. pylori* é reconhecida como o maior agente etiológico da gastrite crônica e carcinoma gástrico. Estima-se que pacientes portadores da infecção apresentam 10% a 20% de risco de desenvolver úlcera e 1% a 2% de risco de desenvolver câncer gástrico distal (Kusters et al., 2006). A crescente resistência da bactéria aos antibióticos demanda a procura por novos compostos baseados em fontes vegetais (Velázquez & Feirtag, 1999; Ndip et al., 2007).

CC apresentou excelente atividade anti-*Helicobacter pylori*, com concentração inibitória mínima de 125 $\mu\text{g/ml}$. A literatura tem mostrado que CIM igual ou menor a 250 $\mu\text{g/ml}$ é interessante para produtos naturais (Lima et al., 2008 a, 2008 b; Moraes et al., 2008). Então, CC apresenta excelente atividade antimicrobiana contra um dos mais importantes

fatores causadores de úlcera gástrica, e pode ser administrado como um suplemento para aumentar a eficácia das terapias antibacterianas atuais.

4. CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *Croton cajucara* apresentou atividade gastroprotetora contra úlceras induzidas por etanol absoluto;

- Esse óleo exerceu boa preservação histológica da mucosa, prevenindo totalmente a formação de hemorragia e infiltração eosinofílica na mucosa e atenuando o dano glandular e a descamação promovidos pelo etanol;

- Seu mecanismo de ação está relacionado à produção de muco pelas células epiteliais da mucosa gástrica, a ativação de proteínas *heat-shock* 70, à manutenção dos compostos sulfidrílicos não-protéicos da mucosa;

- Entretanto, seu mecanismo de ação não inclui a liberação do peptídeo intestinal vasoativo, nem a ativação do óxido nítrico nem a manutenção dos níveis de glutathione;

- A união desses novos resultados com os resultados já descritos na literatura confirma a eficácia da atividade do óleo essencial de *Croton cajucara* no tratamento e prevenção de úlceras gástricas indicada pela etnofarmacologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Salam OM, Czimmer J, Debreceni A, Szolcsányi J, Mózsik G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J Physiol Paris*, 95(1-6): 105-127, 2001.

Al Moutaery AR. Protective effect of ketoconazole against experimentally induced gastric ulcers in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 113-114: 5-23, 2003.

Al-Howiriny T, Al-Sohaibani M, El-Tahir K, Rafatullah S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of “Parsley” *Petroselinum crispum*. *The Am J Chin Med*, 31(5): 699–711, 2003.

Allen A & Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288: C1–C19, 2005

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*, 113: 548-555, 1985.

Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastric mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280: G922–G929, 2001.

Bafna PA & Balaraman R. Anti-ulcer and antioxidant activity of DHC-1, a herbal formulation. *J Ethnopharmacol*, 90: 123–127, 2004.

Belley A, Keller K, Gottke M, Chadee K. Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am J Trop Med Hyg*, 60(4): 10–15, 1999.

Carvalho JC, Silva MF, Maciel MA, Pinto A, Nunes DS, Lima RM, Bastos JK, Sarti SJ. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Med*, 62: 402–404, 1996.

Chandranath SI, Bastaki SM, Singh J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29: 173–180, 2002.

Chang XR, Peng L, Yi SX, Peng Y, Yan J. Association of high expression in rat gastric mucosal heat shock protein 70 induced by moxibustion pretreatment with protection against stress injury. *World J Gastroenterol*, 13(32): 4355–4359, 2007.

Darling RL, Romero JJ, Dial EJ, Akunda JK, Langenbach R, Lichtenberger LM. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. *Gastroenterology*, 127: 94–104, 2004.

De Paula ACB, Gracioso JS, Toma W, Hiruma-Lima CA, Carneiro EM, Souza Brito ARM. The antiulcer effect of *Croton cajucara* Benth in normoproteic and malnourished rats. *Phytomedicine*, 15(10): 815–825, 2008.

Devi RS, Narayan S, Vani G, Shyamala Devi CS. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chem Biol Interact*, 167(1): 71–83, 2007.

Di Stasi LC, Santos EMC, Moreira dos Santos C, Hiruma CA. Plantas Mediciniais da Amazônia, 1ª ed. Ed. UNESP, São Paulo, 127–128, 1989.

Di Stasi LC, Hiruma CA, Guimarães EM, Santos CM. *Fitoterapia*, 65: 529, 1994.

Dias PC, Foglio MA, Possenti A, Nogueira DCF, Carvalho JE. Antiulcerogenic activity of crude ethanol extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Phytother Res*, 15: 670–675, 2001.

Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*, 64(8): 711–713, 1998.

Groneberg DA, Rabe KF, Wagner U, Fischer A. Vasoactive intestinal polypeptide in the respiratory tract: physiology and pathophysiology. *Pneumologie*, 58: 330–338, 2004.

Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Nunes DS, Souza Brito ARM. Effects of an essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *J Pharm Pharmacol*, 51: 341–346, 1999.

Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Bighetti EJ, Grassi-Kassisse DM, Nunes DS, Souza-Brito ARM. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. *Phytomedicine*, 9: 523–529, 2002.

Iwanaga T. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Nippon Rinsho*, 60(6): 35–38, 2002.

Jahovic N, Erkanli G, Işeri S, Arbak S, Alican I. Gastric protection by alpha-melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: involvement of somatostatin. *Life Sci*, 80(11): 1040-1045, 2007.

Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 19: 449–490, 2006.

Kwiecień S, Pawlik MW, Brzozowski T, Konturek PC, Liwowski Z, Pawlik WW, Konturek SJ. Nitric oxide (no)-releasing aspirin and (no) donors in protection of gastric mucosa against stress. *J Physiol Pharmacol*, 59(2): 103-115, 2008.

Leite GO, da Penha AR, Fernandes CN, Souza HH, da Costa JG, Campos AR. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. *Fitoterapia*, 80(1): 77-80, 2009.

Lichtenberger LM. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*, 15: 463–472, 1999.

Lima ZP, Dos Santos RD, Torres TU, Sannomiya M, Rodrigues CM, Dos Santos LC, Pellizzon CH, Rocha LR, Vilegas W, Souza Brito AR, Cardoso CR, Varanda EA, de Moraes HP, Bauab TM, Carli C, Carlos IZ, Hiruma-Lima CA. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *J Ethnopharmacol*, 120: 149–160, 2008 a.

Lima ZP, Calvo TR, Silva EF, Pellizzon CH, Vilegas W, Brito ARMS, Bauab TM, Hiruma-Lima CA. Brazilian Medicinal Plant Acts on Prostaglandin Level and *Helicobacter pylori*. *J Med Food*, 11(4): 701–708, 2008 b.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova*, 25 (3): 429-438, 2002.

Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic,

an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. *Life Sci*, 65: 27-32, 1999.

Matthews GM & Butler RN. Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: a review of the role of glutathione and the oxidative pentose pathway. *Helicobacter*, 10(4): 298-306, 2005.

Mehta A, Singh S, Ganguly NK. Impairment of intestinal mucosal antioxidant defense system during *Salmonella typhimurium* infection. *Dig Dis Sci*, 43(3): 646–651, 1998.

Mizui T, Sato H, Hirose F, Doteuchi M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci*, 41: 755–763, 1987.

Moraes TM, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegas W, Pellizzon CH, Brito ARMS, Hiruma-Lima CA. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *J Ethnopharmacol*, 120: 161–168, 2008.

Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jap J Pharmacol*, 57: 495-505, 1991.

Ndip RN, Malange Tarkang AE, Mbullah SM, Luma HN, Malongue A, Ndip LM, Nyongbela K, Wirmum C, Efange SM. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J Ethnopharmacol*, 114(3): 452-457, 2007.

Nunes DS, Lima RM, Sorratini RB, Barata LES. Study of the leaf and bark essential oil of sacaca. The 1st International Symposium on Chemistry of the Amazon, Manaus, Abstract, 124, 1993

Oates PJ & Hakkinen JP. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterol*, 94: 10–21, 1988.

Ozbakis Dengiz G, Odabasoglu F, Halici Z, Cadirci E, Suleyman H. Gastroprotective and antioxidant effects of Montelukast on Indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Pharmacol Sci*, 105: 94–102, 2007.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(8): 2720-2722, 2002.

Paula ACB, Toma W, Gracioso JS, Hiruma-Lima CA, Carneiro EM, Souza-Brito ARM. The gastroprotective effect of the essential oil of *Croton cajucara* is different in normal rats than in malnourished rats. *British J Nutr*, 96: 310–315, 2006.

Reyes-Trejo B, Sánchez-Mendoza ME, Becerra-García AA, Cedillo-Portugal E, Castillo-Henkel C, Arrieta J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *J Pharm Pharmacol*, 60: 931–936, 2008.

Rokutan K. Role of heat-shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol*, Suppl: D12-19, 2000.

Said S & Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, 169: 1217–1218, 1970.

Salim AS. Sulfhydryl-containing agents: new approach to the problem of refractory peptic ulceration. *Pharmacology*, 46: 281–288, 1993.

Shichijo K, Ihara M, Matsuu M, Ito M, Okumura Y, Sekine I. Overexpression of heat-shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. *Dig Dis Sci*, 48(2): 340-348, 2003.

Siegmund S, Haas S, Schneider A, Singer MV. Animal models in gastrointestinal alcohol research - a short appraisal of the different models and their results. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17(4): 519-42, 2003.

Simões JC, Silva AJR, Serruya H, Bents MHS. Desidrocrotonina, um norditerpeno de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *Cienc Cult*, 31: 1140–1141, 1979.

Souza Brito ARM, Nunes DS. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. *Cienc Cult*, 49: 402–408, 1997.

Szabo S & Brown A. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulfhydryls. *Proc Soc Exp Biol Med*, 185(4): 493-497, 1987.

Szabo S & Vattay P. Experimental gastric and duodenal ulcers. Advances in pathogenesis. *Gastroenterol Clin North Am*, 19: 67–85, 1990.

Tadic VM, Dobric S, Markovic GM, Đorđević SM, Arsic IA, Menkovic NR, Stevic T. Anti-inflammatory, gastroprotective, free-Radical-Scavenging, and antimicrobial activities of Hawthorn berries ethanol extract. *J Agric Food Chem*, 56: 7700–7709, 2008.

Tsukimi Y & Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull*, 24: 1-9, 2001.

Tunçel N, Tunçel M, Aboul-Enein HY. Effects of the vasoactive intestinal peptide on stress-induced mucosal ulcers and modulation of methylation of histamine in gastric tissue of the rats. *Il Fármaco*, 58: 449-454, 2003.

Tytell M & Hooper PL. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets*, 5(2): 267-287, 2001.

Van Den Berg ME. Plantas Medicinais na Amazônia - Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático; Gráfica Editora Falangola: Belém, p. 158, 1993.

Velázquez M & Feirtag JM. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *Int J Food Microbiol*, 53: 95-104, 1999.

Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev*, 88: 1547–1565, 2008.

Wu HG, Jiang B, Zhou EH, Shi Z, Shi DR, Cui YH, Kou ST, Liu HR. Regulatory mechanism of electroacupuncture in irritable bowel syndrome: preventing MC activation and decreasing SP VIP secretion. *Dig Dis Sci*, 53: 1644–165

ANEXOS

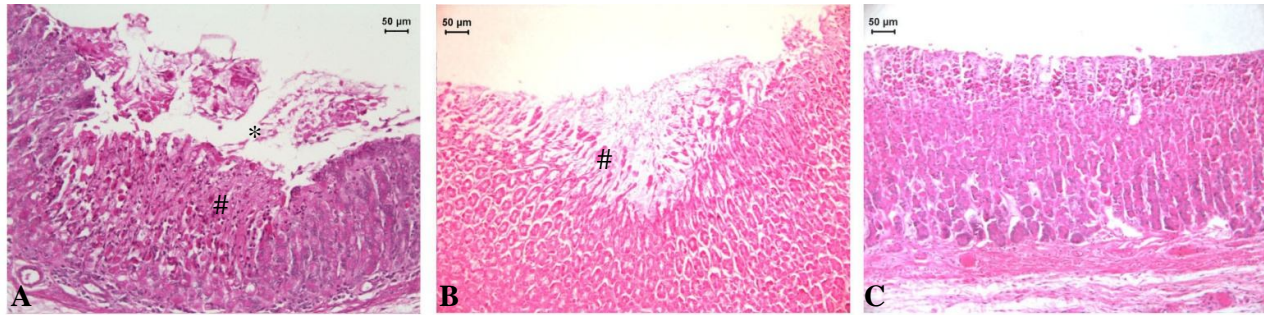


Figura 3: Fotomicrografia de estômagos submetidos à indução de úlceras por etanol absoluto após tratamento com (A) Veículo, (B) Carbenoxolona (100 mg/kg) ou (C) *Croton cajucara* (100 mg/kg). Coloração HE. * indica descamação e # indica dano glandular.

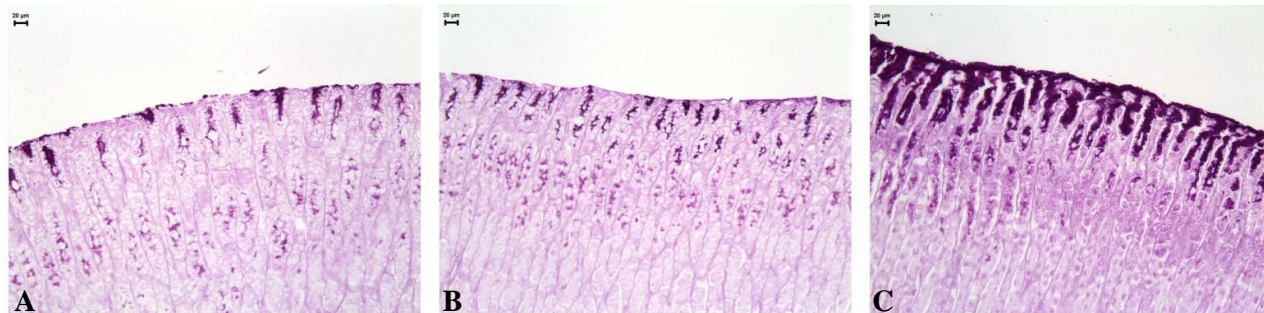


Figura 5: Fotomicrografia de estômagos submetidos à indução de úlceras por etanol absoluto após tratamento com (A) Veículo, (B) Carbenoxolona (100 mg/kg) ou (C) *Croton cajucara* (100 mg/kg). Coloração PAS. A cor púrpura indica o muco.

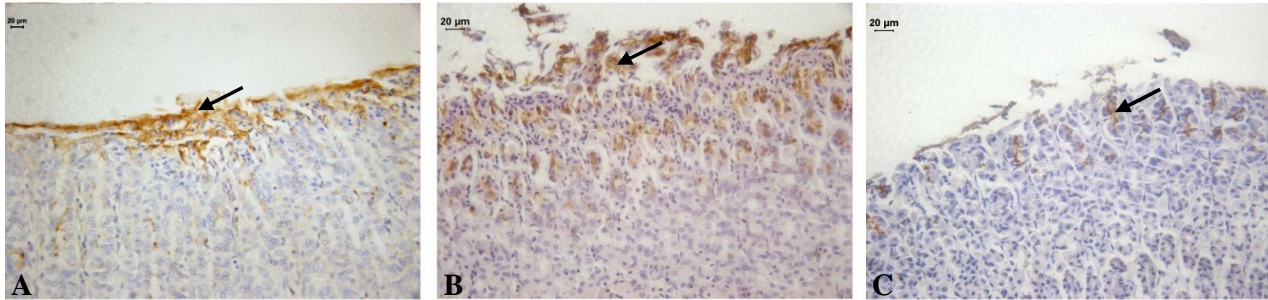


Figura 6: Imunoistoquímica para **HSP-70** em estômago de ratos submetidos à indução de úlcera por etanol absoluto após tratamento com (A) Veículo, (B) Carbenoxolona (100 mg/kg) ou (C) *Croton cajucara* (100 mg/kg). Setas indicam imunomarcção.

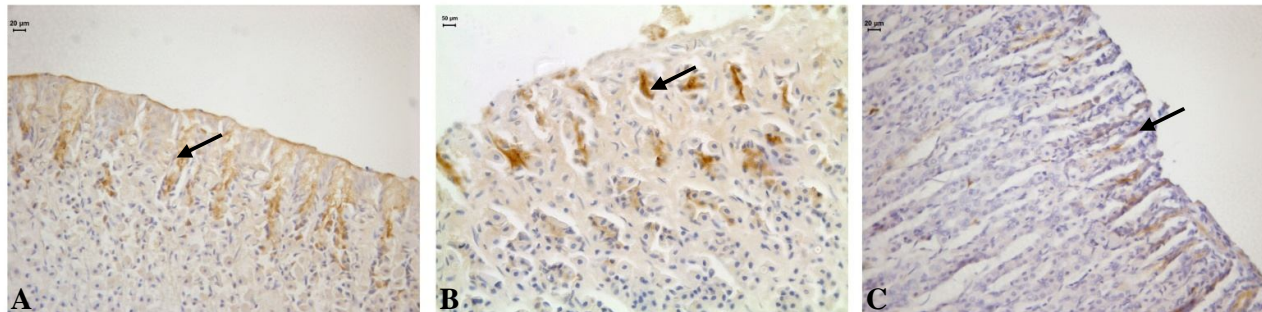


Figura 8: Imunoistoquímica para **VIP** em estômago de ratos submetidos à indução de úlcera por etanol absoluto após tratamento com (A) Veículo, (B) Carbenoxolona (100 mg/kg) ou (C) *Croton cajucara* (100 mg/kg). Setas indicam imunomarcção.

