

HÉLCIO CASSEMIRO MARCONDES

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE *Hortia brasiliana* Vand Ex
DC. COMO ANTI-ULCEROGÊNICA GÁSTRICA,
CICATRIZANTE E ANTI-FÚNGICA

Ouro Preto
Escola de Farmácia
UFOP

HÉLCIO CASSEMIRO MARCONDES

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE *Hortia brasiliana* Vand Ex
DC. COMO ANTI-ULCEROGÊNICA GÁSTRICA,
CICATRIZANTE E ANTI-FÚNGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Ouro Preto, para obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ouro Preto
Escola de Farmácia
UFOP

S321a Marcondes, Hécio Casseiro.
Avaliação das atividades de *Hortia brasiliiana* Vand Ex DC. como anti-ulcerogênica gástrica, cicatrizante e anti-fúngica [manuscrito] / Hécio Casseiro Marcondes – 2012.
v, 122 f.: il. color.; grafs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Tanus Jorge Nagem.
Co-orientadora: Profª Drª Tânia Toledo de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (CIPHARMA).

Área de concentração: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

1. Estômago - Úlceras - Teses. 2. Sistema gastrointestinal - Teses.
3. Antifúngicos - Teses. 4. Rutaceae - Teses. 5. Gastroproteção - Teses.
I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 615.32:616.33-002

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Assinaturas

Este trabalho foi realizado sob a orientação de:

- Prof. Dr. Tanus Jorge Nagem, DEQUI, Departamento de Química, ICEB, UFOP e Profa. Dra. Tânia Toledo de Oliveira (co-orientação), Departamento de Bioquímica, UFV.

Este trabalho contou com a colaboração de:

- Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello da Universidade Federal do Pará.
- Profa. Me Líliam Teixeira Oliviera, Laboratório de Multiusuário do CiPharma, Escola de Farmácia, UFOP.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela proteção e por iluminar meu caminho. Aos meus orientadores Prof. Tanus Jorge Nagem e Profa. Tânia Toledo de Oliveira pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigado pela orientação, confiança, paciência, otimismo e respeito, que tornaram possível esta realização. Levarei para sempre seus exemplos profissionais de serenidade, sucesso e dinamismo.

Aos meus pais Sebastião Marcondes e Geralda Neida Cassemiro Marcondes e aos meus irmãos Helbert, Helton e Henrique por participarem deste momento e conquista em minha vida, com apoio, incentivo e dedicação incondicionais. Agradeço a Marcela pelo carinho e incentivo por participar deste momento especial, mesmo estando longe mas sempre presente. Ao Prof. Dr e amigo Jorge Luis Humberto pela ajuda, conselhos e amizade sincera da mesma forma agradeço aos meus grandes amigos de jornada Rodrigo, Patrícia, Ramon e Adriano pelos momentos alegres que compartilhamos.

Faço um agradecimento especial a Profa. Dra. Vanessa Jóia que me ajudou muito neste trabalho juntamente com Prof. Ms Ricardo Zatti que se empenharam em me ajudar. Minha gratidão será eterna. Ao Prof. Dr. Laurent pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Agradeço também aos amigos de Viçosa (Carlos, Marcos Dudu e Luana) pela colaboração e amizade e aos amigos de Ouro Preto em especial David, Alexandre e Armando.

Ao Cipharma e aos Professores da Escola de Farmácia em especial Professor Dr. Orlando Henrique e Gustavo Bianco, pelos ensinamentos e colaboração neste trabalho. A Isabel e Paula pelas oportunidades e pela amizade neste momento e a todos que participaram desta etapa de aprendizado.

RESUMO

A espécie *Hortia brasiliana* Vand. Ex Dc. conhecida popularmente como “paratudo” é utilizada popularmente em distúrbios gastrointestinais e cicatrizante. Neste trabalho avaliou-se a atividade gastroprotetora, cicatrizante e tóxica de cascas de *Hortia brasiliana*. O material vegetal foi coletado no Município de Mariana, Minas Gerais, e a exsicata depositada no Herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto. Foram preparados extratos etanólicos da casca da espécie estudada e realizados inicialmente estudos de classes de metabólitos secundários biológicos onde foi verificado a presença de alcalóides, esteróides, triterpenoides e taninos. O perfil cromatográfico por CLAE sugeriu a presença do alcalóide Ruteocarpina. Para cumprir os objetivos propostos, foram preparadas formulações (dos extratos etanólicos de *Hortia brasiliana*) do tipo suspensão e nanoemulsão utilizadas nos testes de atividade farmacológicos em animais. As lesões gástricas foram induzidas por Etanol absoluto e AINEs sendo tratadas com as duas formulações em 3 doses. O modelo de indução utilizando Etanol Absoluto conferiu para a suspensão de *Hortia brasiliana* na dose de 100 mg/Kg menor área de lesão formada ($0,034 \pm 0,02 \text{ cm}^2$) e menor índice de lesão ulcerativa ($11,00 \pm 1,92$). As lesões utilizando a indometacina como agente ulcerante apresentou menor área de lesão formada ($0,07 \pm 0,02 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$) e menor índice de lesão ulcerativa ($6,83 \pm 2,60$) para o tratamento realizado com a formulação nanoemulsão do extrato na dosagem de 100 mg/Kg. Para o estudo do poder cicatrizante em lesões gástricas foi utilizado o modelo de indução de úlcera por queimadura, tendo o ácido acético como indutor de lesões, apresentando a nanoemulsão, dose de 100 mg/Kg, menor área total lesada ($0,04 \pm 0,06 \text{ cm}^2$). A avaliação anti-secretora do extrato de *Hortia brasiliana* foi realizada utilizando o modelo de ligadura do piloro não apresentando resultados significantes. A ranitidina e o omeprazol foram os fármacos de referência nos estudos de atividade gástrica da espécie analisada. A atividade sequestradora de radicais livres foi realizada mediante a reação do extrato da planta com o radical livre DPPH, as análises permitiram concluir que a planta não possui atividade antioxidante. O ensaio de letalidade utilizando *Artemia salina* sp apresentou DL50 igual a 190 µg/mL permitindo a previsão da potencial atividade citotóxica da planta. Por fim foi realizados estudos sobre a atividade antifúngica do extrato etanólicos da planta, resultando em uma CIM de 256 µg/mL para as espécies de *C. Albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Palavras Chaves: *Hortia brasiliana* , gastroproteção, úlceras gástricas, antifúngico .

ABSTRACT

The *Hortia brasiliiana* Vand. Ex Dc species., popularly known as "paratudo" is commonly used to treat gastrointestinal disorders and wound healing. In this work, we evaluated the gastro-protective activity, healing and toxic properties of *Hortia brasiliiana*. The plant material was collected in the city of Mariana, Minas Gerais, and the voucher specimen was deposited in the Herbarium José Badini Universidade Federal de Ouro Preto. Ethanolic extracts were prepared from the bark of the aforementioned species and initial studies to identify different biological classes of secondary metabolites present in the extract such as alkaloids, steroids, triterpenoids and tannins were performed. The HPLC chromatographic profile suggested the presence of alkali Ruteocarpina. To meet the proposed objectives, a suspension type formulation and nanoemulsion type formulation were both prepared (from ethanol extracts of *Hortia brasiliiana*) and tested for pharmacological activity in animals. The gastric lesions were induced by absolute ethanol and the NSAIDs were treated with both formulations in 3 doses. The induction model using absolute ethanol gave for the suspension of *Hortia brasiliiana* at a dose of 100 mg / kg smaller lesions areas ($0.034 \pm 0,02 \text{ cm}^2$) and lower rates of ulcerative lesions (11.00 ± 1.92). In the case of ulcerating agent indomethacin, smaller lesion areas were formed ($(0.07 \pm 0.02) \times 10^{-2} \text{ cm}^2$) and lower rates of ulcerative lesion (6.83 ± 2.60) for the nanoemulsion-extract formulation at a dose of 100 mg / kg were observed. The model employed for evaluating the potential to heal gastric lesions involves the inducement of ulcers by burning, and using acetic acid as an inducer of injury. The nanoemulsion at 100 mg / kg, lowered the total injured area to $0.04 \pm 0,06 \text{ cm}^2$. The evaluation of the antisecretory properties of *Hortia brasiliiana* extract was performed using the pylorus ligation model which unfortunately did not show any significant results. Ranitidine and omeprazole were the reference drugs used for the gastric activity studies for the species analyzed. The free radical scavenging activity was carried out by the reaction of the plant extract with the free radical DPPH. The analysis concluded that the plant does not have antioxidant activity. The lethality test using *Artemia salina* sp presented LD 50 equal to 190 mg/mL allowing the prediction of potential cytotoxic activity of the plant. Finally, studies on the antifungal activity of ethanolic extract of the plant were conducted, resulting in an MIC of 256 mg / mL for the species *Candida Albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei*.

Keywords: *Hortia brasiliiana*, gastroproteção, gastric ulcers, antifungal.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Hortia brasiliana</i> , flores e inflorescência	19
Figura 2: Distribuição <i>Hortia brasiliana</i> e <i>Hortia oreadica</i>	20
Figura 3: Família Rutaceae Série 3 Tribo Toddalieae Benth. & Hook. Gênero <i>Hortia</i> Vand. <i>Hortia arborea</i> Engl. <i>Hortia brasiliana</i> Vand.	21
Figura 4: Estruturas químicas de <i>Hortia arborea</i>	23
Figura 5: Estruturas químicas de <i>Hortia regia</i>	24
Figura 6: Estruturas químicas de derivados de ácido diidrocinâmico de <i>Hortia colombiana</i> .	25
Figura 7 : Estruturas químicas de <i>Hortia colombiana</i>	26
Figura 8: Estruturas químicas de limonóides <i>Hortia colombiana</i>	26
Figura 9: Anatomia funcional da mucosa gástrica	33
Figura 10: Modelo ilustrando receptores das células parietais e transdução de sinais	37
Figura 11: Diagrama de representação dos fatores de defesa da mucosa.	41
Figura 12: Teste para fenóis e taninos do extrato bruto de <i>Hortia Brasiliana</i> (Mattos 1997) .	79
Figura 13: Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides do extrato bruto de <i>Hortia Brasiliana</i> (Mattos 1997)	80
Figura 14: Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas do extrato bruto de <i>Hortia Brasiliana</i> (Mattos 1997).....	81
Figura 15: Teste para esteróides e triterpenoides do extrato bruto de <i>Hortia Brasiliana</i> (Mattos 1997)	81
Figura 16: Teste para alcaloides do extrato bruto de <i>Hortia Brasiliana</i> (tubo 8) e controle negativo (tubo B) utilizando Reagente de Dragendorff (Mattos 1997)	82
Figura 17: Teste para Teste para alcalóides do extrato bruto de <i>Hortia Brasiliana</i> (tubo 9) e controle negativo (tubo B) utilizando Reagente de Mayer (Mattos 1997).....	83
Figura 18: Perfil cromatográfico obtido por CLAE para o extrato etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> casca. Detecção no UV 254 nm.	84
Figura 19: Espectro Ultravioleta obtido por CLAE do extrato etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> à 344nm.....	84
Figura 20: Perfil cromatográfico obtido por CLAE para o extrato etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> casca. à UV 226 nm	85
Figura 21 Espectro Ultravioleta obtido por CLAE para o extrato etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> à 226 nm	85
Figura 22: Cromatograma obtido por CLAE do extrato metanólico de frutos de <i>Evodia . rutaecarpa</i> à 226nm. Identificação dos picos: (1)-synefrina; (2) rutaecarpina; (3) evodiamina.	85
Figura 23: Espectro Ultravioleta de <i>Rutaecarpina</i> obtido por CLAE do extrato metanólico de frutos de <i>Evodia rutaecarpa</i> (1) em comparação com o UV obtido por CLAE do extrato etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> (2)	86
Figura 24: Gráfico da Atividade Antioxidante do Extrato Etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> (EEHb) e BHA analisados nas concentrações de 60, 120 e 180µg/mL.	87
Figura 25: Gráfico da Cinética de Consumo de DPPH pelo Extrato Etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> (EEHb) e BHA analisados na concentração de 180µg/mL.	87

Figura 26: Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de <i>Hortia brasiliana</i> , em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$	89
Figura 27: Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de <i>Hortia brasiliana</i> , em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$ ** Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$	90
Figura 28: Índice de Lesão Úlcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de <i>Hortia brasiliana</i> , em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$	92
Figura 29: Gráfico representa a Área Total de Lesão do ensaio com formulações do Extrato Etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$	92
Figura 30: Imagens de estômagos do ensaio utilizando formulações de EEHb, ranitidina, omeprazol e veículo em modelo de indução por indometacina .Foto de apenas um estômago por grupo para ilustrar as aparências dos resultados.....	93
Figura 31: Gráfico representa a Área Total de Lesão (em cm ²) do ensaio com frações do extrato etanólico bruto de raízes de <i>Hortia brasiliana</i> em modelo de indução por etanol. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=6). * Diferença em relação ao controle negativo, teste de Dunnet em relação ao grupo controle com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao controle negativo, teste de Dunnet em relação ao grupo controle com $p < 0,001$	97
Figura 32: Gráfico representa Índice de Lesão Ulcerativa do ensaio com formulações do Extrato Etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> em modelo de indução por Etanol . Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$	98
Figura 33: Imagens de estômagos do ensaio utilizando formulações de EEHb, ranitidina, omeprazol e veículo em modelo de indução por Etanol .Foto de apenas um estômago por grupo para ilustrar as aparências dos resultados.....	99
Figura 34: Gráfico Acidez Total (AT, [H+] em mol.L-1), pH da Secreção Gástrica e Volume de Secreção Gástrica (VSG, em mL) do experimento com extrato de raízes de <i>Hortia brasiliana</i> , em modelo de ligadura do piloro. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$	103

Figura 35: Gráficos representativo da Área de Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético do Extrato Etanólico de raízes de <i>Hortia brasiliana</i> . Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: Teste T * Diferença em relação aos grupos com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao grupos com $p < 0,0001$	105
Figura 36: Imagens de estômagos do ensaio utilizando formulações de EEHb, ranitidina, omeprazol e veículo em modelo de indução por Ácido Acético .Foto de apenas um estômago por grupo para ilustrar as aparências dos resultados.....	105
Figura 37: Avaliação por índice da presença de infiltrado inflamatório no fundo da lesão ulcerativa nas lâminas dos estômagos do ensaio com extrato de cascas de <i>Hortia brasiliana</i> , em modelo de indução por ácido acético (n=5). Os valores estão representados pela mediana. Análise estatística entre os grupos: Teste T ..	107
Figura 38: Avaliação da formação de novos vasos em lâminas de estômagos do ensaio com extrato de cascas de <i>Hortia brasiliana</i> , em modelo de indução por ácido acético. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: Teste T * Diferença em relação aos grupos com $p < 0,05$	107
Figura 39: Fotos das lâminas histológicas do ensaio com extrato de <i>Hortia brasiliana</i> , em modelo de indução por ácido acético. Presença de infiltrado inflamatório no fundo da lesão ulcerativa (porção superficial, desprovida de mucosa). O lúmen do estômago encontra-se voltado para a direita. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 5 x.	108
Figura 40: Representação esquemática de (a.) tensoativo, (b.) nanoemulsão O/A e (c.) nanoemulsão A/O.	110
Figura 41: Resultados da CIM de extratos da casca de <i>Hortia brasiliana</i> e o antifúngico Fluconazol	113
Figura 42 Resultados da CIM de extratos da casca de <i>Hortia brasiliana</i> e o antifúngico cetoconazol.....	114

SUMÁRIO

2.1 Gênero <i>Hortia</i>	18
2.2 <i>Hortia brasiliiana</i>	18
Posição taxonômica	19
2.3 Etnofarmacologia	22
2.4 Atividade Biológica dos Metabólitos Encontrados no Gênero <i>Hortia</i>	30
2.5.1 Anatomia Funcional do Estômago	32
2.5.2 Anatomia Neuronal do Estômago	34
2.5.3 Regulação Neuroendócrina da Secreção Ácida Gástrica.	34
2.5.4 Fatores Protetores da Mucosa Gástrica.	40
2.5.5 Aspectos Moleculares na Proteção da Mucosa Gástrica	46
2.5.6 Mecanismos de Reparação da Mucosa Gástrica.	50
2.5.7 Citoproteção da Mucosa Gástrica	51
2.6 Úlcera Péptica	52
2.6.1 Tratamento da Úlcera Péptica.....	54
2.6.2 Limitações e Dificuldade do Tratamento de Úlcera Péptica	55
2.6.3 Química de Produtos Naturais na Terapia da Úlcera Gástrica	56
2.7 Ação Antifúngica de Produtos Naturais	60
3.1 Objetivo Geral:	62
3.2 Objetivos específicos:	62
4.0 Material e Métodos	64
4.1. Material botânico	64
4.1.1 Processos de Secagem.....	64
4.2.1. Obtenção do Extrato.....	65
4.2.2 Prospecções de Constituintes do Extrato Hidroalcoólico de <i>Hortia brasiliiana</i>	66
4.2.3 Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	69
4.2.5 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de <i>Hortia brasiliiana</i>	71
4.2.7 Avaliação da Atividade Tóxica de <i>Hortia brasiliiana</i> em Ensaio de Letalidade Utilizando <i>Artemia salina</i> sp.....	75
5.2 Prospecção de Constituintes Fitoquímicos do Extrato Hidroalcoólico de <i>Hortia brasiliiana</i>	79
5.2.1 Teste para Fenóis e Taninos	79
5.2.2 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides.	80
5.2.3 Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas	80

5.2.4 Teste para Esteróides e Triterpenoides.....	81
5.2.5 Teste para Saponinas	82
5.2.5 Teste para Alcalóides	82
5.3 Perfil Cromatográfico do Extrato Etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> por CLAE.....	83
5.4 Estudo in vitro da Atividade Sequestradora de Radicais Livres	86
5.5 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de <i>Hortia brasiliana</i>	88
5.5.1 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de <i>Hortia brasiliana</i> em Lesões Gástricas Induzidas por Indometacina.	88
5.5.2 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de <i>Hortia brasiliana</i> em Lesões Gástricas Induzidas por Etanol	96
5.5.3 Avaliação da Atividade Anti-Secretora Ácida em Modelo de Ligadura do Píloro	101
5.5.4 Avaliação das Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético	104
5.6 Caracterização Física da Nanoemulsão do Extrato Etanólico de <i>Hortia brasiliana</i> ...	109
5.7 Ensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> sp.....	111
5.8 Avaliação Antifúngica dos Extratos de <i>Hortia brasiliana</i>	112

1.0 Introdução

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folha talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. As plantas são as fontes mais difundidas e importantes de produtos biologicamente ativos, fornecendo estruturas químicas que permitem a pesquisa e descoberta de novos tratamentos para uma grande quantidade de patologias. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas.

Estima-se que cinquenta por cento do total de medicamentos utilizados na clínica médica são derivados de produtos naturais (GURIB, 2006). Portanto nota-se a importância da manutenção e principalmente do estudo e exploração científica da biodiversidade de plantas existentes no planeta.

Um fator importante na pesquisa com plantas medicinais é o estabelecimento de critérios adequados para seleção das espécies vegetais e para se obter sucesso na investigação farmacológica, as informações etnobotânicas são fundamentais. O conceito de etnobotânica abrange o estudo das interações das sociedades humanas com a natureza. Seu caráter interdisciplinar e integrador é demonstrado na diversidade de tópicos que se pode estudar, aliando os fatores culturais e ambientais, bem como as concepções desenvolvidas por essas culturas sobre as plantas e o aproveitamento que se faz delas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esses estudos são fundamentais, pois o acúmulo de informações etnofarmacológicas ao longo do tempo facilita a triagem de estudos permitindo a economia de tempo e dinheiro e valorizando a cultura desenvolvida ao longo do tempo pelas comunidades pioneiras e regionais.

O Brasil é um dos países que possuem uma das grandes fitodiversidades do mundo, portanto esse potencial tem sido aproveitado para a elaboração de novos fitoterápicos. De acordo com a legislação sanitária brasileira, fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (Brasil, 2004a).

Os fitoterápicos sempre apresentaram uma parcela significativa no mercado de medicamentos. O setor movimentava globalmente US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, não existem dados oficiais atualizados, porém, estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano. O fator de atração desse segmento é o ritmo de crescimento das vendas internamente, mais de 15% anuais, contra 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos

sintéticos. Em toda a cadeia produtiva, o setor fitoterápico movimenta anualmente cerca de R\$ 1bilhão (CARVALHO *et al.*, 2008).

Os números de espécies estudadas e registradas na ANVISA indicam haver uma necessidade urgente de investimentos em pesquisa envolvendo a avaliação da atividade terapêutica, da eficácia e da segurança de espécies medicinais brasileiras, e como consequência desses estudos, o desenvolvimento dos fitoterápicos que as contenham. Portanto as políticas apresentadas pelo governo deverão basear suas diretrizes no incentivo à pesquisa e desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicas, priorizando a biodiversidade do país. Além disso, estimular a adoção da Fitoterapia nos programas de saúde pública, pois espera se, com isso, um aumento no número de medicamentos fitoterápicos registrados, principalmente tendo como base as espécies nativas do Brasil.

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1 Gênero *Hortia*

Hortia é um gênero da família Rutaceae, pertencente a sub família Toddalioideae, subtribo Toddaliinae (ENGLER, 1931). O gênero é neotropical com distribuição desde o Panamá até os estados de Minas Gerais e São Paulo, e com grande predominância de espécies na região da Amazônia. O táxon é caracterizado por apresentar hábito arbustivo ou arbóreo, folhas concentradas nos ápices dos ramos, inflorescências avermelhadas do tipo corimbo (ou umbeliformes) terminais, com flores rosáceas e frutos do tipo baga com presença de inúmeras glândulas de óleos (GROPPO *et al*, 2005).

Vandeli em 1788 foi o primeiro botânico a descrever o gênero *Hortia*, utilizando exemplares enviados por Joaquim Veloso de Mirando, correspondente da Real Academia de Ciência (Portugal), porém sem nenhuma espécie a ser classificada por ele. De Candolle (1824), baseando-se nos estudos do gênero feitos por Vandeli, descreveu a espécie como *Hortia brasiliiana* Vand., com exemplares que foram coletadas na região de Minas Gerais e Rio de Janeiro e que possuíam folhas grandes e largas características de espécies arbóreas (GROPPO *et al*, 2005).

Saint-Hilaire em 1824 ao descrever uma espécie arbustiva do cerrado de Góias e do oeste de Minas Gerais classificou como *hortia brasiliiana*. A mesma denominação também foi utilizada por Engler (1874) para classificar espécies arbustivas localizadas na região central do Brasil e uma nova espécie arbórea também foi classificada como *Hortia arborea* Engl. O nome de *H. brasiliiana* é hoje corretamente aplicado a uma espécie arbórea com distribuição mais a leste do Brasil (GROPP *et al*, 2005).

2.2 *Hortia brasiliiana*

Hortia brasiliiana é uma árvore de 4 a 30 m de altura. Possuem flores de cor rósea e consistência coriácea, reunidas em densas inflorescências umbeliformes, terminais, com eixos resistentes. Sua folhas são grandes, simples e lisas de com um comprimento médio de aproximadamente 30 cm (BARBOSA, 1999) (GROPPO, 2010).

É a única espécie do gênero encontrada no leste do Brasil. Ocorre dos estados de Pernambuco e Bahia até o Rio de Janeiro. Ao longo da costa brasileira essa espécie cresce em

Floresta Atlântica (Florestas Ombrófilas e restingas). No interior habita florestas mesófilas do Planalto e florestas submontanas no intervalo da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e Bahia. Pode ser encontrada em altitudes de 50 m.s.m na costa ou em mais de 100 ms.m no interior do país. Esta espécie é muito frequente em Floresta Atlântica de Minas Gerais principalmente na Bacia do Rio Doce (GROPPO *et al*, 2005) (GROPPO, 2010)



Figura 1: Hortia brasiliensis, flores e inflorescência
Fonte :www.tropicos.org/name28100200

Posição taxonômica

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Rosanae Takht.

Ordem: Sapindales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Família: Rutaceae Juss.

Gênero: *Hortia* Vand.

Espécie: *Hortia brasiliensis* Vand. ex DC.

Fonte: www.tropicos.org/name28100200

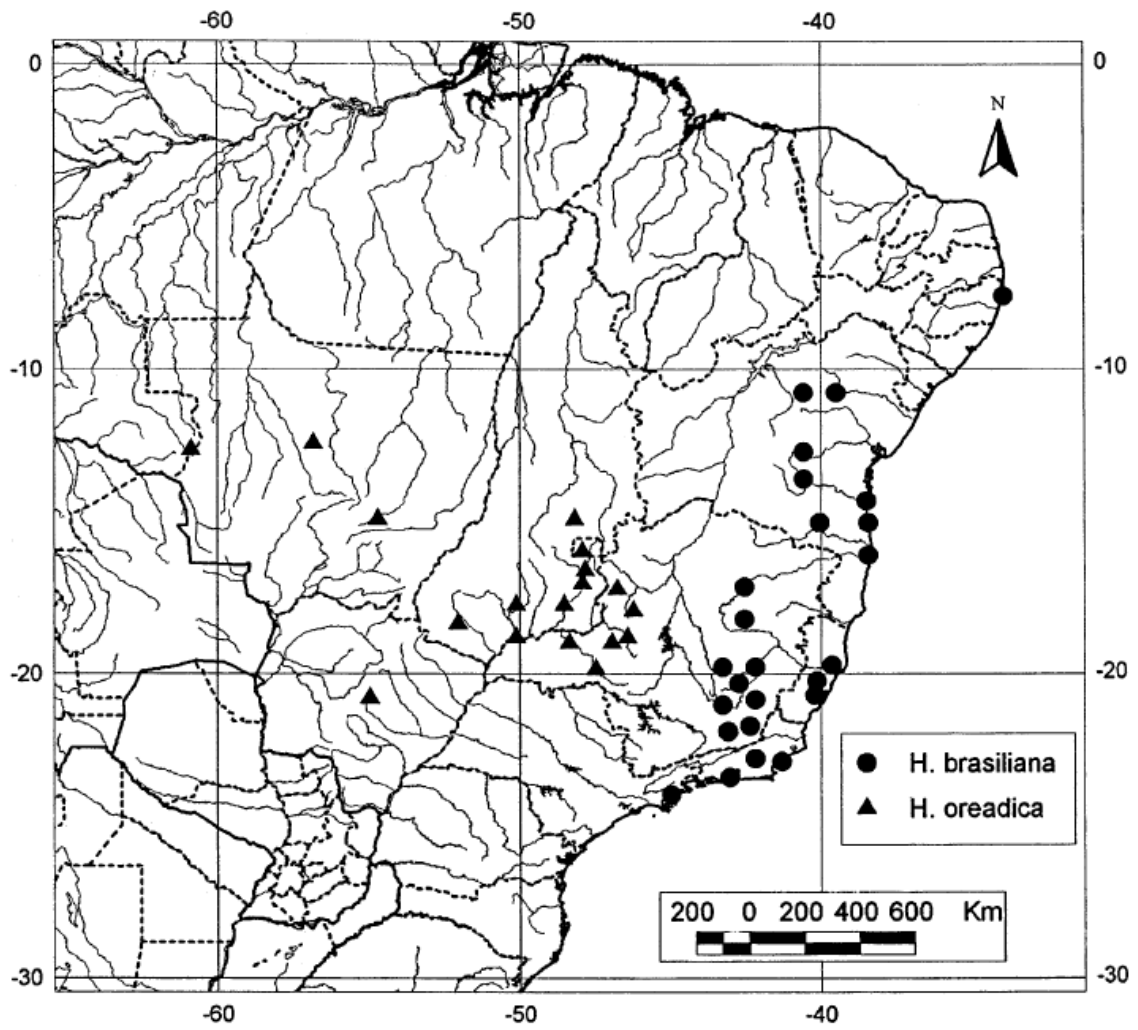


Figura 2: Distribuição *Hortia brasiliana* e *Hortia oreadica*



Figura 3: Família Rutaceae Série 3 Tribo Toddalieae Benth. & Hook. Gênero Hortia Vand. *Hortia arborea* Engl. *Hortia brasiliensis* Vand.

Fonte: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/makepdf>

Vol. XII, Part II, Fasc. 65, Prancha 38. Publicado em 01-Set-1874

2.3 Etnofarmacologia

A família Rutaceae é predominantemente formada por árvores e arbustos tropicais com gêneros de importância em horticulura (*Citrus*), silvicultura (*Chloroxilon*, *Flindersia*, *Zanthoxylum*) e medicina (*Pilocarpus*, *Agathosma*). Consistem de cerca de 1.600 espécies, distribuídas entre 150 gêneros, dentre os quais os mais conhecidos são *Evodia*, *Hortia*, *Zanthoxylum*, *Phellodendron*, *Tetradium*, *Spiranthera*, *Vepris*, *Metrodo*, *Bouchardatia* e *Fagara* com espécies até agora relatada que produzem o alcalóide rutaecarpina. Como o nome do composto indica, as principais fontes do alcalóide quinazolidinico rutaecarpina são as Rutaceae (LEE, *et al.*, 2008).

Poucas informações se encontram registrados na literatura em relação ao uso tradicional e à atividade farmacológica do gênero *Hortia*. O levantamento etnofarmacológico realizado no município de Mariana (MG, Brasil) revelou que a população local utiliza cascas de *Hortia brasiliiana*, conhecida pelo nome popular de “Paratudo” para o tratamento disfunções estomacais e no controle da Diabetes.

Outras espécies do gênero *Hortia*, como *Hortia arbórea*, *Hortia oreadica* e *Hortia badini*, são utilizadas para o alívio dos distúrbios gástricos tendo a mesma denominação de paratudo. Tais atividades biológicas atribuídas a estas plantas estão correlacionadas a presença de compostos químicos, metabólitos secundários, biossintetizados pelas mesmas. Os alcalóides indolopiridoquinazolínico formam um grupo muito específico de compostos encontrados em representantes tropicais da família Rutaceae (D'YAKONOV e TELEZHENETSKAYA, 1997).

O primeiro trabalho encontrado na literatura sobre os constituintes fitoquímicos do gênero *Hortia* foi realizado por Pachter et al (1960). Os estudos mostraram que partes dos alcalóides encontrados foram do tipo indolopiridoquinazolínico e furoquinolínico, típicos da família Rutaceae. Dictamina, Hortiamina, Rutaecarpina, Skimmianina foram os compostos químicos isolados do extrato etanólico de cascas de *Hortia arbórea* (PACHTER *et al.*, 1960).

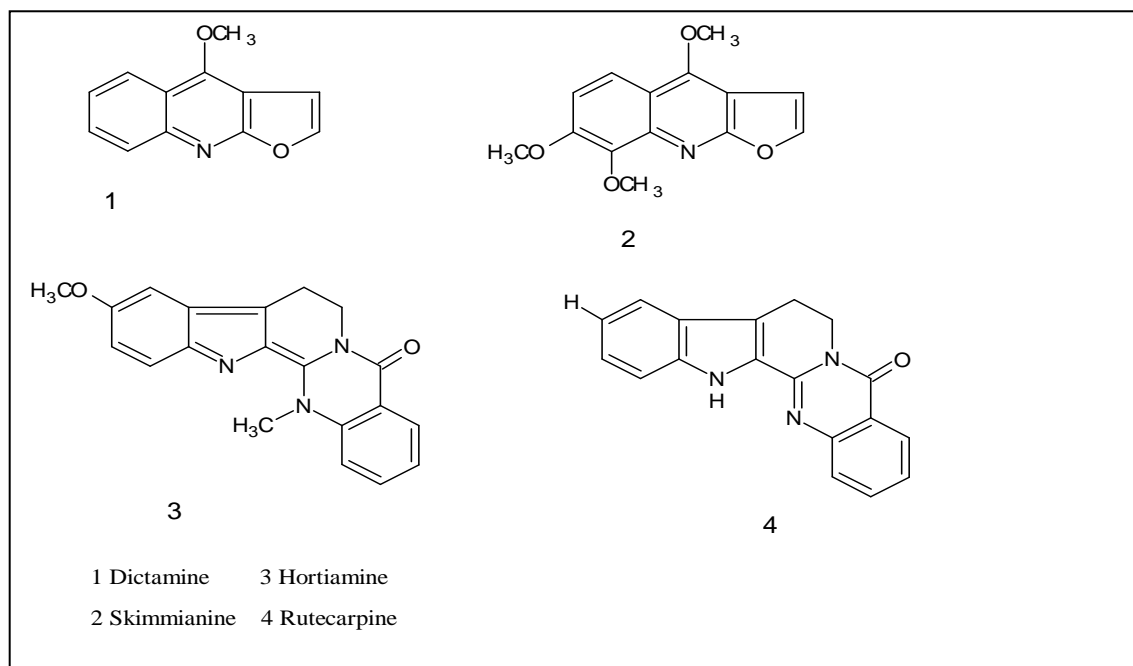


Figura 4: Estruturas químicas de *Hortia arborea*
Fonte : PACHTER, *et al.*, (1960)

Jacob e cols. (1987) isolaram em raízes de *Hortia regia* Sandwith. seis metabólitos secundários pertencentes as classes dos alcalóides, cumarinas e terpenos. As estruturas isoladas e caracterizadas foram os alcalóides rutaecarpina, skimmianina. Também foram encontrados nesse estudo os metabólitos secundários, metil-5-metoxi-2,2-dimetil-1-2H-benzopirano-6-propanoato, o tetranortriterpenoide guianina, 6,7- dimetoxicumarina e por fim o (+)-metil (*E,E*)-10,11-dihidroxi-3,7,11-trimetil-2,6 dodecadienoato.

Através de estudos fitoquímicos realizados no extrato etanólico da mesma espécie estudada por Jacob e cols. (1987) foram isolados e realizado a elucidação estrutural de um novo derivado tiramina, designado hortiamide, juntamente com 5- metoxi-2,2-dimetil-1-benzopirano-6-acido propanóico isolado pela primeira vez. (TINTO, 1992).

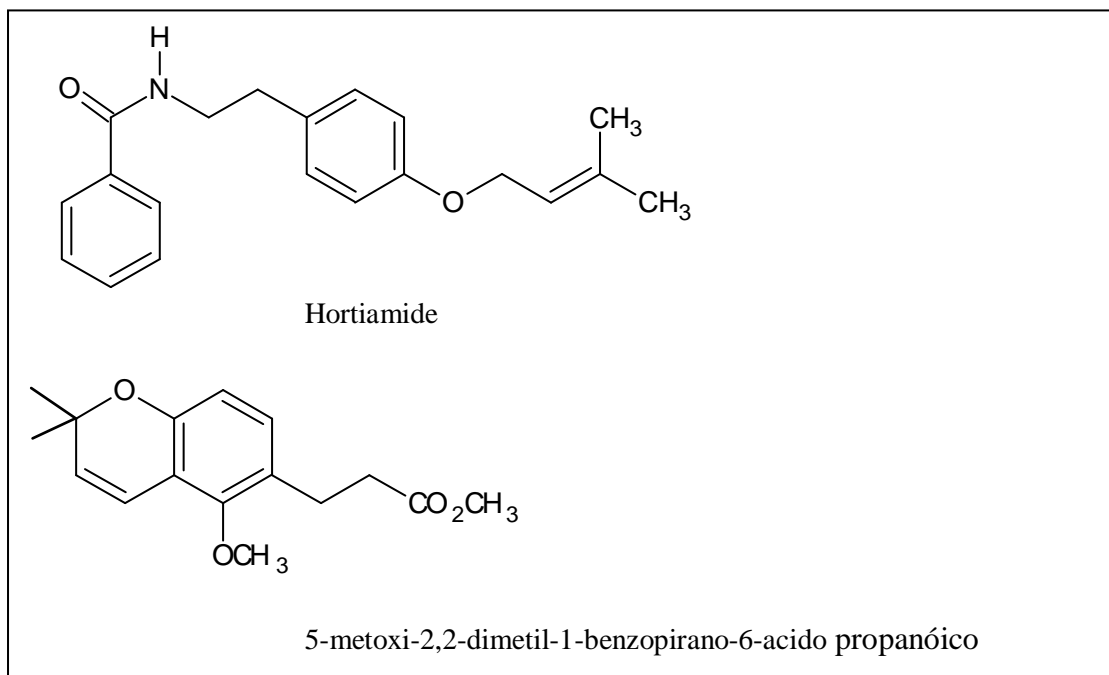


Figura 5: Estruturas químicas de *Hortia regia*
Fonte: (TINTO, 1992)

Dois tetranortriterpenos, sendo um inédito e dois novos derivados do ácido cinâmico foram obtidos da madeira de *Hortia colombiana*. Em adição foram também isoladas as substâncias aloxantoxiletina, nerolidol, epoxinerolidol, três conhecidos derivados do ácido cinâmico e duas amidas (SOARES et al, 2002).

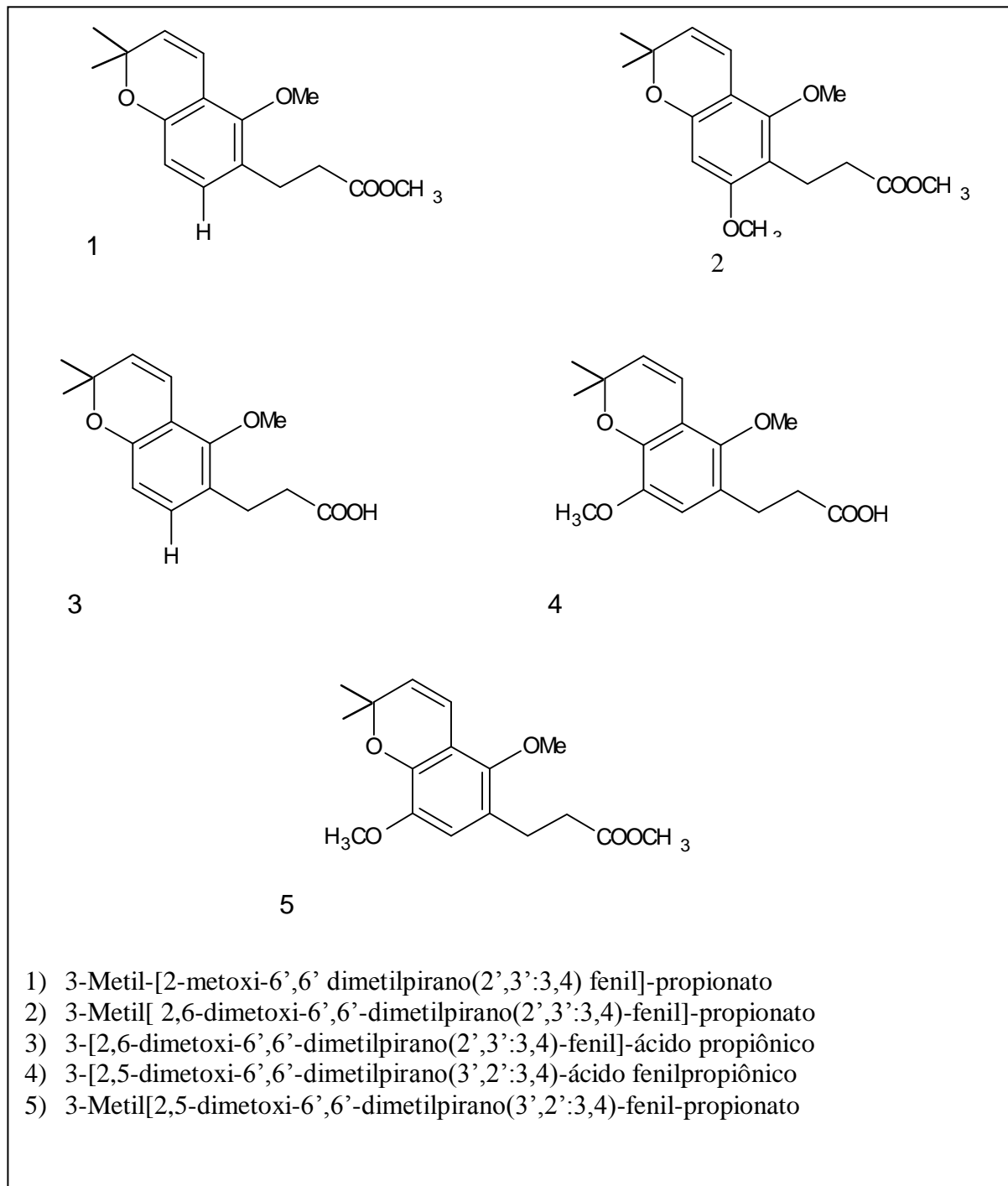


Figura 6: Estruturas químicas de derivados de ácido diidrocínâmico de *Hortia colombiana*
 Fonte : SOARES *et al*, (2002)

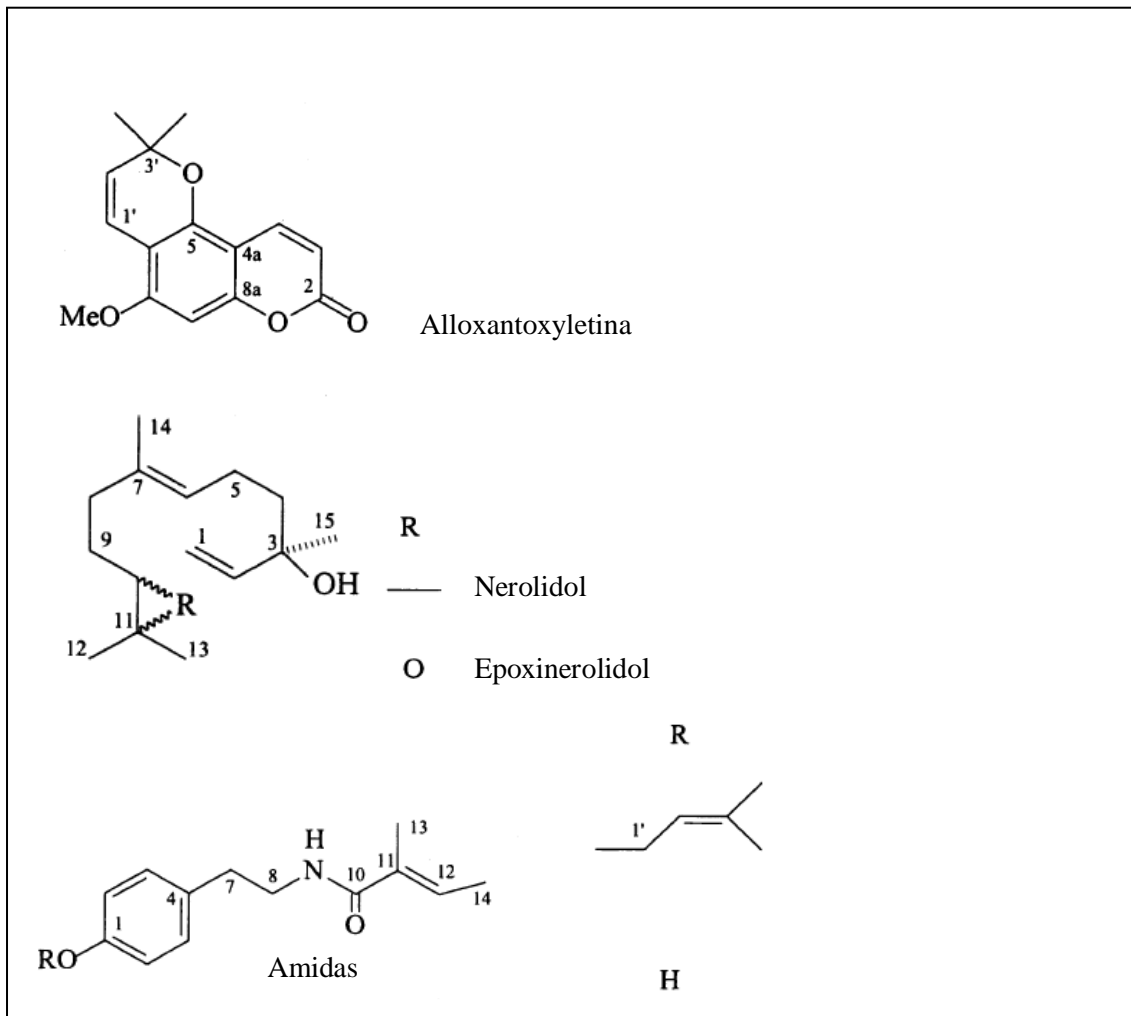


Figura 7 : Estruturas químicas de *Hortia colombiana*
 Fonte : SOARES *et al*, (2002)

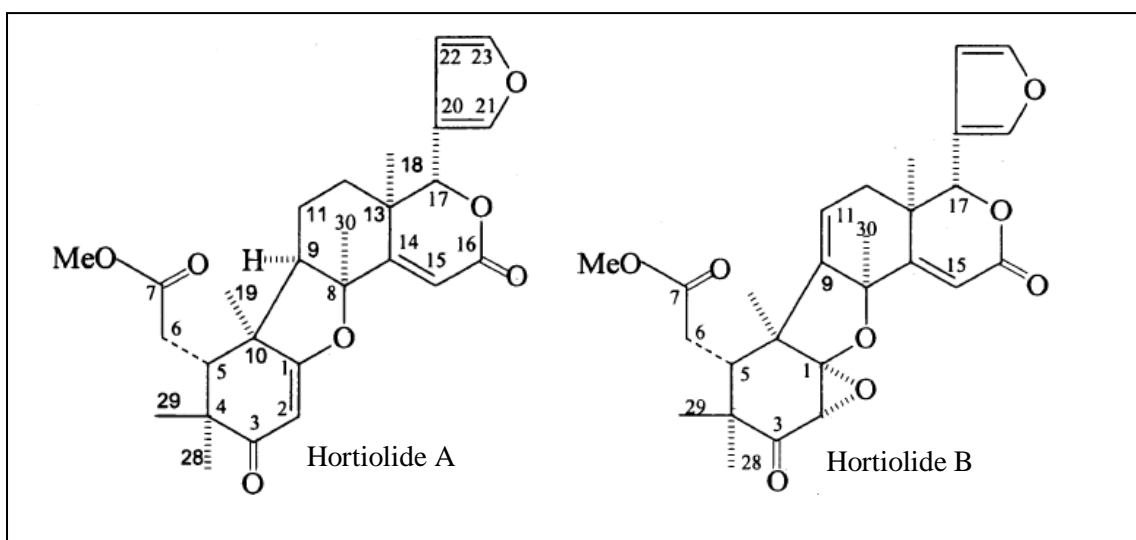
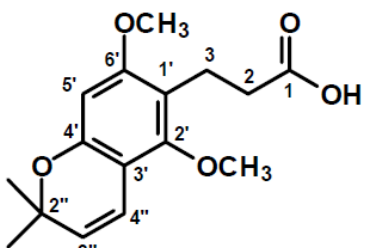
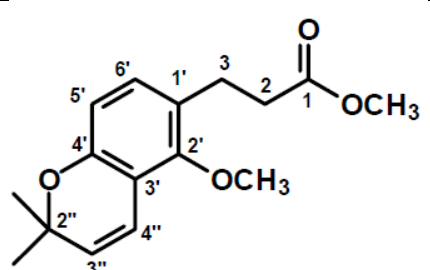


Figura 8: Estruturas químicas de limonóides *Hortia colombiana*
 Fonte : SOARES *et al*, (2002)

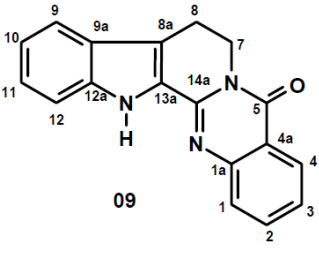
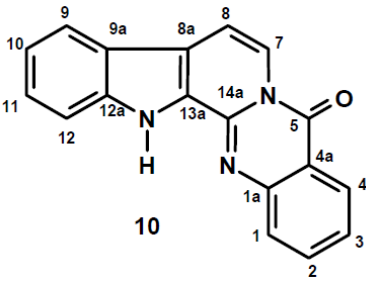
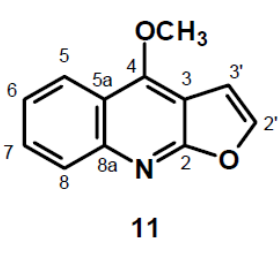
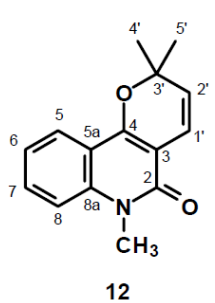
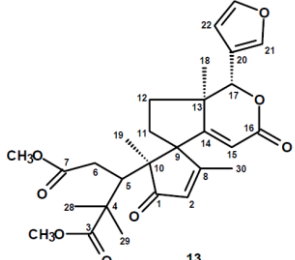
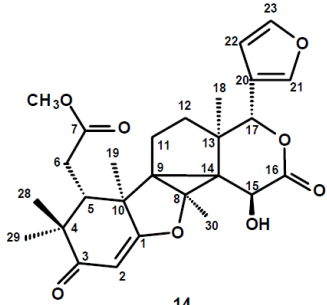
O estudo fitoquímico realizado por Severino *et al*, (2009) com as espécies de *Hortia brasiliiana*, *Hortia oreadica* e *Hortia superba* conduziu ao isolamento de algumas classes de metabólitos secundários como derivados do ácido diidrocinâmico e cinâmico, cumarina, alcalóides e limonóides. Neste trabalho seis derivados do ácido diidrocinâmico, foram isolados sendo que quatro substâncias já descritos na literatura para o gênero *Hortia* e o ácido 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionico inédito para a espécie *Hortia. oreadica*. Também foi isolada uma cumarina, já conhecida na literatura como 5-metoxiseselina, um derivado do ácido cinâmico e dois limonóides.

Neste mesmo estudo foram isolados quatro alcalóides, sendo, dois indolopiridoquinazolínicos (rutaecarpina e 7,8 desidrorutaecarpina), um furoquinolínico (dictamina) e um piranoquinolona (N- metilflindersina). O alcalóide 7,8-desidrorutaecarpina ainda não havia sido relatado para o gênero *Hortia*. Todos os metabólitos isolados estão representados na tabela 1.

Tabela 1 O estudo fitoquímico das espécies de *Hortia brasiliiana*, *Hortia oreadica* e *Hortia superba*

Estrutura	Nome Classe	Espécie encontrada
 <p>01</p>	<p>Ácido 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''dimetilpirano]propionico.</p> <p>Ácido diidrocinâmico</p>	<p><i>Hortia brasiliiana</i> (folhas)</p> <p><i>Hortia oreadica</i> (tronco)</p>
 <p>02</p>	<p>3- fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2'' dimetilpirano]propionato de metila.</p> <p>Ácido diidrocinâmico</p>	<p><i>Hortia brasiliiana</i> (folhas)</p> <p><i>Hortia oreadica</i> (tronco)</p>

<p>03</p>	<p>3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''] dimetilpirano]propionato de metila.</p>	<p><i>Hortia oreadica</i> (folha)</p>
<p>04</p>	<p>3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''] dimetilpirano]propionato de metila.</p>	<p><i>Hortia brasiliiana</i> (folhas)</p>
<p>05</p>	<p>3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-O:5'',6'')-2'',2''] dimetilpirano]propionico</p>	<p><i>Hortia oreadica</i> (tronco)</p>
<p>06</p>	<p>ácido 3-fenil-[2',5'-dimetoxi (3',4'-O:5'',6'')-2'',2''] dimetilpirano]propionico</p>	<p><i>Hortia oreadica</i> (tronco)</p>
<p>07</p>	<p>5-metoxiseselina Cumarina</p>	<p><i>Hortia oreadica</i> (tronco)</p>
<p>08</p>	<p>Ácido 3,4-dimetoxi α(3,4-hidroxi-4 carbometoxifenil)cinâmico</p>	<p><i>Hortia oreadica</i> (tronco)</p>
	<p>Ácido Cinâmico</p>	

Estrutura	Nome /Classe	Espécie encontrada
 <p>09</p>	Rutaecarpina (Alcalóide indolopiridoquinazolínico)	<i>Hortia brasiliana</i> (tronco e folhas) <i>Hortia oreadica</i> (tronco e folhas) <i>Hortia superba</i> (tronco)
 <p>10</p>	7,8-desidrorutaecarpina (Alcalóide indolopiridoquinazolínico)	<i>Hortia oreadica</i> (tronco)
 <p>11</p>	Dictamina (Alcalóide furoquinolínico)	<i>Hortia oreadica</i> (tronco e folhas) <i>Hortia superba</i> (tronco)
 <p>12</p>	N-metilflindersina (Alcalóide piranoquinolona)	<i>Hortia superba</i> (tronco)
 <p>13</p>	Guianina Limonóide	<i>Hortia oreadica</i> (tronco e folhas)
 <p>14</p>	Hortiolida E Limonóide	<i>Hortia oreadica</i> (tronco e folhas) <i>Hortia superba</i> (tronco e folhas)

Fonte : SEVERINO *et al*, (2009)

2.4 Atividade Biológica dos Metabólitos Encontrados no Gênero *Hortia*

A família Rutaceae possui espécies frequentemente utilizadas para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, como dor abdominal, regurgitação ácida, náusea, diarreia, hérnia (Li, 1996). Os estudos fitoquímicos relatam que os alcalóides indolopiridoquinazolínico presentes em espécies desta família, estão relacionados a várias atividades farmacológicas incluindo a atividade gastroprotetora e antiúlcera. Como exemplo, o alcalóide Rutaecarpina isolado na família Rutaceae nos gêneros *Evodia*, *Hortia*, *Zanthoxylum*, *Phellodendron*, *Tetradium*, *Spiranthera*, *Vepris*, *Metrodorea*, *Bouchardatia* e *Fagara* da família Rutaceae (JANUÁRIO, *et al.*, 2000) tem demonstrado possuir diversas ações biológicas, incluindo antiinflamatórios (YAROSH *et al.*, 2006), cardioprotetora (HU *et al.*, 2003), anti-hipertensivos (DENG *et al.*, 2004), antitrombóticas (SHEU *et al.*, 2000) e anti-*Helicobacter pylori* (TOMINAGA *et al.*, 2002).

Estudos realizados em animais demonstraram importantes atividades gastroprotetora dos alcalóides indolopiridoquinazolínico, em especial a Rutaecarpina em lesões induzidas por aspirina e estresse. A sua atividade protetora esta relacionada a um fortalecimento da barreira mucosa e a promoção da síntese de NO (Óxido Nítrico) na mucosa do estômago, regulando a microcirculação da mucosa gástrica, mantendo a integridade desta camada protetora, em colaboração com as prostaglandinas e neurônios sensoriais (Tepperman e Whittle, 1992; Whittle *et al.*, 1990). A estimulação, pelos alcalóides indolopiridoquinazolínico, da liberação de CGRP (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina) endógenos através da ativação dos receptores vanilóides também atua aumentando a síntese de NO. Outro mecanismo referente a proteção promovida pela Rutaecarpina é devido a redução dos níveis da enzima Dimetil Arginina Assimétrica (que é um inibidor endógeno circulante da enzima responsável pela síntese de Óxido Nítrico) estimulando a liberação do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina e de NO (WANG *et al.*, 2005) (XIAO YU, WU, *et al.*, 2006).

Estudos indicaram que Rutaecarpina exerce efeito hipotensor isolado em ratos, dilatando anel aórtico. As ações são em grande parte dependente do endotélio envolvendo fluxos de Ca^{2+} , mobilização e liberação de NO (WANG *et al.*, 1996). Outro provável mecanismo responsável pela hipotensão arterial é devido a ativação no endotélio via Ca^{2+} -óxido nítrico-GMPc reduzindo o tônus de músculos lisos (WANG *et al.*, 1999). Em trabalhos com este metabólito isolado da *Evodia rutaecarpa*, foi avaliado que a capacidade antiinflamatória esta relacionado com a inibição seletiva da enzima Ciclooxigenase-2 (Cox-

2), inibindo a produção de PGD_2 em células da medula óssea de camundongos (MOON *et al.*, 1999).

Outos metabólitos secundários como os alcalóides furoquinolínicos como dictamina, γ -fagarina, skinmianina presentes em plantas do gênero *Hortia*, em experimentos *in vitro* inibiram a atividade da enzima fosfodiesterase 5 (PDE5A), específica para GMPc, sendo responsável pela atividade de hidrólise que sofre o GMPc dentro dos tecidos (NAM *et al.*, 2005).

Extratos brutos de *Hortia oreadica*, forneceram quatro derivados do ácido diidrocinâmico, que foram isolados do extrato *n*-hexânico, bem como as substâncias guianina e dictamina, isoladas do extrato em diclorometano. Os extratos brutos e as substâncias isoladas foram avaliados frente a alguns patógenos bucais com o objetivo de investigar a atividade antibacteriana. Os resultados demonstraram que o limonoide guianina apresentou grau de inibição contra os microorganismos orais *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, e *L. casei*. Este resultado é devido a presença de dois grupos ésteres na estrutura, bem como do anel furano, podendo contribuir para a atividade inibitória do limonóide (SEVERINO *et al.*, 2009). Esta classe de substância é bem conhecida por apresentar muitas funções biológicas, tais como inseticidas, citotóxicas, antiinflamatórias, e atividades antimaláricas (VASANTH e KUNDU, 1991).

O alcaloide furoquinolínico dictamina mostrou interessantes valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra os microrganismos *S. sanguinis*, *S. mutans*, e *L. casei*. A presença do anel furano contribui para a atividade inibitória do alcalóide contra os microrganismos citados, sendo útil para o desenvolvimento de novos agentes que poderiam ser usados para reduzir a cárie dentária e a formação de placa (SEVERINO *et al.*, 2009).

2.5 Fisiologia do Trato Gastrintestinal

O trato gastrointestinal é constituído pelo tubo digestivo e suas glândulas secretoras anexa sendo estruturalmente caracterizado como um tubo muscular derivado do mesoderma com um epitélio especializado se estendendo desde a faringe posterior até o ânus. São responsáveis pela digestão e absorção dos nutrientes, funcionando também como barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o interno. Trata-se de um ambiente dinâmico que permite a entrada de nutrientes enquanto restringe a de antígenos, toxinas e microrganismos, respondendo a agentes potencialmente prejudiciais, num processo de defesa da mucosa. (WALLACE, 2008).

O estômago é delimitado pelos esfíncteres gastro-esofágico (esôfago) e pilórico (duodeno), a mucosa gástrica representa a camada de revestimento interno do estômago compreendendo a maior parte da parede deste órgão. É coberta internamente por uma camada simples de células epiteliais colunares, com núcleos bem desenvolvidos. A maior parte desta camada do estômago é ocupada pelas glândulas gástricas situadas na superfície luminal do revestimento epitelial. Células epiteliais constituem o epitélio de revestimento que cobre a superfície interna do estômago estando em contato direto com o lúmen. Estas células são irregulares com formato de pirâmide e núcleo ovóide, as porções apicais dessas células são ocupadas por densos grânulos que produzem muco. As células principais estão localizadas nas bases das glândulas gástricas, células parietais são grandes em tamanho, de formato esférico ou piramidal, com citoplasma acidófilo e núcleo central e esférico. As células enteroendócrinas são pequenas com formato cônico ou piramidal. O citoplasma dessas células contém grânulos secretores na região basal com núcleos esféricos. (KHATTAB e KHATTAB, 2007)

2.5.1 Anatomia Funcional do Estômago

O estômago é composto por 3 áreas que compõem a estrutura anatômica do órgão (fundo, corpos e antro) e 2 regiões funcionais onde se localizam as glândulas oxínticas e pilóricas. A área onde se localizam as glândulas oxínticas é marcada pela presença das células parietais ou oxínticas, compreendendo 80% do órgão, áreas do fundo e corpos do estômago. Já a região delimitada pela presença das glândulas pilóricas é formada pelas células G produtoras de gastrina que compreende 20% do órgão (antro estomacal) (JOSEPH, *et al.*, 2003).

Alguns autores acreditam que a região da cárdia é uma zona de transição de 0-9 milímetros entre a mucosa do esôfago e a mucosa oxíntica do estômago, existindo como uma região anatômica normal ou área que se desenvolveu como resultado de refluxo gástrico anormal. Autópsia e estudos endoscópicos sugerem que mucosa da cárdia está ausente em mais de 50% da população (CHANDRASOMA, 2005).

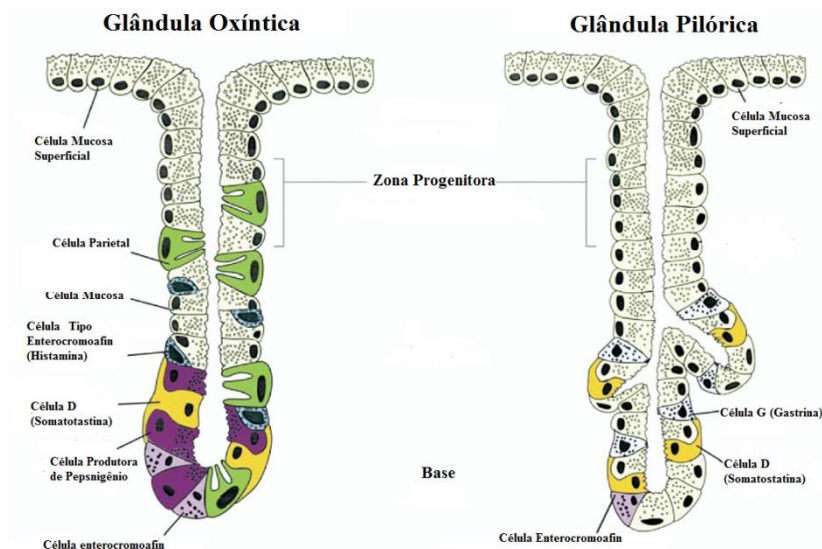


Figura 9: Anatomia funcional da mucosa gástrica

Fonte: (SCHUBERT, 2011)

A área da glândula oxíntica é formada por unidades tubulares verticais que consistem em uma região apical, um istmo e a área glandular propriamente dita está localizada na região inferior da unidade. As células progenitoras da unidade gástrica, localizadas no istmo, dão origem a todas as células epiteliais gástricas. As células produtoras de muco migram para o lúmen gástrico, acima das células progenitoras. Em contrapartida, as células parietais secretoras de ácido migram para porções inferiores e médias da glândula oxíntica. Em ratos e humanos células zimogênicas estão localizadas predominantemente na base das glândulas e secretam pepsinogênio e leptina, também secretada por células parietais (JIANG, *et al.*, 2002) (BADO, *et al.*, 1998).

Célula neuroendócrina produz uma série de agentes de sinalização hormonal e parácrina presentes dentro da glândula com as seguintes funções fisiológicas: (1) Células Enterocromafins (CE) produtoras do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), serotonina e adrenomedulina; (2) Células Enterocromafins-Like (ECL) produtoras de histamina, (3) Células D produtoras de somatostatina e amilina e (4) Células Gr produtoras de grelina e obestatina. Células D produtoras de somatostatina possuem prolongamentos citoplasmáticos que terminam nas proximidades das células parietais e células enterocromafins-like (ECL). Este acoplamento anatômico está relacionado funcionalmente com a restrição direta exercida pela somatostatina sobre a secreção de ácido ou indireta inibindo a secreção de histamina. Células D produtoras de Somatostatina também estão presentes nas glândulas pilóricas, nesta região, elas exercem uma inibição parácrina sobre a secreção de gastrina a partir das células G. A glândula pilórica também contém células enterocromafins (CE) produtoras do peptídeo

natriurético atrial (ANP), células Gr (produtoras grelina e obestatina), e células endócrinas (SCHUBERT e PEURA, 2008).

2.5.2 Anatomia Neuronal do Estômago

O estômago é inervado por uma rede neuronal denominada de Sistema Nervoso Entérico (SNE), formado por neurônios intrínsecos eferentes e neurônios extrínsecos aferentes. Em ratos, a maior parte da inervação intrínseca neural do estômago se origina no plexo mioentérico, o plexo submucoso contém apenas um pequeno número de neurônio. Em seres humanos, o plexo submucoso é claramente definido. O nervo vago contém 80% a 90% das fibras aferentes e apenas 10% a 20% de fibras eferentes. As fibras eferentes são pré-ganglionares e controlam as células parietais ou células neuroendócrinas através de sinapses com neurônios pós-ganglionares do SNE. Os neurônios pós-ganglionares contêm uma variedade de transmissores, incluindo a Acetilcolina (ACh), Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP), Polipeptídeo Intestinal Vasoativo (VIP), Ciclastase Pituitária Ativando-Polipeptídeo (PACAP), Óxido Nítrico e Substância P (SMITH, *et al.*, 2001).

No estômago de ratos e humanos, as fibras nervosas contendo peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) são de origem extrínseca, ou seja, os corpos celulares estão localizados fora do estômago. Neurônios pós-ganglionares do SNE regulam a secreção ácida diretamente através da liberação de ACh, e ou indiretamente, modulando a secreção de gastrina a partir das Células G, somatostatina pelas Células D, histamina produzidas pelas células ECL e do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) a partir de Células Enterocromoafins (GREEN e DOCKRAY, 1988)(SCHUBERT e PEURA, 2008).

2.5.3 Regulação Neuroendócrina da Secreção Ácida Gástrica.

Uma variedade de sinais neuroendócrinos, parácrinos e endócrinos bem como produtos químicos luminal regulam a secreção de ácido gástrico incluindo a gastrina, histamina, a grelina, o glutamato, Peptídeo Ativador da Adenilato-Ciclase (PACAP) e somatostatina. A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo e complexo controlado por múltiplos fatores centrais (neurais) e periféricos (endócrino e parácrino). Cada fator se refere a um evento fisiológico final comum, a secreção de H⁺ pelas células parietais, as quais estão localizadas no corpo e o fundo gástrico. Os fatores neuronais (acetilcolina), parácrinos

(histamina) e endócrinos (gastrina) desempenham papéis importantes na regulação da secreção ácida. Seus respectivos receptores específicos (receptores M_3 , H_2 , CCK_2) foram identificados anatomicamente e ou farmacologicamente na membrana basolateral da célula parietal. Existem duas vias principais de sinalização da célula parietal: a via dependente do AMP cíclico e a via dependente de Ca^{2+} . A histamina utiliza a primeira via, enquanto a gastrina e a acetilcolina exercem seus efeitos por meio da última. A via dependente do AMP cíclico resulta na fosforilação das proteínas efetoras da célula parietal e a via dependente do Ca^{2+} leva a um aumento do Ca^{2+} citosólico. Ambas as vias ativam a H^+,K^+ -ATPase (a bomba de próton) resultando na secreção ácida estomacal (SCHUBERT, 2004) (DONGB e KAUNITZ, 2006).

2.5.3.1 Histamina

Histamina, produzida em células ECL pela descarboxilação de L-histidina pela enzima Histidina Descarboxilase (HDC), estimula diretamente a célula parietal ligando-se a receptores H_2 acoplados à ativação da Adenilato Ciclase e geração de AMPc. A histamina também estimula a secreção de ácido indiretamente através da ligação aos receptores H_3 inibindo a somatostatina e portanto estimulando a secreção de ácidos pela liberação de histamina. A estimulação da secreção de histamina é realizada pela Gastrina, PACAP, VIP e grelina, enquanto que a somatostatina, CGRP, prostaglandinas, peptídeo YY (PYY) e galanina inibem sua secreção. ACh não tem efeito direto sobre a secreção de histamina (SCHUBERT e PEURA, 2008).

2.5.3.2 Gastrina

Gastrina, produzida pelas células G, das glândulas pilórica, estimula a secreção de ácido gástrico e o crescimento das células da mucosa. Gastrina é secretada em resposta a agentes químicos (pH e proteína) e mecânica (distensão). Estímulos que atuam diretamente sobre a célula G ou indiretamente via liberação de mensageiros de células neuroendócrinas adjacentes e neurotransmissores do sistema nervoso entérico. As ações de gastrina são mediadas principalmente pela ativação dos receptores $CCK-2$, receptor acoplado a proteína G ou receptor de gastrina. Gastrina estimula secreção ácida principalmente pela liberação de histamina pelas Células ECL (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Gastrina e colecistoquinina (CCK) possuem uma sequência carboxi-terminal pentapeptídica idêntica (-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂). Essas duas classes possuem receptores caracterizados como CCK-1 e CCK-2. Receptores CCK-1 são específicos para colecistoquinina, enquanto receptores CCK2 reconhecem tanto a colecistoquinina (CCK) como a gastrina com alta afinidade para ambas. Os receptores CCK2 foram identificados em humanos nas células parietais e células enterocromoafins (ECL), onde são acoplados a ativação da fosfolipase C acarretando a liberação de cálcio intracelular (KULAKSIZ, *et al.*, 2000) (TARI, *et al.*, 1997.).

Acredita-se que a ação principal da gastrina na célula parietal é devido a sua sensibilização em outros secretagogos através de sinalização cruzada ou interação sinérgica entre as vias de sinalização. Ativação do receptor CCK-2 na célula ECL com a liberação de histamina é atualmente considerada a principal via pela qual gastrina estimula a secreção de ácido. Gastrina regula a secreção e síntese de histamina por um padrão bifásico. A primeira fase envolve liberação de histamina armazenada. A segunda fase refere-se envolve uma aumento na atividade e expressão da Histidina Decarboxilase (HDC), enzima responsável pela produção de histamina pela descarboxilação da L-histidina (ZANNER, *et al.*, 2002).

ACh, Peptídio Liberador de Gastrina (GRP), secretina, agonistas de receptores adrenérgicos β_3/β_2 , cálcio, aminoácidos aromáticos e bebidas alcoólicas produzidas por fermentação estimulam, enquanto que a somatostatina, galanina e adenosina inibem a secreção de gastrina. Além dessas substâncias, pelo menos dois caminhos regulam a sua secreção. O primeiro é mediado via liberação de somatostatina, ativada pelo pH intragástrico baixo ativando os neurônios CGRP estimulando a secreção de somatostatina que inibirá a secreção de gastrina. O segundo envolve uma via parácrina qual gastrina estimula diretamente somatostatina e assim atenua sua própria secreção (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Gastrina é também um hormônio trófico, receptores CCK2 foram localizados na área progenitora das glândulas oxínticas. A hipergastrinemia crônica induz a proliferação direta de células enterocromoafins e de células parietais, através do ação autócrina ou parácrina de fatores de crescimento, tais como heparina de ligação do fator de crescimento epidérmico, fator amfiregulina, fator α de crescimento transformador, metaloproteinases. Gastrina atua diretamente nas células ECL para induzir hiperplasia, displasia e, finalmente, neoplasia exclusiva em roedores (JAIN e SAMUELSON, 2006).

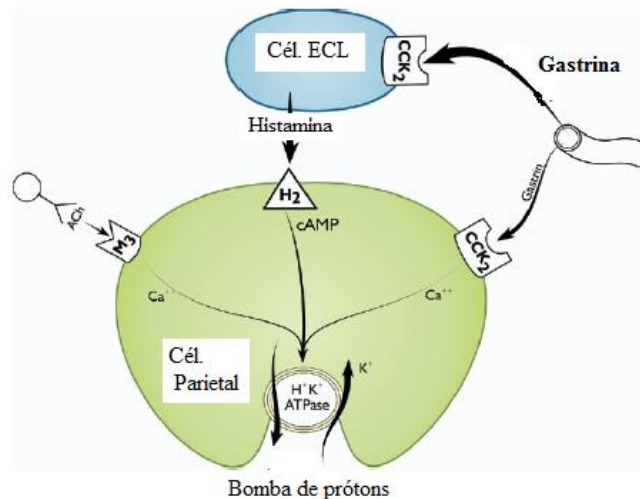


Figura 10: Modelo ilustrando receptores das células parietais e transdução de sinais
 Fonte: (SCHUBERT, 2011)

2.5.3.3 Grelina

A grelina é um hormônio gastrointestinal identificado no estômago do rato, em 1999, por Kojima et al. Foi primeiramente, isolada da mucosa oxíntica do estômago, produzida predominantemente, pelas células Gr do trato gastrointestinal e em menores quantidades pelo sistema nervoso central, rins, placenta e coração. Dentre as ações periféricas do ligante natural do receptor GHS, destacam-se a estimulação da secreção ácida e mobilidade gástrica em ratos e o esvaziamento gástrico em humanos (SILVA, *et al* 2008).

Além dos constituintes dos alimentos, a secretina, estimulação vagal, estimulação elétrica gástrica e endotelina 1 e 3, estimulam a secreção de grelina, sendo esta inibida pela gastrina, somatostatina, colecistoquinina, insulina e L-glutamina. Pacientes infectados por *Helicobacter pylori* apresentam baixos níveis de grelina circulante e alguns estudos relatam um aumento na circulação grelina após a erradicação da bactéria (SCHUBERT, 2011).

2.5.3.4 Acetilcolina (Ach)

A acetilcolina (ACh), liberada dos neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso entérico (SNE) estimula diretamente a secreção de ácido através da ativação dos receptores M_3 presentes nas células parietais. A via de sinalização dos receptores M_3 assim como os receptores CCK2 ativam fosfolipase C, com a geração de trisfosfato de inositol e liberação de cálcio intracelular. ACh também estimulam a secreção ácida indiretamente ativando receptores

M₂ e M₄ das células D inibindo a secreção de somatostatina, eliminando assim a restrição exercida por esse peptídeo sobre a gastrina, células enterocromoafins (ECL) e células parietais (SCHUBERT e HOU, 2007).

2.5.3.5 Glutamato

O aminoácido glutamato atua como um neurotransmissor excitatório no SNC dos mamíferos, ativando seus receptores NMDA e cainato, após administração intra cérebro ventricular, estimulando a secreção ácida gástrica (SCHUBERT, 2002). Glutamato é um dos aminoácidos mais abundantes nos alimentos, recentemente foi revelado que o glutamato da dieta possui funções no trato gastrointestinal. Em experimentos utilizando ratos foi demonstrado, em culturas primárias de células D da mucosa gástrica, que as células secretoras de somatostatina são células candidatas a detecção de glutamato no estômago. Considerando-se que a somatostatina é um dos principais reguladores negativos das funções gástrica, sugere-se que partes dos efeitos do glutamato no estômago pode ser explicado pela supressão dos efeitos inibitórios da somatostatina, estimulando a secreção gástrica. O glutamato atua como um agonista para os receptores sensoriais T1R1/T1R3 e receptores metabotrópicos (mGluRs) (NAKAMURA, *et al.*, 2011).

2.5.3.6 Somatostatina

No estômago, as células secretoras de somatostatina estão intimamente acopladas a suas células-alvo(células parietais, células enterocromoafins e células de gastrina) seja diretamente através de processos citoplasmáticos ou indiretamente via circulação local. Somatostatina presente nas células D da mucosa gástrica oxíntica e pilórica inibe diretamente a secreção de ácido de uma forma parácrina, a partir das células parietais. A ação indireta é realizada pela inibição da secreção de histamina pelas Células Enterocromoafins (ECL) e secreção de gastrina, a partir das Células G. As ações inibitórias na secreção gástrica da somatostatina são mediadas pela ligação aos receptores acoplados à proteína G, em cinco subtipos, conhecidos como SSTR1 a SSTR5. (SAMUELSON e HINKLE, 2003).

Gastrina, Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP), Peptídeo Vasoativo Instestinal (VIP), Peptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária (PACAP), agônistas α/β adrenérgicos, Secretina, Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), Adrenomedulina, Amilina, Adenosina e

Peptídeo Relacionado ao Gene da calcitonina (CGRP) estimulam, enquanto que a ACh e o Interferon- γ inibem a secreção de somatostatina. Com um aumento da acidez luminal a via envolvendo a liberação de somatostatina age para atenuar a secreção ácida nas regiões do antro e fundo gástrico (SCHUBERT, *et al.*, 1988) (SCHUBERT e PEURA, 2008).

2.5.3.7 Peptídeo Relacionado ao Gene Calcitonina

O Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) é um neuropeptídeo com 37 aminoácidos que é codificada produtos do Gene da Calcitonina. Pertence a esta família de peptídeos a Adrenomedulina (AM), Amilina e a Calcitonina. Embora estes peptídeos não têm um alto nível de homologia de aminoácidos, eles compartilham várias atividades biológicas. No estômago, o CGRP está contido nas terminações periféricas dos nervos aferentes sensíveis a capsaicina. Quando ácido gástrico e outros produtos químicos nocivos, como a capsaicina, entram em contato com a mucosa gástrica o CGRP é liberado a partir das terminações nervosas, exercendo diversos efeitos biológicos. CGRP tem efeitos gastroprotetor da mucosa em lesões experimentais induzidas por etanol, indometacina e aspirina. Em estudos realizados em ratos, os efeitos gastroprotetores estão relacionados com aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica por meio de aumento da produção de óxido nítrico (HOLZER e GUTH, 1991) (KAWASHIMA, *et al.*, 2002).

Receptores de CGRP foram identificados nas células D nas glândulas da mucosa antral e oxíntica e estimulam a produção e secreção de somatostatina. Portanto o CGRP protege a mucosa gástrica de uma maneira direta induzindo a secreção de somatostatina ou de uma forma indireta induzindo a inibição de liberação de gastrina e histamina, inibindo a secreção ácida gástrica (KAWASHIMA, *et al.*, 2002).

2.5.3.8 Regulação Intracelular de ácido gástrico

As células parietais secretam HCl devido a ação da enzima H^+,K^+ -ATPase que atua como uma bomba de prótons, responsável pela secreção ácida gástrica. Esta ação envolve a elevação dos níveis intracelulares de cálcio e AMPc, seguido pela translocação da bomba de prótons (H^+,K^+ -ATPase) das vesículas tubulares citoplasmáticas para a membrana apical da célula parietal (HOU e SCHUBERT, 2006)

No estado de repouso, esta enzima se localiza nas membranas citoplasmáticas tubulares e quando ativadas migram para as microvilosidades do canalículo secretor das células parietais. Essa mudança morfológica do canalículo é assumida como resultado da fusão de vesículas citoplasmáticas com microvilosidades formando as microvilosidades alongadas, expandindo o canalículo secretor. Uma vez que a enzima se move para o canalículo, a enzima secreta ácidos pela troca de H^+ citoplasmática pelo K^+ extracelular. A H^+,K^+ -ATPase é formada por uma subunidade α que contém o sítio catalítico e uma subunidade β necessária para direcionamento da enzima para a membrana apical tendo um papel importante na conformação estrutural e funcional da bomba de prótons (H^+,K^+ ATPase). Na ausência do estímulo, as bombas são recicladas de volta para o compartimento citoplasmático. (SHIN, *et al.*, 2009) (SCHUBERT, 2011) (SACHS e SHIN, 1995).

A atividade fisiológica da bomba H^+,K^+ ATPase está sujeita à modulação (estimulação e inibição) por sinais moleculares neuronais e endócrinos, como acetilcolina, gastrina, histamina e somastatina (TYAGARAJAN, *et al.*, 1995) (ESPLUGUES, 2005).

2.5.4 Fatores Protetores da Mucosa Gástrica.

O estômago é o órgão que possui um ambiente extremamente ácido devido a quantidade elevada de ácido clorídrico resultando em um pH entre 0,9 e 2,0. Esse ambiente, além de ser necessário para digestão, desempenha um papel importante na proteção do organismo, impedindo entrada de muitos agentes infecciosos. No entanto, isso faz com que a mucosa estomacal fique exposta à ação do ácido clorídrico e da pepsina, responsáveis pelo processo de digestão. (BIGHETTI, *et al.* 2002).

Além dos fatores fisiológicos o trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões. Estes estímulos podem vir devido ao uso de bebidas alcoólicas, fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), alimentos em diferentes temperaturas, infecções pelo *Helicobacter pylori*, lesões relacionadas a isquemia e reperfusão e fatores endógenos fisiológicos, como a produção de ácido gástrico induzida pelo estresse acarretando alterações da mucosa. Em contrapartida a estes estímulos nocivos, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores de proteção que caracterizamos como fatores de proteção pré-epitelial, epitelial e subepitelial (DONG e KAUNITZ, 2006).

A mucosa estomacal apresenta-se como uma barreira dinâmica, permitindo a passagem de certos íons e moléculas no corpo e restringindo a entrada de determinado conteúdo. Esta

formas de muco gástrico, mucina solúvel presente no suco gástrico, o muco (aderente) insolúvel cobrindo as células da mucosa e presente nas células secretoras de muco, dispostas entre as células apicais e ação das glicoproteínas presentes no muco confere a ele uma ação antioxidante (MOJZIS *et al.*, 2000).

A produção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo a gastrina e secretina, bem como agentes colinérgicos, prostaglandinas especialmente a PGE₂ (MONTROSE *et al.*, 2006).

2.5.4.2 Íons bicarbonato

A secreção de íons bicarbonato (HCO₃⁻) formando uma camada de gel estável, aderente ao muco é a primeira linha de defesa da mucosa contra o ácido luminal, criando um gradiente de pH neutro na superfície epitelial no estômago e do duodeno (ALLEN e FLEMSTRÖM, 2005) (ATUMA *et al.*, 2001). No estômago, as prostaglandinas PGE₂ estimulam a secreção de HCO₃⁻ através dos receptores EP1. A barreira de muco-bicarbonato é a única barreira entre o lúmen pré-epitelial e epitélio. Quando este fator de proteção é sobrecarregado ou destruído, as próximas séries de mecanismos de proteção entram em jogo, incluindo a neutralização do ácido intracelular, rápida reparação epitelial, manutenção e distribuição do fluxo sanguíneo da mucosa (TAKEUCHI *et al.*, 2006).

Ao longo do trato gastrointestinal, a mucosa apresenta-se como uma barreira dinâmica dentro do hospedeiro, permitindo a passagem de certos íons e moléculas no corpo e restringindo a entrada de outro conteúdo. Esta manutenção da função de barreira não somente uma barreira física- anatômica, se trata também de uma série consecutiva de mecanismos de defesa, cada um deles finamente regulado (FLEMSTRÖM e ISENBERG, 2001).

2.5.4.3 Hidrofobicidade da mucosa gástrica e junções intercelulares

As células epiteliais da superfície formam uma barreira que impede o retorno do ácido gástrico e pepsina que foi secretado impedindo a sua difusão para esta camada de células. Foi demonstrado que o muco que reveste as células da superfície do epitélio contém fosfolípides bipolares que, devido à elevada polaridade, previnem a retrodifusão de ácidos minerais, como ácido clorídrico (HCl), da luz do estômago para o interior da mucosa. Porém, compostos orgânicos não-ionizados, como sais biliares ou ácido acetilsalicílico, que têm pKa

relativamente baixo, podem alcançar rapidamente, por difusão não-iônica, as células da superfície da mucosa e se acumularem no interior dessas células, onde são dissociados e provocam lesão celular. Por causa da presença de fosfolipídios em suas superfícies, as células epiteliais de superfície se tornam hidrofóbicas, repelindo íons H^+ solúveis em água. (LICHTENBERGER, 1999).

2.5.4.4 Proteínas de Choque Térmico

A próxima linha de defesa da mucosa é formada por uma camada contínua de células da superfície epitelial que são responsáveis por gerarem as Proteínas de Choque Térmico, peptídeos do fator trefoil e as catelicidinas, substâncias envolvidas no mecanismo de proteção epitelial. Proteínas de choque térmico são cruciais para a manutenção da homeostase celular durante o crescimento normal das células e para a sobrevivência durante situações de estresses celulares, são células epiteliais gástricas geradas em resposta ao estresse oxidativo, agentes citotóxicos e ao aumento de temperatura do epitélio, evitando a desnaturação de proteínas e protegendo as células contra lesões. O imediato reparo na mucosa gástrica é mediado pelos peptídeos Trefoil, uma família de proteínas abundantemente expressas em células da mucosa gastrointestinal que protegem o epitélio inibindo a apoptose e inflamação, estimulando a migração celular e aumentando a barreira de proteção de muco (BABYATSKY *et al.*, 1996).

Catelicidinas e defensinas são importantes peptídeos antimicrobianos expressos pelo epitélio gastrointestinal que desempenham importante papel no sistema de defesa inata da superfície da mucosa prevenindo a colonização bacteriana acelerando a cicatrização da úlcera. (YANG *et al.*, 2006).

2.5.4.5 Maré Alcalina

Outro mecanismo de proteção da mucosa gástrica acontece quando as células parietais ao liberar os íons H^+ , simultaneamente transportam íons bicarbonato pela membrana basolateral através da troca Cl^-/HCO_3^- , que resulta numa maior disponibilidade de íons bicarbonato. Além disso, para cada íon H^+ secretado pela célula parietal, uma molécula de CO_2 é convertida em bicarbonato pela anidrase carbônica, aumentando a secreção alcalina na superfície de células epiteliais, provocando o que se conhece como maré alcalina após a secreção de ácido gástrico. (ALLEN e FLEMSTRO, 2005)

2.5.4.5 Migração e Renovação Celular

Uma outra característica que faz com que o epitélio gástrico seja resistente a injúria é a contínua renovação de células a partir de células progenitoras da mucosa, mantendo a integridade estrutural desta camada e conferindo habilidade de reparação ao dano epitelial. O epitélio gástrico é renovado a cada 2-4 dias por uma coordenada e controlada proliferação de células progenitoras que permite a substituição das células epiteliais de superfície que estão danificadas ou envelhecidas. Substituição desta camada superficial normalmente leva 3-7 dias, enquanto as células glandulares são necessários meses para substituí-las. A capacidade de substituir as células mais velhas, sem que haja uma ruptura significativa na função de barreira pode ser atribuído ao processo de apoptose e extrusão de células que são expulsas para o lúmen se juntando ao muco (MODLIN *et al*, 2003). (WALLACE, 2001).

2.5.4.6 Fatores de Crescimento

A proliferação celular de células progenitoras é controlada por fatores de crescimento. O principal receptor do fator de crescimento expressa em células progenitoras gástricas é o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) receptor (EGF-R) (TARNAWSKI *et al*, 1992) (HRITZ *et al*, 2005). Os principais fatores de crescimento mitogênicos que ativam EGF-R é o Fator de Crescimento Transformador (TGF- α) e Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-1 (IGF-1) (NGUYEN *et al*, 2007). Gastrina e a prostaglandina E₂ (PGE₂) também atuam na ativação do EGF-R estimulando a proliferação celular e exercendo uma ação trófica sobre a mucosa gástrica (PAI *et al*, 2002).

A proteína anti-apoptose survivina, promove a mitose e a sobrevivência da célula. A expressão da survivina em células progenitoras gástrica permite que essas células evitem a apoptose promovendo o processo mitótico (CHIOU *et al*, 2005) (JONES *et al.*, 2008). Os fatores de crescimento epitelial também têm importância na proteção a mucosa gástrica. O TNF- α é uma citocina produzida durante a lesão da mucosa gástrica. TNF- α esta relacionada a lesões gástricas associada ao *H. pylori* e ao uso de AINEs. TNF- α também pode promover a reparação da mucosa através da estimulação da proliferação de células epiteliais (KOSONE, *et al.*, 2006)

2.5.4.7 Microcirculação

Microcirculação da mucosa é essencial para a entrega adequada de oxigênio e nutrientes e para a remoção de substâncias tóxicas. As células endoteliais que revestem os microvasos do epitélio gástrico produzem potentes vasodilatadores, tais como Óxido Nítrico (NO) e a Prostaciclina (PGI₂), que protegem a mucosa gástrica contra lesões geradas pela ação prejudicial de vasoconstritores, como o Leucotrienos C₄, Tromboxano A₂ e Endotelinas. A atividade das células endoteliais são mantidas pela PGI₂ e NO que também impedem a adesão de plaquetas e leucócitos às células endoteliais microvasculares, evitando comprometimento desta microcirculação. Quando a mucosa gástrica é exposta a um agente irritante ou ao ácido gástrico que sofreu difusão para dentro do epitélio, ocorre um rápido e acentuado aumento do fluxo sanguíneo da mucosa. Esta reação permite a remoção dos agentes nocivos e ou a diluição deste ácido que retornou limitando, desta forma, sua penetração em camadas mais profundas da mucosa. Esta resposta é essencial, pois a restrição mecânica do fluxo sanguíneo leva a necrose hemorrágica. Esta resposta hiperêmica é mediada por nervos aferentes sensoriais e o aumento de fluxo sanguíneo na mucosa é mediada pelo menos em parte pelo NO gerado pela enzima NO sintase que protege a mucosa gástrica contra lesões por Etanol e Endotelina 1, enquanto que a inibição da NO sintase (resultando em menor geração de NO) aumentando a injúria gástrica. (LANAS, 2008).

2.5.4.8 Inervação Sensitiva

O trato gastrointestinal é conhecido por ser rico em sistemas neurais. Os vasos da mucosa gástrica e submucosa são inervados por neurônios sensoriais aferentes primários. Estes neurônios constituem um sistema de emergência que entram em funcionamento quando a mucosa gástrica é ameaçada pelo ácido gástrico e outros produtos químicos nocivos. Ativação desse sistema neuronal afeta diretamente o tônus das arteríolas da submucosa, que regulam o fluxo sanguíneo desta camada. As terminações sensoriais aferentes na superfície da mucosa pode também detectar a presença de ácido gástrico, promovendo a liberação de neurotransmissores como a Substância P e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP). Isso resulta o relaxamento da musculatura lisa em torno das arteríolas, promovendo uma elevação do fluxo sanguíneo da mucosa. O efeito relaxante do CGRP no músculo liso vascular é em grande parte mediada pelo NO, mas também há indícios de participação de PGs nesta resposta vasodilatadora. (HOLZER, 1998) (EVANGELISTA, 2006)

2.5.4.9 Inflamação

O processo inflamatório é uma componente chave na defesa da mucosa contra fatores exógenos e endógenos. O comprometimento dessa resposta inflamatória pode levar à lesão da mucosa e também ao comprometimento dos mecanismos de reparação. O processo inflamatório é coordenado por vários mediadores liberados nas células do epitélio e lâmina própria (linfócitos, mastócitos, fibroblastos). Mediadores inflamatórios podem alterar a integridade da mucosa, influenciando seus os vários componentes de defesa desta camada. É importante ressaltar que embora a resposta inflamatória aguda vise reduzir lesão da mucosa, existem circunstâncias em que esta resposta pode estar desregulada e contribuindo ainda mais para a lesão da mucosa. (MARTIN e WALLACE, 2006)

2.5.5 Aspectos Moleculares na Proteção da Mucosa Gástrica

2.5.5.1 Citocinas

As Citocinas desempenham um papel central na regulação do sistema imune da mucosa e são importantes para defesa da mucosa. A Interleucina (IL)-1b é liberada no início de uma reação inflamatória contribuindo para a resposta sistêmica à inflamação ou infecção, a administração de IL-1b pode aumentar a resistência a lesões e reduzir a gravidade dos danos gastroduodenal. Os mecanismos responsáveis pelas ações de proteção de IL-1b não são totalmente compreendidos, mas essa citocina é um potente inibidor da secreção de ácido gástrico, reduzindo a lesão gástrica por meio de sua capacidade de estimular a liberação de NO e PG. (MARTIN e WALLACE, 2006)

2.5.5.2 Poliaminas

O início da fase de reparação da resposta inflamatória é acompanhada por um aumento de síntese de Poliaminas que são inicialmente produzidos após a conversão de arginina para ornitina pela enzima arginase. Aumentos nos níveis de Poliaminas Intracelulares estão associados com taxas de crescimento rápido. Há evidências consideráveis de um papel chave de poliaminas em reparação da mucosa gástrica. (TULASSAY e HERSZENYI, 2010)

2.5.5.2 Prostaglandinas

A geração contínua de Prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) é o fator crucial para proteção e manutenção da integridade da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos e necrosantes. Quase todos os mecanismos de defesa do epitélio gástrico são estimulados por PGs, pois estas substâncias agem inibindo a secreção ácida, estimulam a síntese e secreção de bicarbonato, muco e fosfolídeos. PGs são produtos originados do ácido aracdônico, o qual é obtido da dieta ou do ácido linoléico, quimicamente são parte de um grupo chamado *eicosanóides*, derivados do ácido aracdônico e liberado de fosfolídeos de membrana de células lesadas, por ação catalítica da fosfolipase A₂. As cicloxigenases (COX-1 e COX-2) e a hidroxiperoxidase catalisam as etapas sequenciais de síntese dos prostanóides (prostaglandinas clássicas e tromboxanos) e as lipoxigenases transformam o ácido aracdônico em leucotrienos e outros compostos. Outro mecanismo de proteção é o aumento do fluxo sanguíneo no epitélio da mucosa acelerando a sua restituição e cicatrização, PGs também inibem a ativação de mastócitos e leucócitos, inibindo também a adesão das plaquetas no endotélio vascular. (LAINE *et al.*, 2008).

PGs aumentam a resistência de células epiteliais em lesões induzidas por citotoxinas e suprimem o recrutamento de leucócitos na mucosa, também podem regular negativamente a liberação de uma série de mediadores inflamatórios que contribuem para a geração de lesão da mucosa. Por exemplo, PGE₂ é um potente inibidor de fatores de crescimento TNF- α , IL-1, IL-8 e de leucotrieno B₄ que são liberados pelos macrófagos e neutrófilos. (MARTIN e WALLACE, 2006).

As ações protetoras da mucosa gástrica mediada pelas PGs atuam principalmente via receptores EP-1, que aumentam a secreção de bicarbonato e o fluxo sanguíneo da mucosa danificada, diminuindo a motilidade gástrica, já os receptores EP-3 e EP-4 afetam a secreção de ácido e de muco, respectivamente. (GYÍRES *et al.*, 2001).

2.5.5.3 A Ação das Enzimas Ciclooxygenase (COX) na Proteção Gástrica

A Ciclooxygenase (COX)-1 atenua a lesão da mucosa por estimular a secreção de HCO₃⁻ e muco, por aumento do fluxo sanguíneo da mucosa, a COX-2 regula proliferação epitelial em locais de lesão, enquanto inibi a adesão de leucócitos ao endotélio vascular. A COX-1 e COX-2 são enzimas chaves na biossíntese de PGs. COX-1 é constitutivamente expressa em muitos

tecidos, enquanto COX-2 tem pouca ou nenhuma expressão na maioria dos tecidos, mas é rapidamente induzida em resposta a fatores de crescimento e citocinas (MARTI e WALLACE, 2006).

A síntese PG é mediada principalmente pela COX-1 sendo responsável por manter a integridade da mucosa gástrica. Os AINEs tradicionais, como a indometacina ou ibuprofeno são inibidores seletivos de ambas as enzimas, COX-1 e COX-2. Estes medicamentos causam danos ao estômago devido a diminuição acentuada de PGE₂ da mucosa gástrica. Portanto as lesões gástricas podem estar relacionada com inibição da produção de PG na mucosa gástrica por inibição da COX-1. Esta afirmação foi reforçada pelo fato de que AINEs seletivos de COX-2, que não inibem a COX-1 em doses terapêuticas, não afetam a produção de PG da mucosa e não produzem lesão gástrica experimental em modelos animais. No entanto, estudos recentes mostram que um inibidor da seletivo COX-1 também não causa dano grave ao estômago, apesar da produção inibida de PG na mucosa gástrica. Em contraste, a administração combinada de inibidores seletivos de COX-1 e COX-2 induzem a lesão na mucosa. Estes dados desafiam a idéia de que apenas a COX-1 desempenha um papel na proteção do estômago. Este fato é explicado devido a inibição seletiva da COX-1 induz a uma deficiência de PG, porém existe um mecanismo compensatório que aumenta a expressão da enzima COX-2 regulando a produção de PG (TANAKA, *et al.*, 2001) (HALTER, *et al.*, 2001) (TANAKA *et al.*, 2002).

Assim, tanto a COX-1 quanto a COX-2 podem desempenhar um papel na síntese de PG e na manutenção da integridade da mucosa gástrica. A COX-2 desempenha um papel compensatório, aliviando a deficiência de PG em situações que a sua síntese foi diminuída pela inibição da enzima COX-1. Os AINEs induzem a redução do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica devido à inibição da COX-1 e induzem a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular devido a COX-2. No entanto, tanto a COX-1 e COX-2 podem ser necessárias para a melhoria da migração de neutrófilos na mucosa gástrica (LAINE, *et al.*, 2008).

Vários estudos, usando uma variedade de experimental modelos, também têm demonstrado um papel da motilidade na defesa da mucosa gástrica. A motilidade normal desta camada é mediada pela COX-1 induzindo a síntese PG, este fato esta envolvido na manutenção normal do fluxo sanguíneo desta camada. Um aumento marcante na motilidade gástrica é relatado após tratamento com inibidores seletivos de COX-1, mas isto não é verificados em inibidores seletivo de COX-2. Este fato é importante, pois contrações exacerbadas podem resultar em uma restrição temporal do fluxo sanguíneo para a mucosa, resultando em hipóxia e diminuição dos mecanismos de defesa (LAINE, *et al.*, 2008).

2.5.5.4 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização, gerado por uma família de enzimas denominado óxido nítrico sintetases (NOS), do ponto de vista bioquímico, são uma família de enzimas complexas que catalisam a oxidação da L-arginina para formar óxido nítrico e L-citrulina. Elas são mais bem caracterizadas como citocromo heme proteínas semelhantes ao citocromo P-450 que dependem de cofatores como: oxigênio molecular, NADPH, flavinas e tetrahidrobiopterina que geram NO através de uma série de etapas reguladas de transferência de elétrons (SHAH, *et al.*, 2004)

As três formas humanas de NOS identificadas até agora, eNOS (constitutiva endotelial), nNOS (neuronal) e iNOS (induzida), gerando o NO por diferentes mecanismos regulatórios e complementares. Embora de vida curta em sistemas biológicos, a natureza lipofílica do NO lhe permite difundir rapidamente, iniciando assim suas diversas ações nos tecidos. A via mais característica da sinalização produzida pelo NO diz respeito à via de Guanilatociclase, o NO ao se ligar ao grupo heme da Guanilatociclase estimula a enzima gerando GMPC, que por sua vez ativa a Proteína Quinase G (PKG), levando a funções efetoras. No entanto, em condições fisiopatológicas e provavelmente durante certas condições fisiológicas, a sinalização mediada pelo NO também pode ser independente da ativação da guanilato ciclase, regulando diretamente a função de canais iônicos, enzimas e várias proteínas (STAMLER *et al.*, 2001).

A importância fisiológica deste fator endotelial tem sido demonstrada em animais e humanos. O produto da óxido nítrico sintetase (NOS) é o mais potente vasodilatador endógeno conhecido. O NO além de ser um potente vasodilatador e inibidor da adesão e agregação plaquetárias, reduz a aderência de leucócitos ao endotélio vascular e também suprime a proliferação de células da musculatura lisa vascular por inibição de fatores de crescimento (COOKE e DZAU, 1997).

Regulação de fluxo sanguíneo do trato gastrointestinal é mediado pelo NO, pois este desempenha um papel chave na regulação da perfusão vascular, promovendo a vasodilatação pela sinalização da célula muscular lisa via GMPC. A maioria do fluxo sanguíneo para o Sistema Gastrointestinal chega pela veia mesentérica e a regulação deste fluxo para as arteríolas mesentéricas é um fator determinante para a regulação do fluxo sanguíneo geral e local do intestino. Além disso, grande parte do fluxo mesentérico é direcionada para a mucosa gastrointestinal para facilitar a absorção e secreção. O papel do NO neste processo é evidenciada pela demonstração de que inibidores da NOS diminuem o fluxo sanguíneo esplâncnico por diminuir os níveis de NO nas artérias mesentéricas. (SHAH *et al.*, 2004)

A eNOS é a isoforma responsável pela da produção de NO que atua regulando a vasodilatação no sistema GI, portanto a expressão da eNOS é mais proeminente nas células endoteliais que revestem os canais vasculares no TGI. O NO inibe a ativação e adesão de determinados células hematopoiéticas, atenuando a estase vascular e prevenindo a lesão por isquemia tecidual. Leucócitos e plaquetas são as células mais proeminentes envolvidos neste processo de inibição (LOW, *et al.*, 2002).

Atualmente, o óxido nítrico tem sido reconhecido como um importante mediador nos mecanismos de defesa gástrica. Embora a influência do NO sobre a proteção e permeabilidade da mucosa seja controversa, experimentos usando inibidores farmacológicos das NOS indicam que a inibição da produção de NO basal aumenta permeabilidade da mucosa epitelial, implicando, assim, na sua constituição. Sendo assim a produção de NO é importante para manter a barreira protetora da mucosa gastrointestinal. Esse mecanismo protetor do NO pode ser devido a sua capacidade em aumentar do fluxo sanguíneo da mucosa. Porém, o excesso de produção de NO associado com estados inflamatórios é caracterizado pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função da barreira protetora de muco. (SHAH *et al.*, 2004)

2.5.6 Mecanismos de Reparação da Mucosa Gástrica.

Quando os componentes de defesa da mucosa são insuficientes para limitar o dano a esta camada, acarretando na formação de úlceras, um processo programado de reparo é inicializado propiciando a cicatrização da lesão desenvolvida. Estes mecanismos de reparo incluem a inflamação, proliferação celular, re-epitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese, todos resultando na formação de cicatriz. Estes eventos são controlados pelo citocinas, fatores de crescimento e fatores de transcrição ativados por lesão tecidual. Como exemplos o EGF e seu receptor, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e a COX-2 são importantes para a proliferação das células epiteliais, migração, re-epitelização e a reconstrução das glândulas gástricas. As plaquetas contribuem significativamente para a cicatrização da úlcera, pelo menos em parte, através da entrega de inúmeros fatores de crescimento que podem promover a proliferação de células epiteliais e angiogênese. Fator Vascular de Crescimento Endotelial (EGFV), NO, Endotelina e Matriz metaloproteinases (MMPs) são importantes para a remodelação da angiogênese, vascular e regeneração da

mucosa. Células progenitoras circulantes são também importantes para a cicatrização da úlcera. (WALLACE, *et al.*, 2006) (TARNAWSKI, 2005)

2.5.7 Citoproteção da Mucosa Gástrica

Citoproteção é definida como uma capacidade de agentes farmacológicas, originalmente PGs, em prevenir a lesão da mucosa gástrica e intestinal produzida por uma variedade de substâncias ulcerogênicas (exemplo, aspirina, indometacina, ácidos biliares) e por agentes necrotizantes (exemplo, água fervente, álcool absoluto, HCl na concentração 0,6 mol / L e NaOH na concentração 0,2 mol / L). Portanto o pré-tratamento de animais experimentais com PGE2 antes da administração de agentes necrosante (água fervente ou etanol 95%) evita danos da mucosa gástrica. Esta proteção é realizada por outros mecanismos que não a inibição da secreção de ácido gástrico. Desde a primeira demonstração de citoproteção por PGs, diversos outros agentes, com efeito, citoprotetor, foram estudados e descobertos. Como exemplo incluem os agentes sulfidrílicos, fatores de crescimento, peptídeos como o EGF, TGF- α , gastrina, colecistocinina, bombesina, CRF, peptídeo YY, neurocinina, somatostatina, leptina, grelina, NO, sulfureto de hidrogênio. Estas ações de proteção são devido à ativação da síntese de PG, ativação de genes que codificam EGF, bFGF e seus receptores, ativação da proteína de choque térmico e ação contra o *H. pylori*. Outros agentes podem ter ações protetoras tópicas, induzindo uma citoproteção adaptativa e, assim, diminuir uma futura lesão por irritantes mais graves administrado posteriormente. Esta ação é mediada por receptores EP-1 e é bloqueado por indometacina inibindo as enzimas COX e por um antagonista ao receptor EP-1. (TULASSAY e HERSZÉNYI, 2010)

O complexo de proteção epitelial e subepitelial são ativados quando as barreiras de proteção inicial são ultrapassadas. Uma das formas de proteção é a redução do estresse oxidativo causado por Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) que desempenham um papel importante na patogênese de muitas formas de lesão celular. Em condições fisiológicas nos sistemas biológicos, aproximadamente 95% do oxigênio molecular sofre controlada redução pelo sistema citocromo oxidase formando água. O restante do oxigênio torna-se reduzido por intermediários reativos de oxigênio, ou seja, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, e radicais hidroxilas (POHLE *et al*, 2001).

O trato gastrointestinal tem a capacidade de produzir grandes quantidades de ROS através das oxidases presentes na mucosa, tais como a xantina oxidase, amina oxidase e

aldeído oxidase, bem como a NADPH oxidase encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) da lâmina própria (GRISHAM e GRANGER, 1988) . A inflamação e o conseqüente recrutamento de neutrófilos por citocinas pró-inflamatórias aumentam a produção de ROS (DONGB e KAUNITZ, 2006).

Por outro lado, o sistema de defesa e proteção gastrointestinal impede a citotoxicidade dos radicais livres através das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase (CAT). A segunda linha de defesa contra estresse oxidativo induzido por lesão celular é realizado por moléculas de baixo peso molecular como tióis, especialmente glutathione reduzida, alfa-tocoferol (vitamina E), Vitamina C, carotenóides e flavonóides (POHLE *et al*, 2001).

2.6 Úlcera Péptica

Quando o equilíbrio entre fatores agressores e protetores da mucosa gástrica é alterado ocorre uma ulceração que pode se manifestar em diferentes tecidos e ser causada por diferentes fatores (hipóxia e isquemia, agentes químicos, agentes biológicos, fatores físicos ou genéticos). Úlcera péptica é um termo utilizado para descrever um grupo de distúrbios ulcerativos que ocorrem em áreas do trato gastrointestinal superior que se encontra exposto a secreções ácidas e pepsina. As formas mais comuns da úlcera péptica são as ulcerações duodenais e gástricas. A úlcera pode atingir o tecido muscular (úlceras agudas) ou perfurar o revestimento externo do estômago podendo levar ao extravasamento de suco gástrico nos casos de úlcera crônica. (MILANI e CALABRÒ, 2001) (PORTH e KUNERT, 2002)

Portanto Úlcera péptica pode ser definida como lesões na camada da mucosa que penetram na muscular da mucosa e formam uma cavidade cercada por inflamação aguda e crônica. Úlceras gástricas estão localizadas no estômago, muitas vezes ao longo da pequena curvatura na zona de transição do corpo do estômago para a mucosa antral. Úlceras duodenais estão localizadas no bulbo duodenal. Vários fatores estão incluídos na patogênese da úlcera gástrica como secreção de muco, deficiente neutralização por bicarbonato e aumento da secreção de pepsina ácida (KENT e DEBAS, 1994) (WADIE, 2011).

As causas mais comuns de ocorrência das lesões celulares ou teciduais da mucosa gástrica podem ser adquiridas ou inatas: hipóxia e isquemia (resultante da diminuição do fluxo sanguíneo ou do decréscimo da hemoglobina ou ainda da diminuição das enzimas antioxidantes dos tecidos), por agentes químicos, como monoaminas, eicosanóides,

endotelinas, drogas sintéticas e principalmente substâncias químicas ingeridas propositalmente como o etanol; por agentes biológicos, como vírus, bactérias, fungos, parasitas; por fatores físicos, estresse, temperaturas extremas, força mecânica e por problemas genéticos (PORTH e KUNERT, 2002).

Até pouco mais de duas décadas, a patogenia da Úlcera Péptica era atribuída a um desequilíbrio entre a secreção ácida e os mecanismos de defesa da mucosa, cujas razões eram desconhecidas. Em 1982, na Austrália, os pesquisadores Warren e Marshall isolaram uma bactéria inicialmente chamada de *Compylobacter pylori* e posteriormente denominada *Helicobacter pylori*, a partir de fragmentos de mucosa gástrica de pacientes com gastrite e úlcera duodenal. Estudos subsequentes em várias partes do mundo confirmaram a hipótese inicial de que essa bactéria estaria associada à origem da doença péptica ulcerosa. Em 1994, o papel da infecção pelo microorganismo na patogênese do carcinoma gástrico foi admitido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com base em evidências epidemiológicas e plausibilidade biológica (BITTENCOURT, *et al.*, 2006).

Úlcera Péptica pode ser classificada como primária quando associada à infecção pelo *H. pylori*, com curso clínico crônico, acometendo principalmente o duodeno ou secundária, de curso clínico agudo, mais frequentemente localizada no estômago na qual os mecanismos etiopatogênicos dependem da doença de base (CARVALHO, 2000). Por mais de um século essa doença foi à principal causa de morbidade e mortalidade, vinte anos se passaram desde a descoberta de Marshall e Warren existindo agora várias evidências de que o *H. pylori* é um pré-requisito para a Úlcera Gástrica Duodenal. Não obstante, existe muito da relação entre úlcera e o *H. pylori* que ainda deve ser estudada. A rápida resistência a antimicrobianos tem importante implicação no desenvolvimento de Úlcera Péptica (DONGB e KAUNITZ, 2006).

A administração crônica de AINEs produz erosões na mucosa gastroduodenal em 35-60% dos pacientes, ulcerações em 10-25% e graves hemorragias ou perfurações em menos de 1%. Estudos epidemiológicos estabeleceram que em geral, os AINEs aumentam o risco de complicações graves de úlcera como perfuração, sangramento, hospitalização e morte. A lesão aguda da mucosa induzida por aspirina em humanos ocorre dentro de 60 minutos sendo visualizado como hemorragia intramucosa petequial extensa e desenvolvimento de erosões (HALTER *et al.*, 2001).

Embora os casos hospitalares de úlcera péptica em hospitais tenham decaído desde 1950 (KURATA, 1984), existe um aumento de casos de úlcera hemorrágica e perfuração em pessoas idosas (MUNNANGI, 1997). Esse aumento tem sido atribuído ao aumento do uso de AINES e aspirinas em baixas dosagens (HIGHAM *et al.*, 2002).

Portanto os principais fatores de risco para o desenvolvimento de um quadro de Úlcera Péptica são atribuídos à infecção por *H. pylori*, uso de AINES e de AAS (Ácido Acetil Salicílico). Porém outras causas como o administração de agentes antiplaquetários, stress, infecção por *Helicobacter heilmanii*, citomegalovírus, doença de Behçet, doença de Zollinger Ellison, doença de Crohn e cirrose com hipertensão portal também estão relacionadas com o desenvolvimento da Úlcera Péptica (NAJM, 2011)

Tabela 2: Etiologia e Fatores de Risco para Doença Ulcerosa Péptica

Fator de risco	Razão de prevalência
Fármacos Antiinflamatórios Não Esteroidais (AINEs)	3.7
<i>Helicobacter pylori</i>	3.3
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	2.34
Insuficiência Renal	2.29
Usuários de Tabaco	1.99
Doença cardíaca coronariana	1.46
Uso de álcool	1.29
Obesidade	1.18
Diabetes	1.3

Fonte: NAJM, 2011

2.6.1 Tratamento da Úlcera Péptica

Tratamento da Úlcera Péptica consiste na cura das lesões ulcerosas formadas e na prevenção de complicações. Os pacientes devem ser aconselhados a interromper o tabagismo, além disso, devem ser oferecidos programas de gestão do estresse, evitar o uso de AINEs, aspirina e abuso de álcool. Tratamento de pacientes também exige a detecção e erradicação da infecção do *Helicobacter Pylori* e da administração e medicamentos anti-secretores, de preferência inibidores da bomba de prótons, por um mínimo de 4 semanas. A recuperação dos pacientes após o primeiro curso de tratamento, devem ser observadas. Caso os sintomas persistirem a terapia anti-secretora com inibidores da bomba de prótons ou medicamentos antagonistas dos receptores de histamina (H₂) devem ser mantidos por mais 4 a 8 semanas (BROWN *et al*, 2006).

O lançamento em 1979 da cimetidina revolucionou o tratamento médico da Úlcera Péptica, proporcionando redução de duração relativamente longa da secreção de ácido

gástrico com a cura de ambas as úlceras gástricas e duodenais. Cimetidina foi primeiro fármaco a ser descoberto seguido pela ranitidina, famotidina e nizatidina. Todos com um mecanismo idêntico de ação, ou seja, de inibição reversível do receptor de histamina (H_2) na célula parietal secretoras de ácido no estômago. Estes fármacos têm mecanismos muito semelhantes de ação sendo que todos estes medicamentos apresentam tolerância de tal forma que perdem cerca de 50% de sua eficácia ao longo de um período de 7 dias.

Os fármacos Inibidores da Bomba de Prótons (H^+ , K^+ - ATPase) como o omeprazol, lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol são considerados mais eficazes na supressão da secreção de ácido gástrico. O desenvolvimento destes fármacos melhorou a cicatrização de úlceras gástricas, pois inibe a acidez do estômago, melhorando também a cicatrização das úlceras duodenal. Os Inibidores da Bomba de Prótons inibem a secreção ácida basal e a estimulada por alimentos e mediadores neuronais. Estes inibidores de bomba são pró-fármacos que necessitam de serem ativados em ambiente ácido. Devida a sua fraca natureza básica esse fármacos entram na célula parietal a partir do sangue e acumulam-se em canalículos secretores ácidos desta célula, onde são ativados por um processo catalisado por prótons resultando na formação de uma sulfenamida tiofílica. Esta forma ativada reage por meio de ligação forte covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+ , K^+ - ATPase, resultando em uma inativação irreversível da bomba, elevando o pH gástrico para valores maiores que 3 ou cerca de 4 por mais tempo em um período de 24 horas, quando comparados com os antagonistas dos receptores H_2 . A secreção do ácido somente poderá ser reiniciada após a inserção de novas moléculas de bomba na membrana luminal (ROBINSON, 2004).

2.6.2 Limitações e Dificuldade do Tratamento de Úlcera Péptica

Os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento das úlceras pépticas desempenham seu efeito principalmente por reduzir fatores agressivos da mucosa gástrica (como os antiácidos e inibidores da bomba de prótons) ou por estimular fatores defensivos (como o análogo de prostaglandina). Porém a recorrência das lesões no período de um ano, após o término do tratamento está entre 40 e 80% em grande parte dos estudos. Úlceras cicatrizadas espontaneamente ou depois do uso de antagonistas de receptores H_2 são insatisfatoriamente vascularizadas tendo 2 a 3 vezes menos densidade de vasos sanguíneos

novos que o tecido normal ao redor podendo ser esta a explicação (SZABO e VINCZE, 2000).

O uso prolongado de medicamentos bloqueadores de receptores H₂ e inibidores da bomba de prótons podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer. Fármacos que inibem a secreção ácida do estômago, como a cimetidina, ranitidina e os bloqueadores da K⁺,H⁺-ATPase, ao bloquearem os receptores de H₂ e a bomba de prótons desencadeiam posteriormente um mecanismo homeostático para superar esta ação e restabelecer a acidez. A elevação do pH estimula as células G do piloro a secretar gastrina, produzindo hipergastrinemia. A gastrina estimula as células enterocromafínicas a liberar histamina que, por sua vez, leva as células parietais a produzir a secreção gástrica ácida. Embora a gastrina também estimule diretamente as células parietais, a resposta secretória destas células é potencializada de forma marcante quando os receptores H₂ são estimulados concomitantemente. (GOMES, *et al*, 1997)

A manutenção do bloqueio farmacológico leva, portanto, à continuidade da estimulação e à hiperplasia das células enterocromafínicas. Carcinomas neuroendócrinos (tumores carcinóides), de aparecimento tardio, foram observados no estômago glandular em ratos tratados cronicamente com omeprazole. Além da ação promotora, através da indução de proliferação celular, é possível também que a prolongada acloridria, que favorece a sobrevivência de microorganismos e a colonização da mucosa, facilite a produção de carcinógenos *in situ* (mediante a redução de nitrato a nitrito). Os números de estudos relatam que a incidência de câncer gástrico é maior entre usuários de cimetidina e outros bloqueadores H₂. (FARROW, *et al.*, 2000) (RAGHUNATH, *et al.*, 2005).

Apesar dos avanços refletindo inclusive na diminuição de morbidade e mortalidade dos pacientes, a abordagem farmacológica da úlcera péptica ainda é insatisfatória, já que na maioria das vezes os fármacos se limitam a atuar de maneira sintomática e paliativa, sendo que a situação ideal seria a busca da cura sem reincidências. Relatos científicos mostram as plantas podem atuar tanto na redução de fatores agressivos como aumento da resistência da mucosa gástrica, possibilitando o tratamento com eficácia das ulcerações gástricas (BORRELLI e IZZO, 2002).

2.6.3 Química de Produtos Naturais na Terapia da Úlcera Gástrica

Nos últimos anos, grandes avanços nos estudos farmacológicos e químicos têm

contribuído para o conhecimento de novos compostos terapeuticamente ativos provenientes de produtos naturais. Os compostos ativos naturais ou classes de metabólitos secundários como alcalóides, flavonóides, terpenóides, taninos e outros têm atraído pesquisadores para investigação de suas propriedades químicas, toxicológicas e farmacológicas. Estes compostos podem ser usados diretamente como pistas para o desenvolvimento de novos medicamentos ou como ferramentas farmacológicas para descobrir novas substâncias ativas que possam atuar na Terapia dos Distúrbios Gástricos (FALCÃO, *et al.*, 2008).

Os flavonóides são um grupo de compostos naturais com uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo a atividade anti-úlceras. Eles são componentes importantes da dieta humana (dieta diária contém aproximadamente 1g de flavonóides por dia), encontrados em várias plantas medicinais utilizadas na medicina popular em todo o mundo. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito gastroprotetor dos flavonóides, incluindo o aumento de conteúdo das prostaglandinas da mucosa, diminuição da secreção de histamina de mastócitos pela inibição da enzima histidina descarboxilase, inibição do crescimento do *Helicobacter pylori* e inibição da peroxidação lipídica de membranas (BORRELLI e IZZO, 2002).

Além disso, os flavonóides foram classificados como principais substâncias com forte poder antioxidante, pois são moléculas eficientes em capturar radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), radical peroxila (ROO^{\bullet}) e radical alcóxila (RO^{\bullet}). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. Outros mecanismos responsáveis pela atividade antioxidante são a inibição de enzimas oxidantes e a produção de radicais livres. Eles promovem a formação de mucosa gástrica, diminui a secreção ácida e inibem a produção de pepsinogênio diminuindo as lesões ulcerosas (LA CASA, *et al.*, 2000) (SOUSA, *et al.*, 2007).

2.6.3.1 Taninos

Taninos podem ser classificados como hidrolisáveis ou condensados, são polifenóis de peso molecular elevado contendo várias hidroxilas assim como os flavonóides. As plantas produzem taninos como substâncias protetoras, encontradas em os tecidos exteriores e interiores. Esses metabólitos secundários possuem a propriedade de formar complexos com macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, essa complexação leva à formação de uma camada protetora na mucosa do estômago, tornando-a menos permeável e mais resistente a agressões químicas ou mecânicas (DONATINI, *et al.*, 2009).

Taninos possuem efeito inibitório sobre os mediadores dos receptores H₂ da histamina nas células parietais funcionando como um antagonista destes receptores, além de inibir o efeito da gastrina. Vários taninos gálicos, inibem a ATPase de membrana potássio-dependente das células da mucosa gástrica responsáveis pela secreção de ácido clorídrico no estômago (FERREIRA, *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram que taninos gálicos de diferentes plantas medicinais possuíam ação bacteriostática contra *H. pylori*, *in vitro*. Tal ação deve-se principalmente à alteração na permeabilidade da membrana, levando a perdas de eletrólitos e água. Foi demonstrado, ainda, que alguns polifenóis relacionados aos taninos e flavonóides atuavam em relação à adesão da bactéria à mucosa gástrica, dificultando sua aderência e, portanto, sua fixação, desta forma impedindo sua ação patogênica (ANNUK, *et al.*, 1999).

Em estudos *in vivo* utilizando fração de taninos gálicos e catéquicos foram eficientes em erradicar a infecção do *H. pylori* sugerindo grande eficiência, reduzindo significativamente de achados inflamatórios, focos de hemorragia e ulceração, nos animais tratados (MABE, *et al.*, 1999).

2.6.3.2 Alcalóides

Os alcalóides constituem a maior classe de substâncias vegetais secundárias, possuindo uma notável gama de atividades farmacológicas. Os alcalóides geralmente incluem as substâncias básicas que contêm um ou mais átomos de nitrogênio, geralmente em combinação, como parte de um sistema cíclico são muitas vezes tóxicos para o homem e muitos têm atividades antiúlcera gástricas.

Alcalóides isoquinolínicos possuem diversas atividades farmacológicas, os compostos morfina e efedrina, conhecidos por sua atividade analgésica também confirmaram a atividade antiúlcera, inibindo lesões gástricas induzida por reserpina, aspirina ou indometacina. Outros tipos de alcalóides como protoberberina alcalóide aceleram a cura da úlcera e o aumento da produção de muco gástrico após a lesão ter sido causada pelo ácido acético, HCl e etanol ou absoluto etanol (AL-SHABANAH, *et al.*, 1993).

Alcalóides tropânicos como a atropina e escopolamina constituem uma importante classe de compostos anticolinérgicos derivados de plantas. Clinicamente, eles são usados para bloquear a atividade de muscarínica da acetilcolina mostrando efeitos antiespasmódico e anti-secretora no tratamento da colite espástica, gastroenterite e úlcera péptica. Eles também são úteis ferramentas farmacológicas para descobrir novos princípios ativos com as ações do trato gastrointestinal (FALLONE e MORRIS, 1995) (FALCÃO, *et al.*, 2008).

No estômago, a capsaicina estimula neurônios específicos e sinaliza para a proteção da mucosa estomacal inibindo a secreção ácida estimulando o muco alcalino e principalmente, aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, que ajudam na prevenção e cura de úlceras contra lesões causadas por agentes agressivos. No entanto, doses neurotóxicas de capsaicina têm aumentada a susceptibilidade da mucosa gástrica à lesão causada por fortes substâncias irritantes (PARK, *et al.*, 2000).

Uma importante classe de alcalóide são os indólicos. Alguns exemplos destes metabolitos apresentam atividade antiulcerogênica, pois protegem a mucosa gástrica contra os danos causados por isquemia e reperfusão induzidas por etanol absoluto através da atenuação da intensificação do fluxo sanguíneo gástrico e eliminação de radicais livres (KONTUREK, *et al.*, 1997).

Os alcalóides pirrolizidínicos como a retrorsina, senecionina, usaramina demonstram atividade significativa em úlceras gástricas aguda e crônica. Estes alcalóides aumentaram produção de prostaglandinas e em consequência o muco protetor da mucosa do estômago. Além disso, essas substâncias reduziram a esfoliação superficial de células, hemorragias e infiltração de células do sangue que pode ser mediada por aumento da secreção de gastrina e da expressão do RNAm dos fatores de crescimento epidérmico (TOMA, *et al.*, 2004).

Alcalóides do tipo alquil-metil quinolínicos (1-metil-2-[(Z)-8-tridecenil]-4-(1H)-quinolona e 1-metil-2-[(Z)-7-tridecenil]-4-(1H) quinolona) exibiram alta especificidade e atividade antimicrobiana forte contra o *Helicobacter pylori* mediada via inibição respiratória sem efeitos adversos graves. Estes agentes possuem um único e diferente mecanismo antimicrobiano em relação aos outros antibióticos como a amoxicilina, claritromicina ou

metronidazol. Estes alcalóides podem ser benéficos no tratamento de *Helicobacter pylori* associada a doenças gastroduodenais, quer sejam utilizados isoladamente ou em conjunto com os antibióticos acima mencionados ou inibidores da bomba de próton (TOMINAGA, *et al.*, 2000).

2.7 Ação Antifúngica de Produtos Naturais

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento e considerando a resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados, torna-se importante a busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal que possam auxiliar a terapêutica (LIMA *et al.*, 2006).

A atividade antifúngica da família Rutaceae é relatada em diversas espécies e relacionada aos alcalóides produzidos por plantas pertencentes a essa família. Como exemplo, os alcalóides quinolínicos isolados das folhas de extratos de *Raulinoa echinata* apresentaram atividade contra o fungo simbiótico *Leucoagaricus gongylophorus* das formigas cortadeiras *Atta sexdens*. Extratos hidroetanólicos obtidos das folhas de *Zanthoxylum leprieurii* e *Z. xanthoxyloides* apresentaram atividade contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e fungos filamentosos (CINARA, *et al.*, 2010).

Diante desse fato é crescente o interesse pelo estudo da família Rutaceae, uma vez que a mesma apresenta um número significativo de diferentes metabólitos secundários, gerando inúmeras atividades biológicas e farmacêuticas, podendo estar relacionadas com a atividade antifúngica

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade biológica antiulcerogênica gástrica, cicatrizante, antioxidante e antifúngica do extrato hidroalcoólico de *Hortia brasiliiana* sobre o trato gastrointestinal de ratos.

3.2 Objetivos específicos:

1. Avaliar os efeitos dos extratos de *Hortia brasiliiana* na proteção da mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol e indometacina em ratos.
2. Avaliar os efeitos do extrato de *Hortia brasiliiana* na cicatrização de lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratos.
3. Avaliar os efeitos do extrato de *Hortia brasiliiana* sobre a secreção ácida gástrica em modelo de ligadura do piloro.
4. Avaliar a ação sequestradora de radicais livres dos extratos de *Hortia brasiliiana* “*in vitro*”.
5. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* de extratos de *Hortia brasiliiana*.
6. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de *Hortia brasilian*.

Material e Métodos

4.0 Material e Métodos

4.1. Material botânico

As folhas e cascas de *Hortia brasiliana* foram coletadas próximas ao município de Mariana em uma mata nativa próxima a estrada que liga esse município a cidade de Santa Barbara no mês de agosto de 2009, no período da manhã. A identificação botânica foi realizada na Universidade Federal de Ouro Preto sendo realizado o depósito da excicata número 25769, no herbário José Badinii da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.1.1 Processos de Secagem

O material botânico coletado foi selecionado, limpo em água corrente, posteriormente dispostas em papel absorvente a fim de retirar o excesso de água e colocada em estufa com ventilação forçada (FABBE modelo 171) à 45°C por uma semana, 24 horas por dia. Após a secagem as cascas e folhas foram reduzidas a pó, em moinhos de facas, e acondicionados em frascos de vidros hermeticamente fechados. De parte desse material preparou-se o extrato etanólico

4.2 Metodologia

4.2.1. Obtenção do Extrato

As cascas de *Hortia brasiliana* foram secas em estufa com circulação de ar forçada entre 40-50°C e moídas em moinho de facas. O material moído foi extraído através de percolação com etanol 70%, segundo a Farm. Bras. 2.ed. (1959) sendo o extrato recolhido até o clareamento da solução. As soluções obtidas foram filtradas em papel de filtro e concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperatura < 40°C.

Em seguida, os extratos foram transferidos para béquers e deixados em estufa de ventilação forçada com temperatura 40°C até que a massa do extrato se estabilizasse e armazenados em dessecador. Extratos foram evaporados em evaporador rotatório (Buchi, R114, Suíça) equipado com bomba a vácuo e banho para controle da temperatura. Uma balança analítica Sartorius BP 221S, de capacidade para 45g e precisão de 0,001mg foi usada na pesagem do extrato. O rendimento da extração foi calculado através da fórmula:

$$\text{rendimento\%} = (\text{peso extrato seco} / \text{peso das cascas}) \times 100.$$

4.2.1.2 Preparo das Formulações

Para os testes em animais foram preparados dois tipos de formulação, uma suspensão e uma nanoemulsão, ambas utilizando como principio ativo o extrato de *Hortia brasiliana* nas doses 1mg/Kg, 10mg/Kg, 100 mg/Kg Os extratos etanólicos de *Hortia brasiliana* foram enviados para uma farmácia de manipulação (Farmácia do Povo -Viçosa) onde foram preparados a formulação suspensão de EEHb, omeprazol e a ranitidina. Para o preparo da suspensão de *Hortia brasiliana* foram utilizados o extrato da planta, Carboximetilcelulose (CMC) 0,4 % e água qsp. O omeprazol e a ranitidina foram preparados utilizando celulose microgel, 0,5%, e água qsp.

A nanoemulsão do EEHb foi preparada através do método inversão de fases descrito por MORAIS,(2006). Esta técnica consiste em aquecer separadamente as fases oleosa e aquosa até a temperatura de 85±2°C e verter lentamente a fase aquosa sobre a fase oleosa, sob agitação constante entre 550 a 600 rpm utilizando um agitador mecânico (Fisaton 713D), mantendo essa agitação até o resfriamento das amostras à temperatura ambiente (25±3°C).

A fase aquosa foi composta por água ultrapura e a fase oleosa por manteiga de murumuru e pelo sistema de tensoativos. A nanoemulsão foi preparada utilizando o extrato da

planta estudada, óleos de soja, croduret e crill. Para análise de tamanho e índice de polidispersividade, foi utilizado o aparelho Nanosizer N5 submicron Particle Size Analyzer - Beckman Coulter. Foi realizada inicialmente uma diluição com 25 µL da nanoemulsão em 1000µL de água Milli Q em Eppendoff. Retirou-se 35µL dessa diluição e transferiu para cubeta completando o volume com água Milli Q. Os ensaios foram realizados com a temperatura interna do aparelho ajustada para 25°C (GOTO, 2011)

4.2.2 Prospecções de Constituintes do Extrato Hidroalcoólico de *Hortia brasiliiana*.

O extrato hidroalcoólico de *Hortia brasiliiana* foi submetidas à análise química que permite o conhecimento preliminar das principais classes de substâncias naturais. Esta avaliação é frequentemente usada para direcionar os trabalhos posteriores de fracionamento e isolamento das substâncias. Esta abordagem foi elaborada com testes para detectar os constituintes secundários da espécie estudada, através de reações de coloração e precipitação utilizando reagentes específicos para cada classe analisada (MATOS, 1988).

Foi utilizado para preparo do extrato 300 g de casca de *Hortia brasiliiana* seca e triturada, em sequência foi utilizado o método de extração dos princípios ativos utilizando extrato hidroalcoólico (etanol 70%: água 30 %). O material foi extraído agitando-se frequentemente e aquecendo a mistura até obter uma parte da planta para duas partes de solvente hidrofílico. Após o preparo do extrato foi realizado testes para detectar os constituintes secundários a espécie em estudo.

4.2.2.1 Teste para Heterosídeos Cianogênicos.

Misturou-se 10 g do material com 50 ml de água juntamente com 1 mL de H₂SO₄ (1N) em um erlemeyer de 250 mL com tampa. Foi utilizado para visualização do teste uma fita de papel picrato de sódio presa a uma tampa, porém sem tocar no líquido. A mistura foi aquecida na faixa de temperatura de 50-60° C durante 2 horas. O aparecimento de cor vermelho castanha na fita indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

4.2.2.2 Operações Preliminares.

Separou-se sete porções de 3 a 4 mL em tubos de ensaio numerados e duas porções de 10 mL em bécheres rotulados. Os bécheres foram deixados em banho Maria até a secura e

mantidos em dessecador. O restante do extrato foi concentrado também em banho Maria até obter metade do volume, acidificado para pH 4,0 e posteriormente filtrado.

4.2.2.3 Teste para Fenóis e Taninos.

O tubo número 1 foi ensaiado juntamente com três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 , foi realizado também o ensaio em branco, usando apenas água e cloreto férrico. A coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis, quando o teste “branco” for negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e verde a presença de taninos condensados.

4.2.2.4 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides.

O tubo de ensaio número 2 foi acidulado para pH 3 (HCl [1N]), o tubo 3 alcalinizado para pH 8,5 e o tubo 4 para pH 11. O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides

Constituintes	Cor em meio		
	pH (3) Ácido	pH (8,5) Alcalino	pH (11) Alcalino
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelho púrpura
Flavanonóis	-	-	Vermelho laranja

4.2.2.5 Testes para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavanonas

O tubo número 5 foi acidulado por adição de HCl [1N] até a faixa de pH entre 1-3, o tubo número 6 foi alcalinizado com NaOH [1N] até pH 11 sendo ambos posteriormente aquecidos com o auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2 a 3 minutos. O aparecimento ou intensificação de cor indica a presença de constituintes especificados na Tabela 4

Tabela 4: Testes para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavanonas

Constituintes	Cor em meio	
	pH (1-3) Ácido	pH (11) Alcalino
Leucoantocianidina	Vermelha	-
Catequina	Pardo amarela	-
Flavanonas	-	Vermelho laranja

4.2.2.6 Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas

Foi adicionado ao tubo número 7 magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado, o término da reação foi aguardado pelo fim da efervescência e observado a mudança de cor em comparação com ao tubo 5 do teste anterior. O aparecimento ou intensificação de cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e ou xantonas livres ou seus heterosídeos.

4.2.2.7 Teste para Esteróides e Triterpenoides

O resíduo seco do extrato presente em um béquer foi extraído três vezes com 2 mL de colrofórmio. A solução clorofórmica foi então filtrada e seca com auxílio de Na₂SO₄ anidro para um tubo de ensaio seco e adicionado 1 mL de anidrido acético PA, juntamente com 3 gotas de H₂SO₄ [1N] e observado o desenvolvimento de cores. A coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteróides livres e a coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

4.2.2.8 Teste para Saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio do teste de esteróides e triterpenoides, foi redissolvido em 5 mL de água destilada e filtrada para um tubo de ensaio. Em seguida o tubo foi agitado fortemente por dois a três minutos e observado se houve formação de espuma. Espuma persistente e abundante indica a presença de saponina.

4.2.2.9 Teste para Alcalóides

A solução aquosa de extrato preparada inicialmente (10 mL) foi alcalinizada com NH_4OH [1N] até pH 11 e extraído suas bases orgânicas com três porções de 30, 20 e 10 mL de mistura éter-clorofórmio (3 +1) utilizando um funil de separação. A fase aquosa foi reservada, a solução de éter-clorofórmio foi tratada com NaSO_4 anidro e filtrada e reextraída com três pequenas porções sucessivas de HCl diluído (0,1 N). A solução orgânica foi rejeitada e a aquosa repartida em dois tubos de ensaio sendo adicionada em cada um reagente de precipitação de alcalóides respectivamente: Mayer e Dragendorff.

Precipitado floculoso, pesado é indicativo de alcalóides.

4.2.3 Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico do extrato bruto etanólico da casca de *Hortia brasiliiana* foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi utilizada água ultra pura obtida no laboratório por destilação e subsequente purificação em Sistema Academic MilliQ (Millipore). Metanol grau cromatográfico foi adquirido da empresa Merk (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Foram utilizadas pipetas automáticas Eppendorf de volume variável (5-50, 10-100, 20-200, 100-1000 μL), seringas de vidro (B-D Yale) de 10 mL e unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm . Para o preparo das soluções foram usadas vidrarias calibradas, comuns de laboratório.

As separações cromatográficas foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters Alliance 2695 (Waters, Manchester, UK) composto por bomba, injetor automático de amostras, forno de coluna e detector UV Waters (2475), coluna analítica C18, Waters Symmetry (150 mm x 4,6 mm x 5 μm) e pré-coluna Waters Symmetry WAT054225.

A eluição por gradiente teve como fase móvel metanol e água, a condição esta disposta na Tabela 5.

Tabela 5: Gradiente da mistura de MeOH-H₂O utilizado na CLAE do extrato etanólico de cascas de *Hortia brasiliana*

Tempo	Fluxo	% A	% B
0	1	20	80
60	1	100	0
65	1	20	80
70	1	20	80

O fluxo foi de 1,0 mL/min, o volume da amostra injetado foi de 10,0 µL, à temperatura de 30°C. A identificação dos compostos foi feita com espectros obtidos entre 200 e 800 nm pelo detector de arranjo de diodos.

4.2.4 Estudo *in vitro* da Atividade Sequestradora de Radicais Livres

O método utilizado para determinação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto de *Hortia brasiliana* foi a o ensaio utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), baseado em seu sequestro promovido pelos compostos estudados. Preparou-se uma solução metanólica de DPPH 40,0 µg/mL (estoque) em balão volumétrico encapado com papel alumínio para que não permitisse a passagem de luz, em seguida construiu-se a curva de calibração com a solução estoque de DPPH em espectrofotômetro a 516 nm. Após a construção da curva de calibração fez-se soluções metanólicas estoques de 240,0 µg/mL para o Extrato Bruto da Casca de *Hortia brasiliana*, a partir destas foram feitas diluições obtendo-se as concentrações de 180, 120, 60, 30 µg/mL. Estas diluições foram lidas em espectrofotômetro a 516 nm após um volume de 0,3 mL destas serem misturadas a 2,7 mL de solução estoque de DPPH, nos tempos 0, 15 e 30 minutos, de modo a conhecermos a cinética da ação antioxidante (SOUSA e SILVA, 2007).

A equação para análise da atividade antioxidante total foi: $\%AA = \frac{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco]) \times 100}{Abs_{controle}}$. Após a determinação da atividade antioxidante total, determinou-se a concentração eficiente que é capaz de reduzir 50% do DPPH inicial (CE₅₀). O antioxidante usado para comparação com a atividade antioxidante dos dois extratos foi o Butilhidroxianizol (BHA), sendo as determinações realizadas em triplicata (SOUSA e SILVA, 2007)

A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH_{REM}), conforme a Equação: $\%DPPH_{REM} = [DPPH]_{T=t} / [DPPH]_{T=0} \times 100$, onde $[DPPH]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato e $[DPPH]_{T=0}$ é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 mg/mL (100 µmol/mL) (SOUSA e SILVA, 2007).

4.2.5 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de *Hortia brasiliiana*

4.2.5.1 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de *Hortia brasiliiana* em Lesões Gástricas Induzidas por Indometacina.

Foi escolhido o modelo murino e o projeto para todos os modelos de indução foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Biologia e Ciências da Saúde de Viçosa (UNIVIÇOSA).

No primeiro teste, os animais foram divididos em 4 grupos, com 5 animais em cada grupo, para realização do *screening* de doses referente a formulação Suspensão elaborada com o Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* (EEHb). O modelo de indução de úlceras gástricas escolhido para o teste de doses foi o Indometacina, os animais, antes de cada tratamento, foram mantidos em gaiola especial (para evitar coprofagia), sem maravalha e com água *ad libitum*. As dosagens administradas de Suspensão obedeceram a uma escala logarítmica de 1 mg/Kg, 10 mg/Kg, 100 mg/Kg de EEHb, sendo em um grupo utilizado somente o veículo da formulação (Tween 85 %, controle negativo). De acordo com os resultados obtidos foi escolhida a dose com melhor resposta terapêutica para sequência dos estudos.

No segundo ensaio, os animais foram divididos em 5 grupos (5 animais por grupo), sendo que em 3 grupos foram administradas as Nanoemulsões preparadas com o EEHb nas doses, 1mg/Kg, 10mg/Kg, 100mg/Kg, um grupo tratado somente com veículo da formulação (Tween 85 %, controle negativo) e um grupo tratado com a dose de melhor resultado da formulação Suspensão de EEHb do primeiro ensaio. Diante do resultado dos dois testes foi realizado o ensaio final com a melhor dose do primeiro (Suspensão de EEHb) e do segundo teste (Nanoemulsão de EEHb) mais os fármacos de referência e o grupo tratado com veículo, ou seja 5 tipos de tratamento com 6 animais em cada grupo

Para os três ensaios, Ratos Wistar (180-200 g), antes de cada tratamento, foram mantidos em gaiola especial (para evitar coprofagia), sem maravalha e com água *ad libitum* e jejum por 24 horas. As lesões gástricas foram induzidas pela administração subcutânea de 50 mg/kg indometacina Indocid[®] (Merck Sharp & Dohme), solubilizada em solução salina utilizando algumas gotas de Tween 85 (Sigma). A dose foi administrada, de acordo com o método descrito por Djahanguiri (1969), em um volume de 0,5 mL de indometacina para cada 100 gramas por peso corporal do animal.

O tratamento oral com as formulações (suspensão e emulsão) dos extratos de *Hortia brasiliiana* e os controles foram administrados por gavagem 30 minutos antes do agente indutor e repetido 3 horas após a indução. No terceiro teste além da melhor dose de Nanoemulsão e Suspensão do EEHb, os animais dos grupos controles receberam, veículo (Tween 85 %, controle negativo), a ranitidina (100 mg / kg) e o omeprazol (10 mg / kg). Após 6 h de tratamento (para todos os ensaios), os animais foram sacrificados por anestesia profunda (Xilazina 2% associada com Ketamina 10%), os estômagos foram removidos, dissecados ao longo da curvatura maior, fotografados e examinados.

O índice total da lesão foi determinado para os três ensaios conforme descrito por Takagi *et al.* (1969), os parâmetros utilizados foram perda de muco, número de petéquias, presença de hemorragia, perda de pregas, coloração da mucosa e edema. As lesões ulcerativas foram medidas e classificadas de acordo com a severidade em lesões de nível 1 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão), lesões de nível 2 (úlceras > 3mm de extensão). Em cada tratamento o índice de lesões ulcerativas (I.L.U.) foi calculado através da equação:

$$I.L.U. = (\Sigma \text{ parâmetros de lesão}) + (1 \times \Sigma \text{ área de lesões nível 1}) + (3 \times \Sigma \text{ área de lesões nível 2}).$$

Para o terceiro ensaio os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, analisados e fotografados. A área das ulcerações foi medida através do software *Image J*. Os resultados correspondentes aos valores calculados e as áreas de lesões foram expressos como média \pm erro padrão das médias, para a medição de lesões foi utilizada uma lupa estereoscópica binocular com aumento de 6,3x.

4.2.5.2 Avaliação da atividade Gastroprotetora de *Hortia brasiliiana* em Lesões Gástricas Induzidas por Etanol

De acordo com o método descrito por Robert *et al.*(1979) as lesões gástricas foram induzidas por etanol, em ratos Wistar mantidos em jejum por 24 horas. Os animais, antes de

cada tratamento, foram mantidos em gaiola especial (para evitar coprofagia), sem maravalha e com água *ad libitum*. Nove grupos de 6 animais cada foram tratados oralmente com o veículo (Tween 85 %, controle negativo), omeprazol (10 mg/kg), ranitidina (100 mg/kg), Suspensão e Emulsão de Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* na doses de 1.0 mg/Kg, 10 mg/Kg e 100 mg/Kg. Sessenta minutos após os tratamentos mencionados foi administrado etanol (Sigma) 70% v / v, com uma dose de 0,5 mL para cada 100 g de peso corporal. Uma hora após a administração do agente necrotizante, os animais foram sacrificados por anestesia profunda (Xilazina 2% associada com Ketamina 10%), os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para serem fotografados e realizados os procedimentos de medida e classificação das lesões gástricas como foi descrito por TAKAGI et al. (1969).

Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, analisados e fotografados. A área das ulcerações foi medida através do software *Image J*. A determinação do índice de lesão gástrica induzida por etanol foi calculado pela multiplicação dos pontos obtidos na observação da mucosa. Os parâmetros utilizados foram perda de muco, número de petéquias, presença de hemorragia, perda de pregas, coloração da mucosa e edema. As lesões ulcerativas foram medidas e classificadas de acordo com a severidade em lesões de nível 1 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão), lesões de nível 2 (úlceras > 3mm de extensão). Em cada tratamento o índice de lesões ulcerativas (I.L.U.) foi calculado através da equação:

$I.L.U. = (\Sigma \text{parâmetros de lesão}) + (1 \times \Sigma \text{área de lesões nível 1}) + (3 \times \Sigma \text{área de lesões nível 2})$. Os resultados correspondentes aos valores calculados e as áreas de lesões foram expressos como média \pm erro padrão das médias, para a medição de lesões foi utilizada uma lupa estereoscópica binocular com aumento de 6,3x.

4.2.5.2 Avaliação da Atividade de *Hortia brasiliiana* em Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético

Úlceras gástricas foram induzidas experimentalmente em ratos Wistar, separados em 5 grupos com 5 animais cada, de acordo com o método descrito por Motilva *et al* (1996). Antes da indução da lesão, os animais foram submetidos a uma dieta alimentar fornecendo ração nos seguintes horários: 09h30-10h30 e 21h30-22h30, durante sete dias, após esta fase de adaptação iniciou-se o procedimento cirúrgico. Os animais foram anestesiados com ketamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, em seguida foi realizada a incisão abdominal. O estômago foi exposto e 50 ml de ácido acético a 5% e a 10% foram injetados através da membrana subserosa na porção anterior do estômago formando 2 lesões, posteriormente o órgão de estudo foi lavado cuidadosamente com salina 0,9% e a parede abdominal foi suturada. Após a

recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e continuaram sob regime de restrição alimentar, com livre consumo de água.

Os tratamentos foram iniciados 24 horas após a cirurgia, administrando-se por via oral o veículo (água - 0,5 mL/100 g), omeprazol (10 mg/kg), ranitidina (100 mg/kg) e as duas formulações (Suspensão e Nanoemulsão) na dose de 100 mg/Kg de EEHb, 30 minutos após o consumo de ração, uma vez ao dia, durante oito dias. Ao final deste período de tratamento, os ratos foram sacrificados, os estômagos removidos, analisados e fotografados. A área de ulceração foram determinados como descrito por Takagi *et al.* (1969). A medida das ulcerações foi realizada utilizando o programa *Image J*.

Após as análises macroscópicas, os estômagos foram fixados em solução água/formol a 9:1. Posteriormente foram enviados para laboratório de patologia animal (departamento de medicina veterinária, UFV) para preparo das lâminas histológicas. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e analisados no mesmo laboratório.

A avaliação do processo inflamatório na região gástrica foi realizada em 20 campos microscópicos aleatórios (objetiva de 40X) na região fúndica dos estômagos dos animais. O processo inflamatório foi classificado como ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3) (SANTOS, 2006). Também foi contado o número de novos vasos sanguíneos formados para avaliação da angiogênese dos diferentes grupos tratados

4.2.5.3 Avaliação da Atividade Anti-Secretora Ácida de *Hortia brasiliana* em Modelo de Ligadura do Píloro

Ratos Wistar (180-200 g), antes de cada tratamento, foram mantidos em gaiola especial (para evitar coprofagia), sem maravalha e com água *ad libitum* e jejum por 24 horas. Os animais divididos em 5 grupos (6 animais por grupo) e recebem por via oral o veículo (água), extrato (em 3 doses), omeprazol (10 mg/kg), 40 minutos antes da ligadura do píloro sendo posteriormente anestesiadas com Ketamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg. O estômago foi exposto através de uma incisão de aproximadamente 2 cm no abdômen e realizado a ligadura do píloro. A parede do abdômen foi suturada e quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos com anestesia profunda (Ketamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg), seus estômagos removidos após o pinçamento do esôfago para evitar perda do material secretado.

O órgão foi aberto pela curvatura maior e lavado com água, seco em gaze. A secreção gástrica foi coletada com o auxílio de uma seringa, centrifugado em tubos de ensaios (1500 rpm durante 30 minutos), o seu volume foi determinado utilizando uma proveta de 10 mL e o

pH medido em pH-metro. A acidez total ($[H^+]/mL/4\ h$) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2 % como indicador ácido-base (DOMER, 1971)

4.2.7 Avaliação da Atividade Tóxica de *Hortia brasiliiana* em Ensaio de Letalidade Utilizando *Artemia salina* sp

Na obtenção de *Artemia salina*, ovos deste microcrustáceo foram colocados para eclodir em aquário com solução salina (sal marinho artificial Red Sea[®]) na concentração 38.0 g/L, sob oxigenação e radiação luminosa por 48 h. Posteriormente 40.0 mg de extrato seco de *Hortia brasiliiana* foi diluído em 4.0 mL de Etanol PA e dessa solução foi retirado alíquotas de 5, 50, 250 e 500 μ L e transferidas para os tubos de teste, constituindo 4 tratamentos para cada composto testado, com 3 repetições. Em sequência, evaporou-se o solvente e adicionou-se 5,0mL (por tubo) de solução salina nos tratamentos, resultando nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 μ g/mL. Os controles utilizados foram o Lapachol, preparado com os mesmos procedimentos resultando em 4 tratamentos com 3 repetições, solução salina com 1 tratamento e 3 repetições (branco). Em cada tubo teste foi transferido dez larvas (3 repetições) de *A. salina* do tipo *nauplii*, que permaneceu durante 24h nas soluções, em seguida analisou-se o índice de mortalidade para determinar a toxicidade dos compostos, calculando a DL_{50} . Para obtenção dos valores de DL_{50} foi utilizada a análise Probitos, através do software MINITAB 14, com 95% de confiança (RUIZ, *et al.*, 2005) (MCLAUGHLIN, *et al.*, 1995).

4.2.8 Avaliação Antifúngica de *Hortia brasiliiana*.

A avaliação antifúngica da planta utilizou o Método de Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), segundo a Técnica de Microdiluição em Caldo preconizada pelo CLSI, documento M27-A2. O ensaio antifúngico foi dividida em quatro etapas: preparo das diluições do extrato da casca de *Hortia brasiliiana*, preparo das diluições dos antifúngicos (Cetoconazol[®] e Fluconazol[®]), preparo dos inóculos com espécies de *Candida* (*C. Albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) e por fim o plaqueamento.

Todas as amostras foram solubilizadas em DMSO (Merck), na concentração de 1% do volume da solução mãe, à exceção do fluconazol que foi diluído em água destilada esterilizada. A partir dessas soluções foi procedida à preparação de diluições seriadas das

amostras em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) conforme a metodologia empregada (CLSI – documento M27-A2). Para a utilização do meio RPMI, adicionou-se 10,4 g de liofilizado, 34,4 g de MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) e 1000 ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7,0 e o meio foi esterilizado por filtração, utilizando-se membrana de nitrocelulose de poro 0,22 μm (Millipore). Este meio foi mantido em frasco esterilizado, conservado sob refrigeração (2 - 8° C).

Nas diluições para os compostos, 12.0 mg destes (quantidade de composto suficiente para 10.0 mL de preparado) foram diluídos em 6.0 mL de DMSO, resultando em uma solução com concentração 2000 $\mu\text{g/mL}$ contendo DMSO e composto em questão, em seguida foram feitas diluições sucessivas com o meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) obtendo-se dez concentrações 512.0, 256.0, 128.0, 64.0, 32.0, 16.0, 8.0, 4.0, 2.0 e 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (extrato, DMSO e RPMI).

Já para os antifúngicos, 5.0 mg de Fluconazol[®] e Cetoconazol[®] foram diluídos em 5.0 mL de DMSO resultando em duas soluções com concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, em seguida as soluções com antifúngicos foram diluídas ao adicionar o meio de Cultura RPMI, sendo as diluições do Fluconazol[®] 64.0 $\mu\text{g/mL}$, 32.0 $\mu\text{g/mL}$, 16.0 $\mu\text{g/mL}$, 8.0 $\mu\text{g/mL}$, 4.0 $\mu\text{g/mL}$, 2.0 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.125 $\mu\text{g/mL}$ e do Cetoconazol[®] 32.0 $\mu\text{g/mL}$, 16.0 $\mu\text{g/mL}$, 8.0 $\mu\text{g/mL}$, 4.0 $\mu\text{g/mL}$, 2.0 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.125 $\mu\text{g/mL}$, 0.0625 $\mu\text{g/mL}$.

Foram utilizados as espécies *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750 pertencentes ao Laboratório de Micologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. Para o crescimento e manutenção das culturas foi utilizado o meio Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai – Índia). As amostras de *Candida* spp. foram cultivadas em tubos contendo meio Sabouraud sólido e incubadas a 28°C durante 24 horas. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente com alça esterilizada e ressuspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% estéril. O inóculo foi preparado com cerca de 10⁶ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), equivalente a escala de turvação 0,5 da escala MacFarland. A raspagem do inóculo deve ser feita 24 horas antes do plaqueamento, sendo depois colocado para crescer em um tubo separado.

A placa foi montada com um controle negativo (RPMI) e um controle positivo (RPMI e inóculo). O plaqueamento foi feito da menor concentração para a maior, começando pelo controle negativo, assim evita-se erros analíticos. Na parte superior da placa fica o composto testado e na inferior o antifúngico padrão, feito isso placa foi colocada em uma estufa

aquecida a 28°C por dois dias, no fim do prazo determinado foi feita a leitura dos resultados, portando foram feitas 2 placas uma comparando composto/ Fluconazol® e a outra composto/ Cetoconazol®

A determinação da CIM foi realizada segundo protocolo M27-A2 do CLSI, em microplacas com 96 poços. Em cada orifício foram dispensados 100 µL da amostra teste e 100 µL do inóculo de cada espécie de *Candida* spp., perfazendo volume final de 200 µL em cada poço. Todas as concentrações foram testadas em duplicata. As placas foram incubadas a 28°C e as leituras foram realizadas após 48 horas.

As CIMs foram obtidas por leitura visual e expressas em redução de crescimento, comparadas ao controle positivo, sendo de 80% em Fluconazol e Cetoconazol e 100 % nas amostras do Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* testada (GUPTA e KOHLI, 2003).

Resultados e Discussão

5.0 Resultados e Discussão

5.1 Rendimentos do Extrato Etanólico de Casca de Hortia brasileira

Na tabela abaixo estão listados parte da planta, método utilizado para extração, solvente e rendimento para cada parte da planta.

Tabela 6: Condições de preparação dos extratos e rendimentos

Parte da Planta	Método de Extração	Solvente	Quantidade de pó (g)	Quantidade de extrato (g)	Rendimento
Casca (Cs)	Percolação(P)	Etanol	1200 g	61,875 g	5,15%

5.2 Prospecção de Constituintes Fitoquímicos do Extrato Hidroalcoólico de *Hortia brasiliana*

5.2.1 Teste para Fenóis e Taninos

O resultado do teste para fenóis e taninos utilizando como reagente o cloreto de ferro apresentou precipitado escuro de tonalidade verde no tubo 1. O resultado indica a presença de taninos condensados de acordo com a figura 12. O tubo H representa a solução de extrato sem a presença do FeCl_3 e o tubo B representa o teste em branco (água e FeCl_3), ambos apresentando resultado negativo.

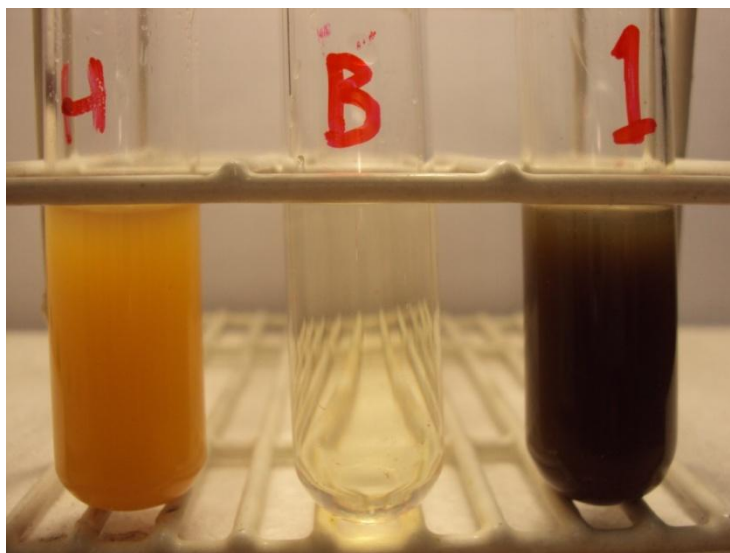


Figura 12: Teste para fenóis e taninos do extrato bruto de *Hortia Brasiliana* (Mattos 1997)

5.2.2 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides.

O resultados do teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides não apresentou as colorações características (figura 13), indicando a ausência destes metabólitos secundários. O tubo H representa a solução de extrato de Hb, o tubo dois, três, quatro representam as soluções de extratos de Hb em pH 3; 8,5 e 11 respectivamente.



Figura 13: Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides do extrato bruto de *Hortia Brasiliana* (Mattos 1997)

5.2.3 Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas

O resultado do teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas utilizando como reagente magnésio granulado e HCl não apresentou as colorações características (figura 14), indicando a ausência destes metabólitos secundários. O tubo H representa a solução de extrato de Hb, o tubo cinco representa solução de extrato de Hb em pH 3, o tubo sete a solução de extrato de Hb como reagente magnésio granulado e HCl, respectivamente.

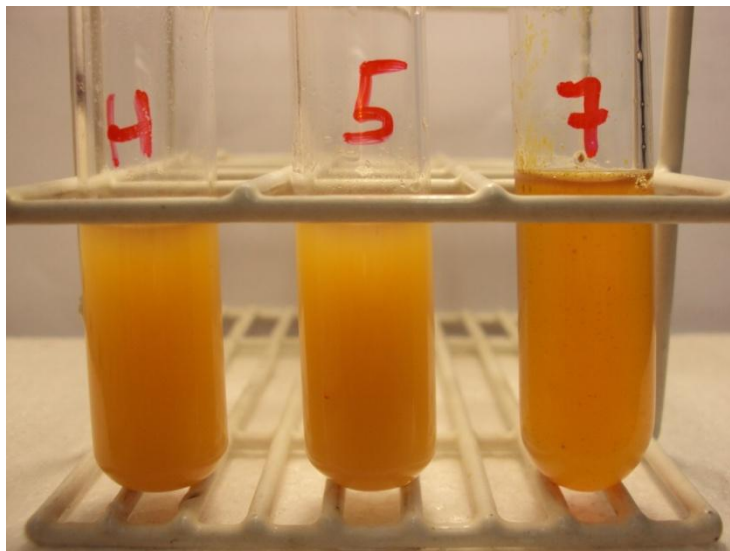


Figura 14: Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas do extrato bruto de *Hortia Brasiliana* (Mattos 1997)

5.2.4 Teste para Esteróides e Triterpenoides

O resultado do teste para Esteróides e Triterpenoides utilizando como reagente anidrido acético e H_2SO_4 apresentou coloração azul evanescente seguida de verde permanente. O resultado indica a presença de esteróides livres de acordo com a figura 15. O tubo H representa a solução de extrato de Hb sem a presença do reagente teste e o segundo tubo em coloração verde representa a solução de extrato de Hb com reagente anidrido acético e H_2SO_4 , apresentando resultado positivo para o ensaio.

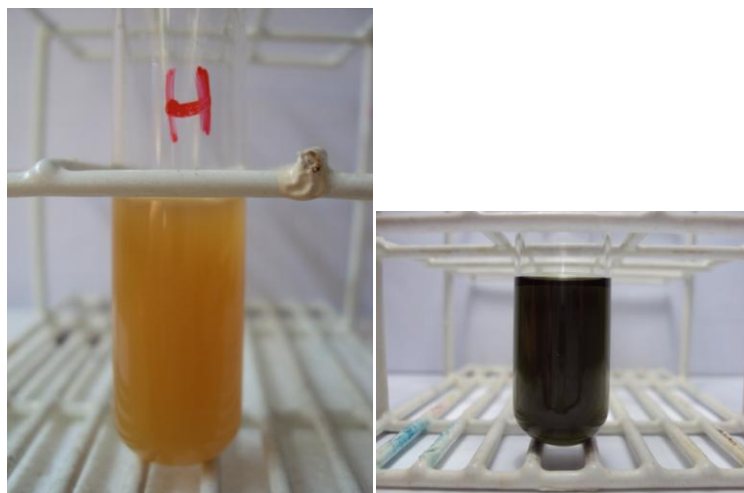


Figura 15: Teste para esteróides e triterpenoides do extrato bruto de *Hortia Brasiliana* (Mattos 1997)

5.2.5 Teste para Saponinas

O resultado do teste para saponinas utilizando resíduo insolúvel em clorofórmio redissolvido em 10 mL de água destilada não apresentou espuma persistente e abundante indicando a ausência de saponinas no extrato de Hb.

5.2.5 Teste para Alcalóides

O resultado do teste para alcalóides utilizando como reagente o reagente de Dragendorff apresentou precipitado floculoso, pesado de tonalidade laranjada no tubo 8. O resultado indica a presença de alcalóides de acordo com a figura 16. O tubo B representa o teste em branco (Reagente de Dragendorff) e o tubo 8 representa a solução de extrato de EEHb na presença do Reagente de Dragendorff, com resultado positivo.

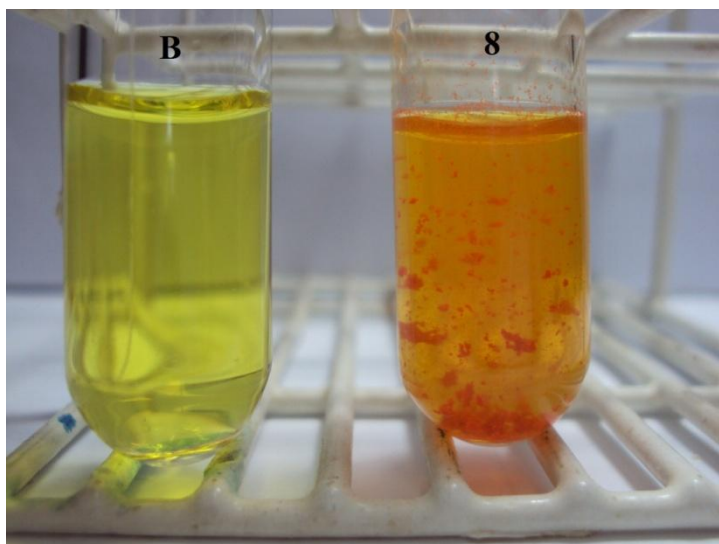


Figura 16: Teste para alcaloides do extrato bruto de *Hortia Brasiliana* (tubo 8) e controle negativo (tubo B) utilizando Reagente de Dragendorff (Mattos 1997)

O resultado do teste para alcalóides utilizando como reagente o Reagente de Mayer apresentou precipitado branco no tubo 8. O resultado indica a presença de alcalóides de acordo com a figura 17. O tubo B representa o teste em branco (Reagente de Mayer) e o tubo 9 representa a solução de extrato de EEHb na presença do Reagente de Mayer, com resultado positivo.

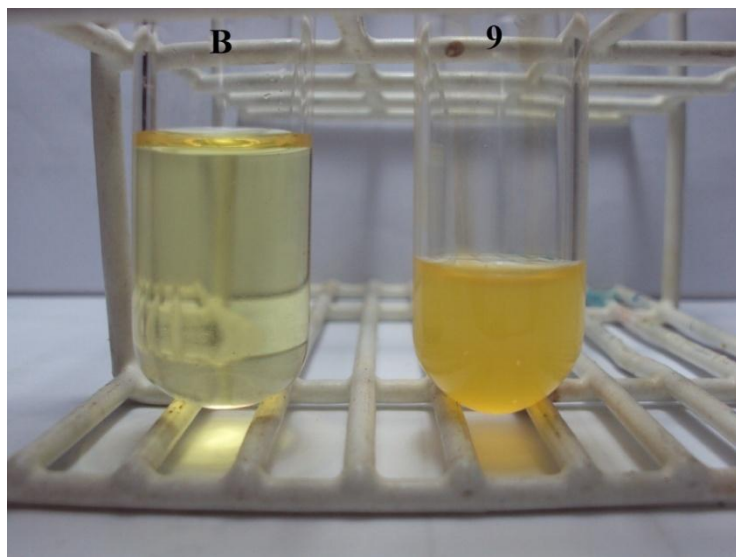


Figura 17: Teste para Teste para alcalóides do extrato bruto de *Hortia Brasiliana* (tubo 9) e controle negativo (tubo B) utilizando Reagente de Mayer (Mattos 1997)

5.3 Perfil Cromatográfico do Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* por CLAE

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), com detecção ultravioleta foi o método de escolha por apresentar características adequadas à análise de amostras de origem vegetal. A CLAE tem se mostrado vantajosa em relação a outras metodologias por ser uma técnica rápida, de custo acessível na atualidade à maioria dos laboratórios, específica e que permite a determinação simultânea de diferentes metabólitos (BOMPADRE, *et al.*, 1998.)

Os cromatogramas obtidos do extrato de *Hortia brasiliiana* são mostrados nas figuras 18 e 20. A melhor resolução dos picos foi obtida no comprimento de onda de 226 nm, revelando um pico majoritário no tempo de retenção de 40 minutos. Os espectros ultravioletas obtidos nas análises do extrato da planta estudada foram comparados com os espectros dos possíveis metabólitos presentes segundo os estudos de Severino *et al.*, (2009).

No cromatograma obtido do EEHb utilizando a condição mostrada no item 4.2.3, foi possível verificar a presença de picos com absorção UV nos comprimentos de onda entre 200 e 345nm (figura 19). Essa faixa de absorção é característica dos grupos cromóforos dos alcalóides indolopiridoquinazolínicos (PELLATI, *et al.*, 2006), podendo sugerir a presença do alcalóide Ruteocarpina presente na espécie, como descrito na literatura. Os espectros de UV foram comparados (figura 23) com os espectros de alcalóides identificados na espécie *Evodia ruteocarpa* da mesma família de *Hortia brasiliiana* (Rutaceae). Os dois espectros apresentaram o mesmo perfil de curva, com picos na mesma faixa de absorvância (200 e 345 nm).

Apesar da evidência não podemos afirmar que o alcalóide presente em nossa espécie estudada seja a Ruteocarpina, portanto os extratos foram enviados para análise utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplado a Espectrometria de Massas (LCMS-IT-TOF – Shimadzu) no Laboratório de Caracterização Molecular - Espectrometria de Massas da Universidade Federal de Ouro Preto a fim de determinar a substância presente. Porém os resultados das análises não foram concluídos até a presente data.

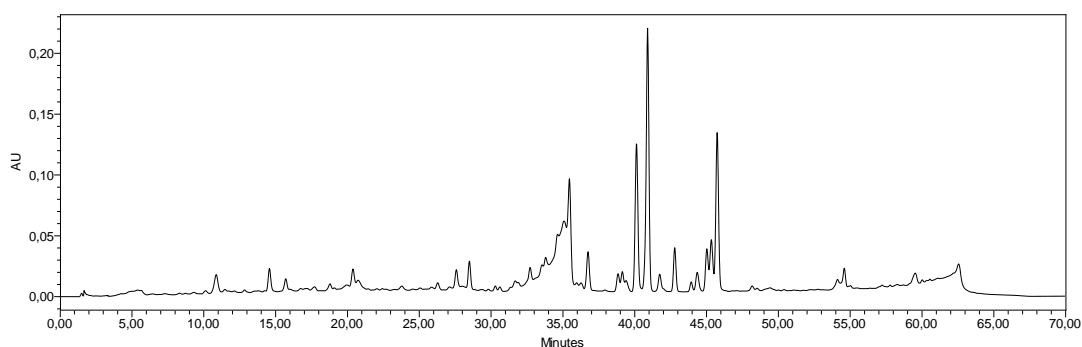


Figura 18: Perfil cromatográfico obtido por CLAE para o extrato etanólico de *Hortia brasiliensis* casca. Detecção no UV 254 nm.

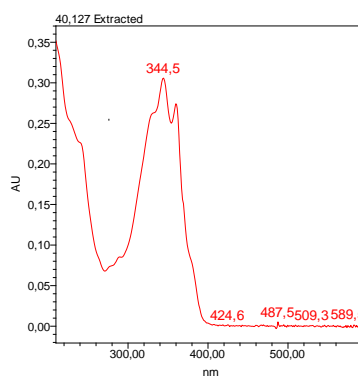


Figura 19: Espectro Ultravioleta obtido por CLAE do extrato etanólico de *Hortia brasiliensis* à 344nm

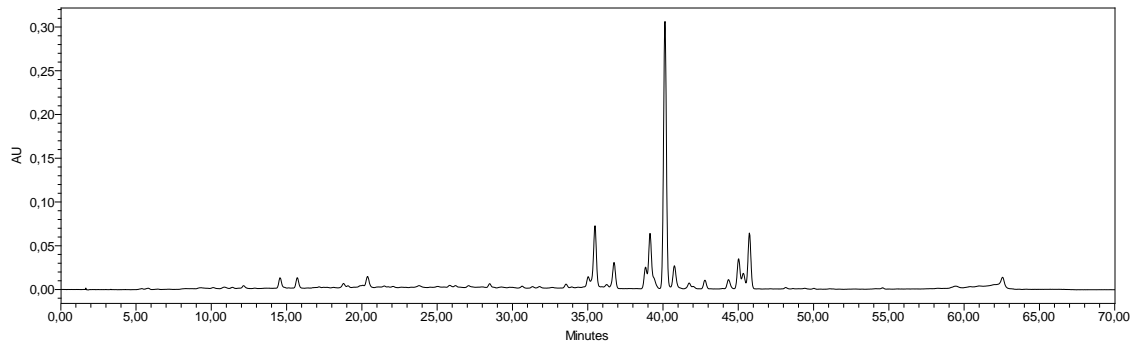


Figura 20: Perfil cromatográfico obtido por CLAE para o extrato etanólico de *Hortia brasiliensis* casca. à UV 226 nm

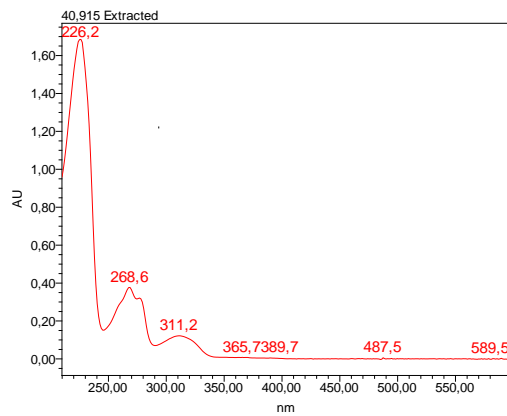


Figura 21 Espectro Ultravioleta obtido por CLAE para o extrato etanólico de *Hortia brasiliensis* à 226 nm

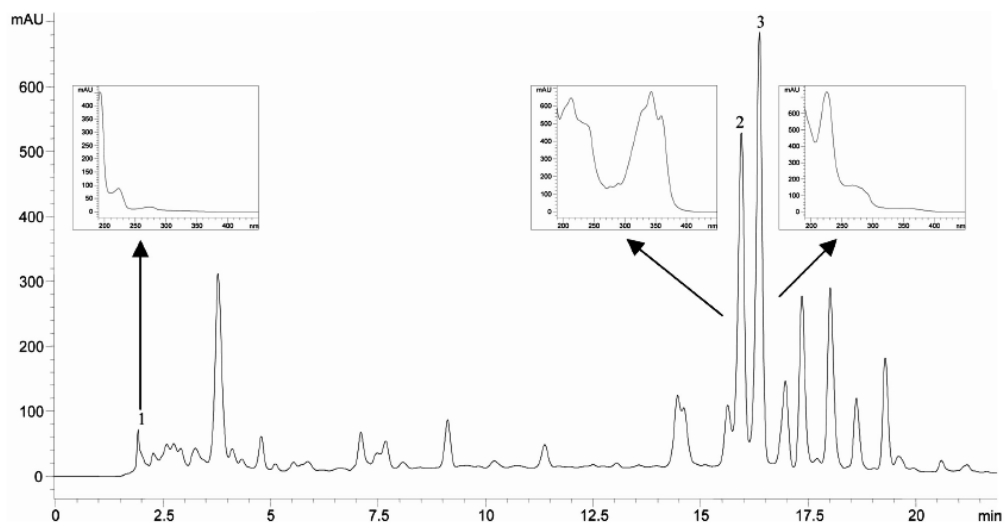


Figura 22: Cromatograma obtido por CLAE do extrato metanólico de frutos de *Evodia rutaecarpa* à 226nm. Identificação dos picos: (1)-synefrina; (2) rutaecarpina; (3) evodiamina.

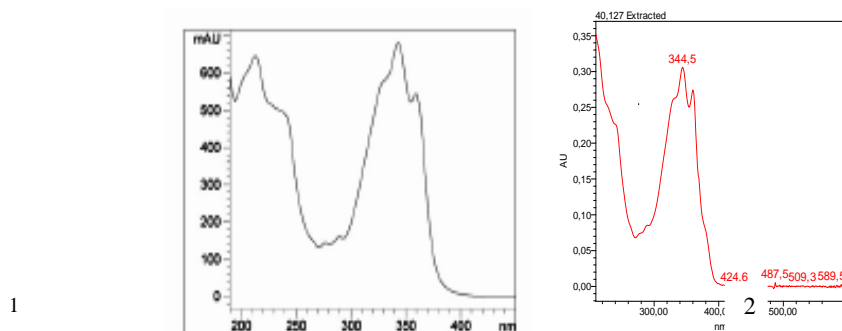


Figura 23: Espectro Ultravioleta de Rutaecarpina obtido por CLAE do extrato metanólico de frutos de *Evodia rutaecarpa* (1) em comparação com o UV obtido por CLAE do extrato etanólico de *Hortia brasiliana* (2)

5.4 Estudo in vitro da Atividade Sequestradora de Radicais Livres

A atividade sequestradora do radical livre DPPH•, de coloração púrpura, absorve a 516 nm e por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada Concentração Eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA e SILVA, 2007).

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AA) do Extrato Etanólico de *Hortia brasiliana* (casca) e do controle positivo BHA, nas concentrações de 60, 120 e 180 µg/mL, determinada pelo ensaio do DPPH, estão apresentados na Figura24.

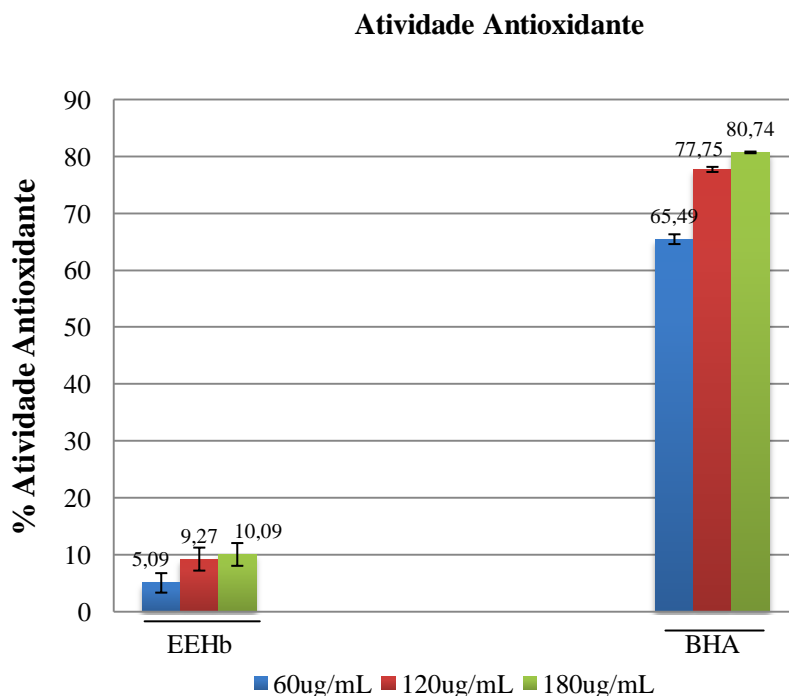


Figura 24: Gráfico da Atividade Antioxidante do Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* (EEHb) e BHA analisados nas concentrações de 60, 120 e 180 µg/mL.

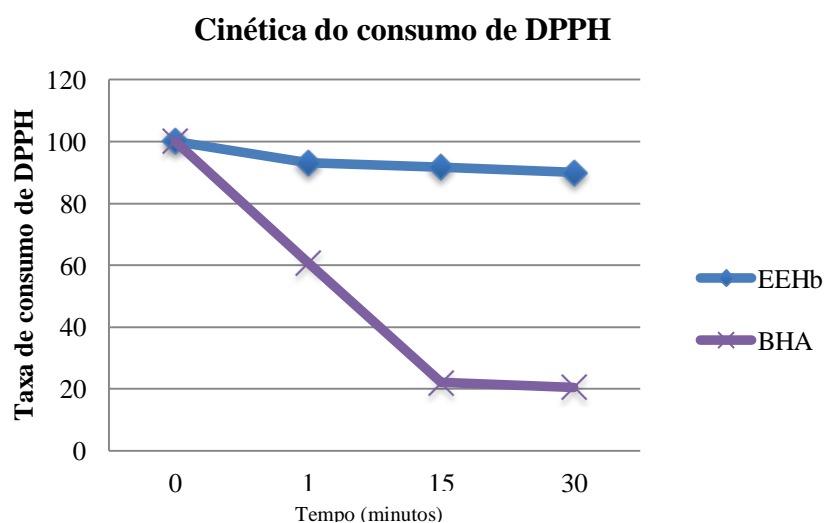


Figura 25: Gráfico da Cinética de Consumo de DPPH pelo Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* (EEHb) e BHA analisados na concentração de 180 µg/mL.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AA) do extrato da espécie estudada apresentou, nas concentrações de 60, 120 e 180 µg/mL, taxa de 5,09%, 9,27% e 10,09% respectivamente de poder antioxidante. Comparada ao padrão BHA que obteve 65,49%, 77,75% e 80,75% de atividade antioxidante no mesmo intervalo de concentração 60, 120, 180 µg/mL, respectivamente, podemos concluir que a espécie *Hortia brasiliiana* não

apresentou atividade antioxidante, sendo significativa a diferença nos valores de CE50 obtidos entre o EEHb e o BHA.

As medidas das absorções foram realizadas em três tempos diferentes sendo possível determinar a cinética de sequestro do radical DPPH pelo EEHb e BHA, na concentração 180µg/mL. (figura 25) que está representado pela porcentagem de DPPH remanescente pelo tempo De acordo com o gráfico nota-se que o EEHb apresentou uma cinética final de sequestro do DPPH (valor de 10,05) bem diferente ao antioxidante BHA (valor 87,75), mostrando ausência de atividade sequestradora confirmando as informações sobre a atividade antioxidante do extrato de *Hortia brasiliiana*.

Muitas substâncias naturais, obtidas das plantas, têm sido identificadas como captadoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo o corpo humano dos efeitos destes, bem como retardando o aparecimento de muitas doenças crônicas (GÜLCIN, *et al.*, 2003). As substâncias com núcleo fenólico apresentam destaque especial como eficientes captadores radicalares, como demonstrado por vários estudos. Apesar da indicação da presença de e taninos pelos ensaios de classes (MATTOS 1997) associado as possíveis atividades antioxidante, o efeito gastroprotetor parece não ser devido, ao menos principalmente, à uma atividade sequestradora de radicais livres (WU, *et al.*, 2005) (ANDRADE, *et al.*, 2007).

5.5 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de *Hortia brasiliiana*

5.5.1 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de *Hortia brasiliiana* em Lesões Gástricas Induzidas por Indometacina.

No início do trabalho, foram realizados dois ensaios pilotos utilizando o modelo de indução por indometacina com a finalidade de determinar qual dose poderia apresentar a melhor atividade gastroprotetora. Nesta etapa não foi utilizada os medicamentos omeprazol e ranitidina, as dosagens obedeceram a uma escala logarítmica de 1, 10 e 100 mg/Kg de extrato sendo formulada uma suspensão para o experimento inicial. Os resultados deste ensaio (Tabela 7, Figura 26) mostraram que as doses de 10 mg/Kg e 100 mg/Kg de (EEHb) apresentaram valores significantes de atividade gastroprotetora com um p valor de 0,0078.

Tabela 7: Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$.

Grupo	Símbolo	I.L.U.
Grupo doente tratado com veículo	CN	12,50 \pm 1,50
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 1mg/kg	S 1	8,75 \pm 2,17
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 10mg/kg	S 10	*4,75 \pm ,0,94
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 100mg/kg	S 100	*5,25 \pm 0,47

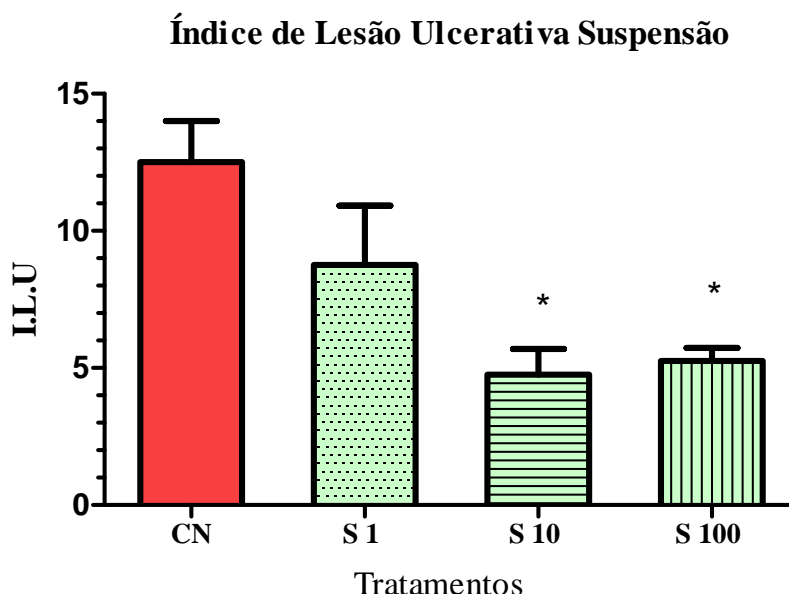


Figura 26: Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$.

Na sequência dos trabalhos foi realizado um teste com o mesmo modelo de indução, porém utilizando uma nanoemulsão com a mesma variação de doses juntamente com o melhor resultado do experimento inicial (S 100 mg/Kg). Este ensaio piloto revelou que tanto a suspensão quanto a nanoemulsão na dosagem de 100 mg/Kg possuem resultados gastroprotetores significativos (p valor 0,0066) em relação ao grupo doente tratado com veículo (Tabela 8, Figura 27). Por este motivo a suspensão na dose 100mg/kg e a nanoemulsão 100 mg/kg de extrato de *Hortia brasiliiana* foi utilizada como dose padrão para

a continuidade do experimento utilizando agora os medicamentos de referência no tratamento da úlcera gástrica.

Tabela 8: Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$

Grupo	Símbolo	I.L.U.
Grupo doente tratado com veículo	CN	17,80 \pm 3,16
Grupo doente tratado com Nanoemulsão de EEHb dose 1mg/kg	N 1	10,20 \pm 3,74
Grupo doente tratado com Nanoemulsão de EEHb dose 10mg/kg	N 10	11,40 \pm 1,72
Grupo doente tratado com Nanoemulsão de EEHb dose 100mg/kg	N 100	**5,00 \pm 0,89
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 100mg/kg	S 100	*7,20 \pm 0,58

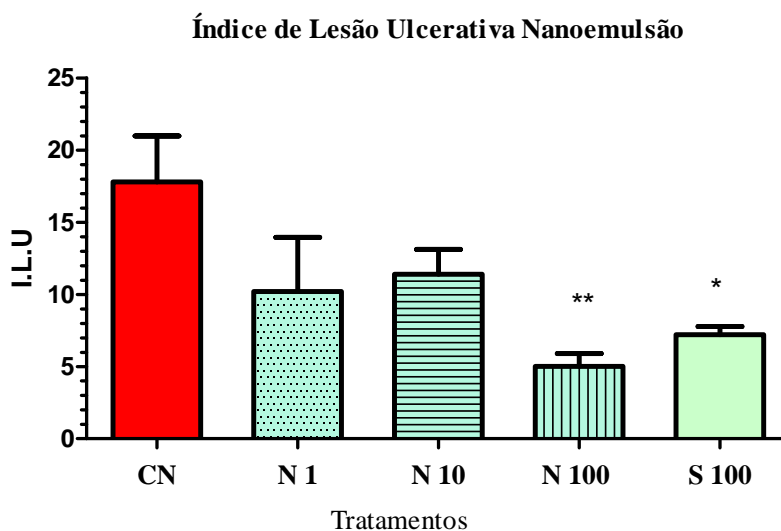


Figura 27: Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$ ** Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$

No terceiro ensaio os resultados obtidos em relação ao efeito Gastroprotetor do extrato de *Hortia brasiliiana* em formulações (suspensão e emulsão) na dose 100 mg/kg e os controles (veículo, omeprazol e ranitidina) referente ao Índice de Lesões Ulcerativas mostram que as

duas formulações do extrato foram capazes de proteger a mucosa gástrica reduzindo significativamente o Índice de Lesão Úlcerativa com um p valor menor que 0,0001 (Tabela 9, Figura 28)

Os valores referentes à área de lesão dos animais tratados com as formulações do extrato mostram redução da área lesada com valores significativos (p valor igual a 0,0133) dos grupos tratados com a nanoemulsão (dose 100 mg/Kg), ranitidina e omeprazol (figura 29, tabela 9).

Tabela 9: Índice de Lesão Úlcerativa (I.L.U.) e Área Total de Lesão (A.T.L.) do ensaio com extrato de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$

Grupo	Símbolo	ATL (cm ²)	I.L.U. (%)
Grupo doente tratado com veículo	CN	(0,23 \pm 0,07)x10 ⁻²	41,25 \pm 6,46
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 100mg/kg	S 100	(0,10 \pm 0,05)x10 ⁻²	6,83 \pm 2,37**
Grupo doente tratado com Nanoemulsão de EEHb dose 100mg/kg	N 100	(0,07 \pm 0,02)x10 ^{-2*}	6,83 \pm 2,60**
Grupo doente tratado com Omeprazol	Omeprazol	(0,05 \pm 0,03)x10 ^{-2*}	9,50 \pm 3,26*
Grupo doente tratado com Ranitidina	Ranitidina	(0,01 \pm 0,01)x10 ^{-2**}	7,50 \pm 0,56*

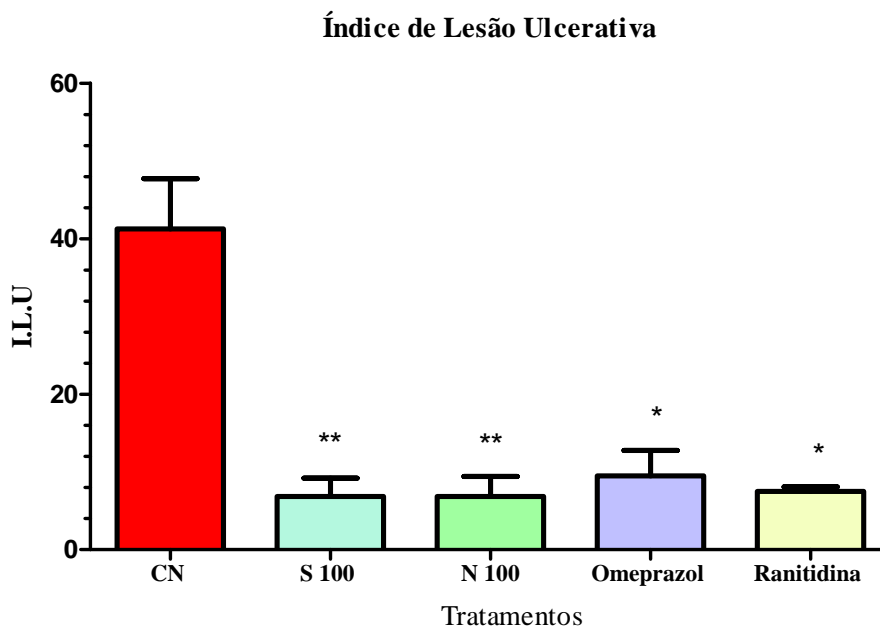


Figura 28: Índice de Lesão Úlcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$

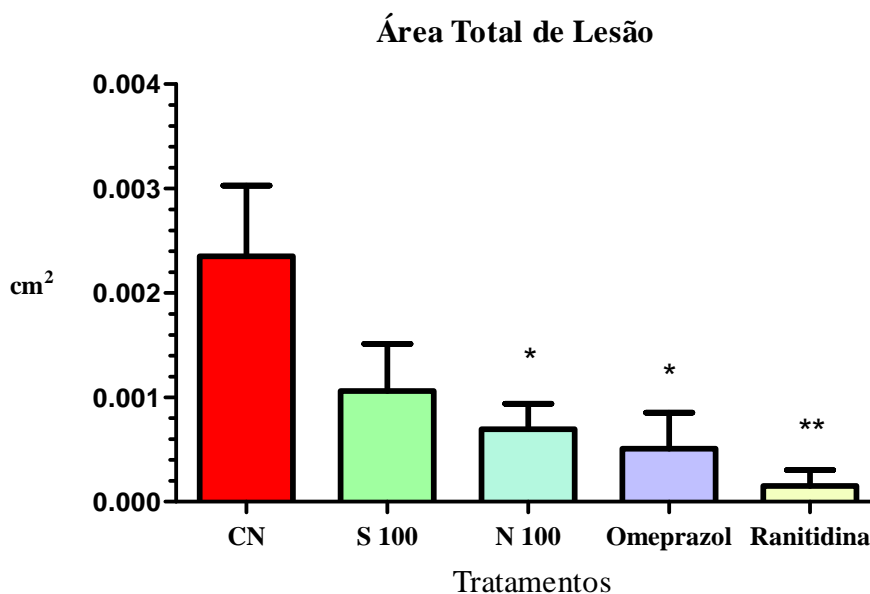


Figura 29: Gráfico representa a Área Total de Lesão do ensaio com formulações do Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$

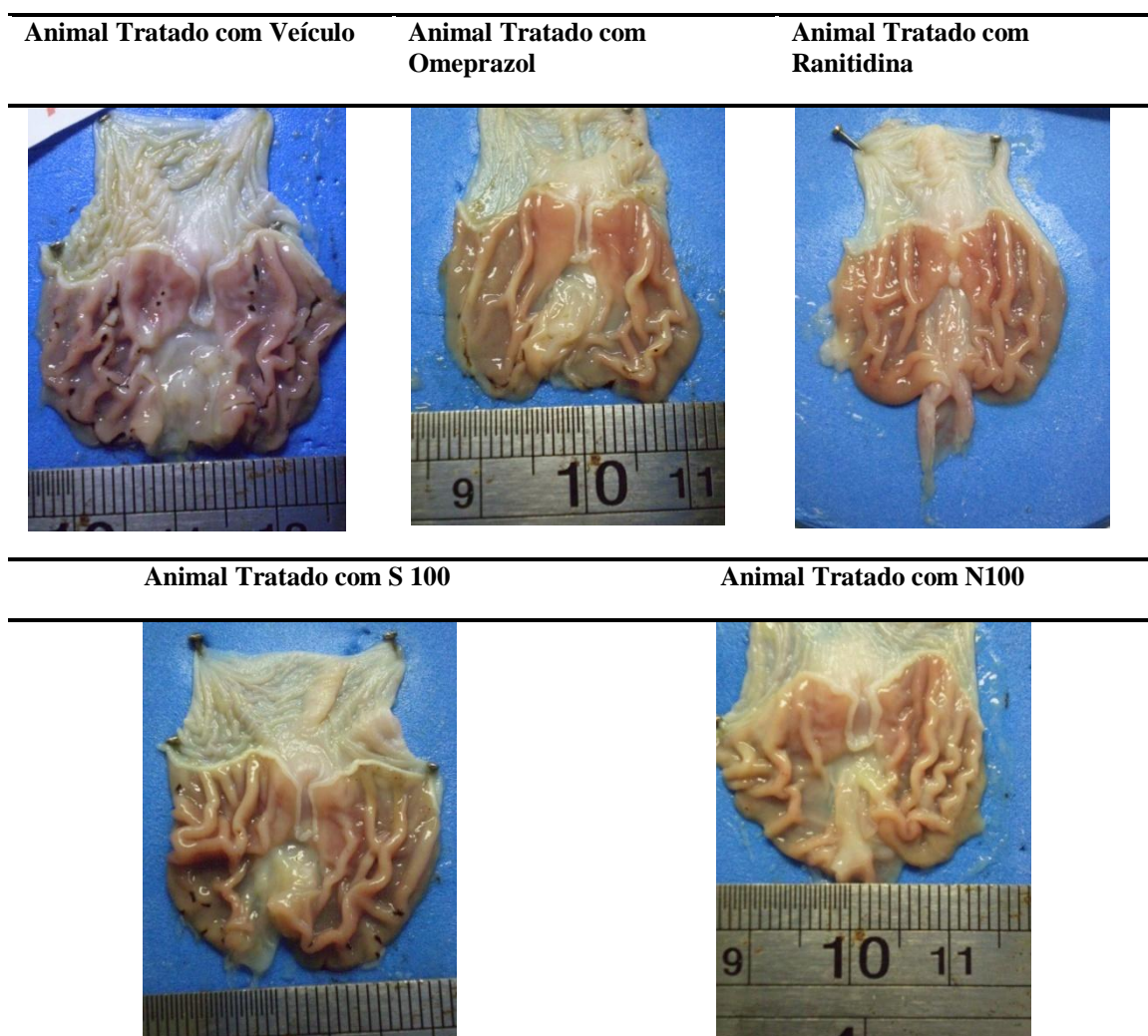


Figura 30: Imagens de estômagos do ensaio utilizando formulações de EEHb, ranitidina, omeprazol e veículo em modelo de indução por indometacina. Foto de apenas um estômago por grupo para ilustrar as aparências dos resultados.

As respostas finais obtidas diante dos ensaios realizados utilizando o Modelo de Indução de lesões gástricas por Indometacina mostraram que o extrato de *Hortia brasiliana* na dose de 100 mg/kg administrado por via oral, foi eficaz em proteger a mucosa gástrica. O teste de Dunnett's foi utilizado na análise estatística, e os resultados obtidos mostram que as duas formulações na dose de 100 mg/kg (S100 e N100) apresentaram, em relação ao grupo controle negativo , resultados significativos ($p < 0,001$) referente ao teste de Índice de Lesão Ulcerativa. Em relação à Área Total Lesada apenas a Nanoemulsão (dose de 100 mg/kg) apresentou, em relação ao grupo controle negativo, resultado significativo ($p < 0,001$).

Para a avaliação dos efeitos gastroprotetores da planta estudada foram utilizados diferentes modelos experimentais, selecionados por envolverem mecanismos diversificados e conhecidos na indução de lesões gástricas. Os modelos clássicos de lesão gástrica aguda que utilizam etanol e indometacina para a indução de úlceras não representam integralmente a patologia humana, uma vez que as lesões gástricas em ratos apresentam uma patologia diferente com lesões superficiais, múltiplas e induzidas por diferentes mecanismos. No entanto, estes modelos experimentais fornecem importantes indicativos da ação de produtos sobre o trato gastrointestinal, já que o uso abusivo de álcool, o estresse excessivo e contínuo e o uso crônico de AINEs são as causas mais frequentemente envolvidas na etiologia das patologias gástricas no homem (LEVENSTEIN, 1998)

Os AINES atuam principalmente inibindo a ciclooxigenase, impedindo a biossíntese de prostaglandinas. A redução da biossíntese destes prostanóides, implicaria na diminuição da resistência da mucosa a ação do HCl. O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da inibição inespecífica da COX e consequente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas. Por inibirem principalmente a COX-1, os AINEs impedem a síntese de prostaglandinas gástricas, especialmente PGI₂ e PGE₂, que servem como agentes citoprotetores da mucosa gástrica. Estes eicosanóides agem inibindo a secreção ácida pelo estômago, aumentando o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e promovendo a secreção de mucocitoprotetor. A inibição da sua síntese, portanto, acarreta ao estômago uma maior suscetibilidade às lesões, cujo aspecto característico, com infiltrado inflamatório, levou ao uso da denominação de gastropatia por AINEs. Além disso, diminui a agregação plaquetária, aumentando os riscos de sangramento. A indometacina apresenta acentuada recirculação enterohepática, o que aumenta os efeitos tóxicos deste fármaco (BRENOL *et al.*, 2000).

A inibição seletiva de COX-1 ou de COX-2 não causa lesões na mucosa gástrica. A lesão ocorre somente quando as duas isoformas são inibidas simultaneamente (WALLACE *et al.*, 2000). AINEs, como a Indometacina, inibem ambas isoformas, diminuindo os níveis de PGE₂ na mucosa, causando ulceração, induzindo 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 e diminuição da produção de muco resultando em úlceras hemorrágicas (YOSHIKAWA *et al.*, 1993) (BECH *et al.*, 2000).

Um dos efeitos da Indometacina é sua capacidade de reduzir o fluxo de sangue na mucosa gástrica. Este efeito é reconhecido como sendo devido, principalmente, à supressão da atividade da COX-1 e ser dependente da presença de ácido no lúmen estomacal. A magnitude

da redução do fluxo sanguíneo gástrico geralmente não é por si só, suficiente para resultar em lesão significativa da mucosa. No entanto, reduzido fluxo sanguíneo irá deixar a mucosa mais suscetível a danos induzidos por substâncias irritantes luminiais e irá prejudicar o processo de restituição epitelial. A administração de AINE provoca o aumento na adesão de leucócitos (principalmente neutrófilos) no endotélio vascular podendo desencadear lesão endotelial. Neutrófilos são capazes de induzir lesão celular por meio de liberação de uma variedade de metabólitos reativos de oxigênio e proteases, causando a gastropatia (WALLACE e MCKNIGHT, 1990).

A indução de úlceras hemorrágicas é devida, pelo menos em parte, aos efeitos da indometacina sobre as plaquetas. O tromboxano produzido pelas plaquetas é um potente estímulo para agregação plaquetária e um potente vasoconstritor. Sua liberação é acionada durante o processo de coagulação e sua síntese ocorre através de COX-1. AINEs que inibem a COX-1 podem, portanto, suprimir a síntese de tromboxano das plaquetas e, assim, reduzir o capacidade de plaquetas para se agregarem (MCCARTHY, 2002) (WALLACE, 2008).

Através de um método qualitativo utilizando o ensaio de CLAE (com visualização simultânea de vários comprimentos de onda) e comparando os Espectros de Ultravioleta obtidos com as informações da literatura (sobre a presença de metabólitos secundários presentes na espécie estudada) podemos sugerir a presença de alcalóides indolopiridoquinazolinico. Estas substâncias possuem atuação comprovada na gastroproteção em lesões induzidas por AINEs. Como exemplo, a Ruteocarpina, identificada por Severino *et al.*, (2009) em cascas e folhas de *Hortia brasiliiana* e indicada sua presença em nossos extratos, mostra-se eficaz na proteção da mucosa gástrica diminuindo o número de lesões por estimular a liberação de CGRP (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina) endógenos através da ativação dos receptores vanilóides e aumentar a síntese de NO (WANG *et al.*, 2005) (XIAO YU, WU, *et al.*, 2006).

O óxido nítrico (NO) possui um papel importante na citoproteção atuando na manutenção da integridade da mucosa gástrica, pois seus mecanismos são paralelos aos efeitos das PGs e incluem mediação da liberação do muco gástrico, manutenção da função da barreira epitelial e aumento do fluxo sanguíneo da mucosa (WALLACE *et al.*, 2000).

Os taninos foi outra classe de metabólitos secundários identificados nos ensaios de classes realizados. Essas substâncias possuem a capacidade de formar complexos com proteínas e polissacarídeos formando uma camada protetora na mucosa do estômago, tornando-a menos permeável e mais resistente a agressões químicas e mecânicas (DONATINI, *et al.*, 2009).

Como os resultados obtidos nos experimentos com indução de úlceras gástrica por indometacina foram conclusivos em referência a proteção da mucosa gástrica, fica indicada que a planta pode ter influência sobre o mecanismo que envolve a produção de prostaglandinas, muco e bicarbonato, aumentando os fatores de proteção epiteliais, também podendo interferir na produção de NO.

5.5.2 Avaliação da Atividade Gastroprotetora de *Hortia brasiliiana* em Lesões Gástricas Induzidas por Etanol.

A preferência por este ensaio se deve ao mecanismo geral de formação da lesão e com vários fatores envolvidos na formação das úlceras, além de ser um método de curta duração e boa visibilidade (lesões grandes de fácil medição). Na avaliação da área de lesão formada do modelo estudado, o omeprazol, ranitidina e as formulações do extrato etanólico de *Hortia brasiliiana* nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg foram capazes de proteger a mucosa gástrica, reduzindo a Área Lesada. Os grupos apresentaram diferenças significativas (p valor menor que 0,0001) em relação ao controle negativo. A figura 31 e a tabela 10 ilustram o resultado do experimento.

Tabela 10: Área Total de Lesão (ATL, em cm²) e Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.) do ensaio com extrato de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por etanol. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com p < 0,05. ** Diferença em relação ao grupo doente tratado com veículo com p < 0,001

Grupo	Símbolo	ATL (cm²)	I.L.U. (%)
Grupo doente tratado com veículo	Salina	1,30 \pm 0,65	55,00 \pm 8,17
Grupo doente tratado com Nanoemulsão de EEHb dose 1mg/kg	N 1	0,09 \pm 0,03	34,40 \pm 10,02
Grupo doente tratado com Nanoemulsão de EEHb dose 10mg/kg	N 10	0,17 \pm 0,07	36,00 \pm 6,61
Grupo doente tratado com Nanoemulsão de EEHb dose 100mg/kg	N 100	0,16 \pm 0,10	35,40 \pm 10,98
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 1mg/kg	S 1	0,22 \pm 0,11	34,00 \pm 7,64
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 10mg/kg	S 10	0,15 \pm 0,05	37,00 \pm 5,51
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 100mg/kg	S 100	0,034 \pm 0,02**	11,00 \pm 1,92**
Grupo doente tratado com Omeprazol	Omeprazol	0,33 \pm 0,14	29,00 \pm 5,64
Grupo doente tratado com Ranitidina	Ranitidina	0,24 \pm 0,08	42,40 \pm 5,64

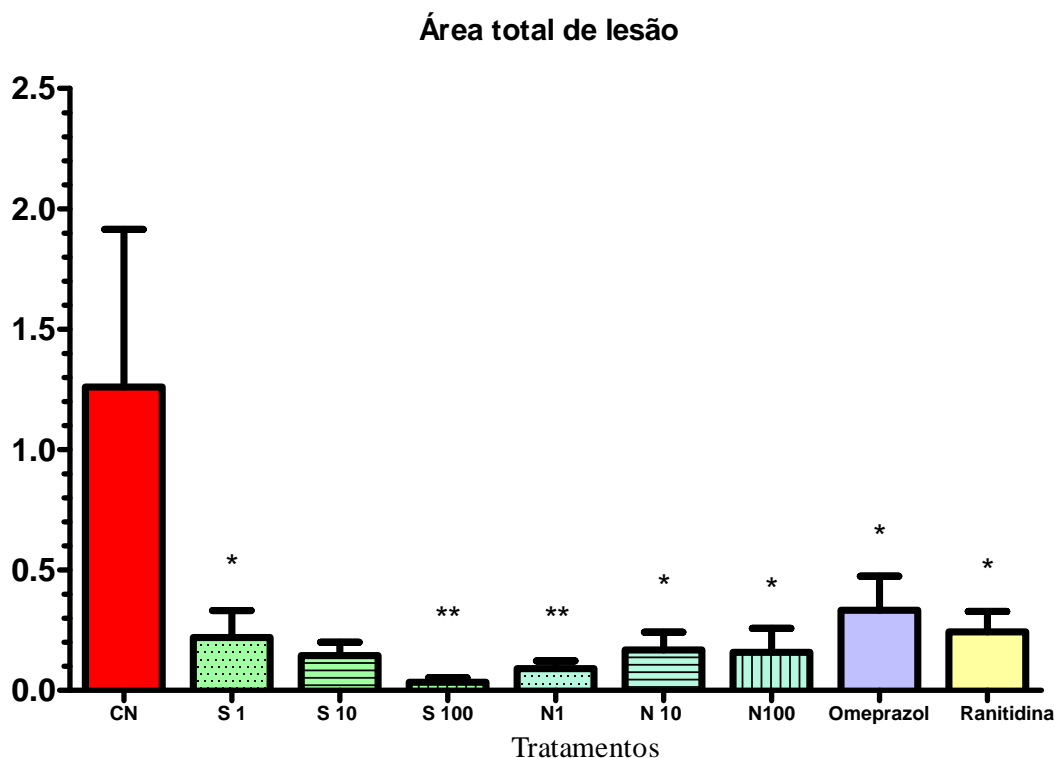


Figura 31: Gráfico representa a Área Total de Lesão (em cm²) do ensaio com frações do extrato etanólico bruto de raízes de Hortia brasiliiana em modelo de indução por etanol. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=6). * Diferença em relação ao controle negativo, teste de Dunnet em relação ao grupo controle com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao controle negativo, teste de Dunnet em relação ao grupo controle com $p < 0,001$.

A contagem do Índice de Lesão Ulcerativa também foi realizada neste experimento e o resultado mostrou que formulação suspensão (dose 100 mg/kg) apresentou valores significantes (p valor 0,0224) de proteção em relação aos demais tratamentos Figura 32.

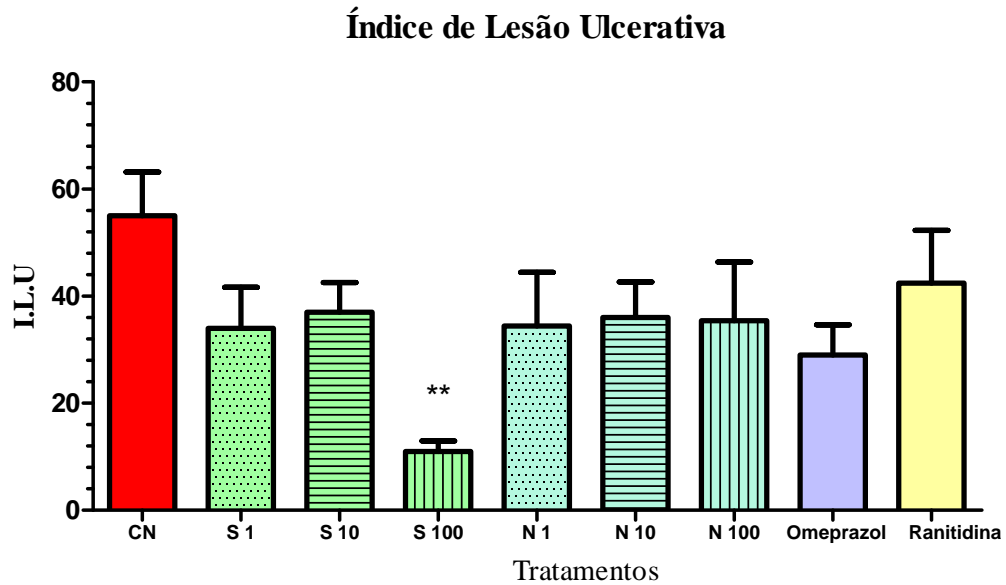


Figura 32: Gráfico representa Índice de Lesão Ulcerativa do ensaio com formulações do Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* em modelo de indução por Etanol. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,001$

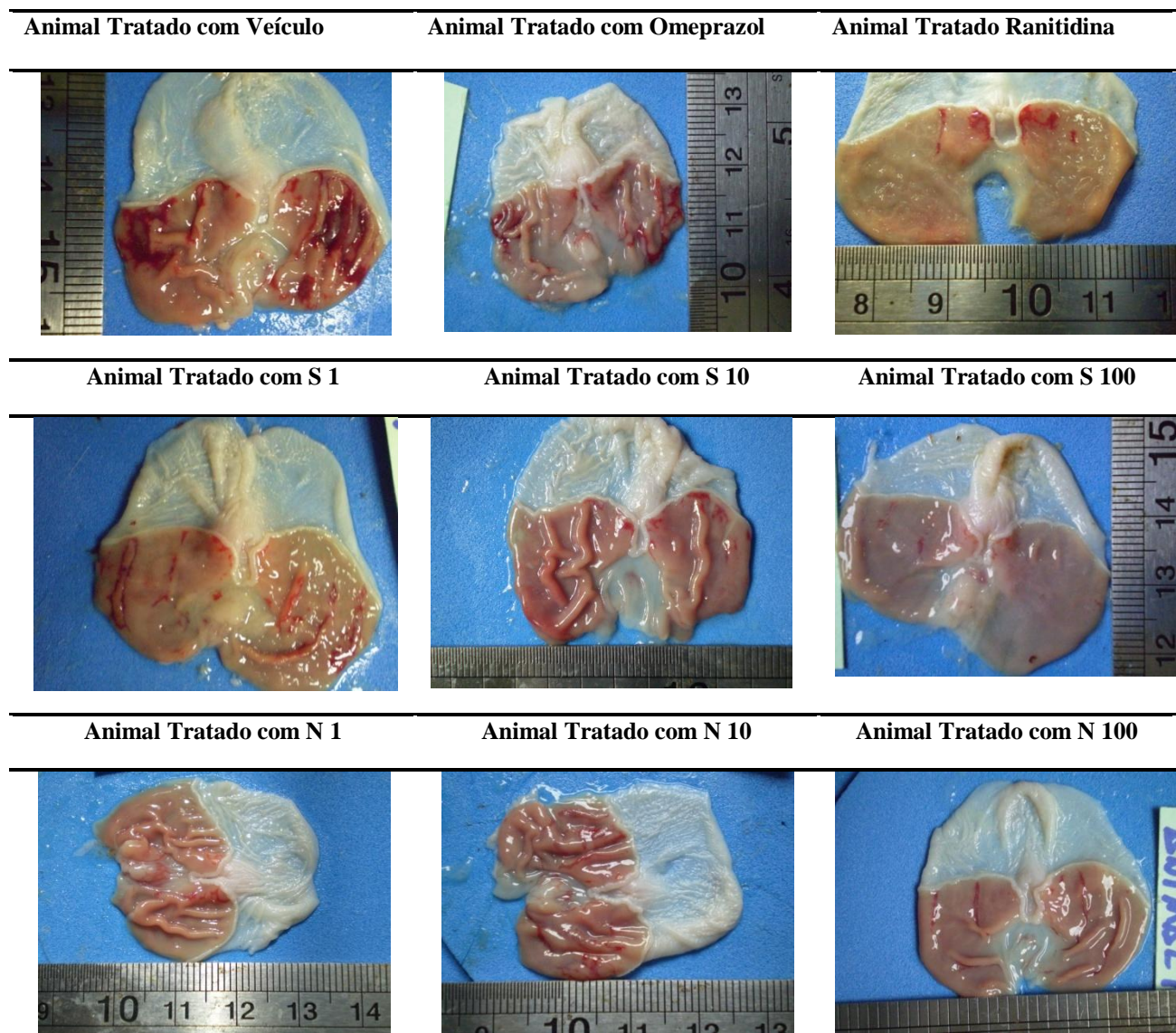


Figura 33: Imagens de estômagos do ensaio utilizando formulações de EEHb, ranitidina, omeprazol e veículo em modelo de indução por Etanol .Foto de apenas um estômago por grupo para ilustrar as aparências dos resultados.

Inúmeros fatores, como o aumento da permeabilidade vascular, da motilidade intestinal, da atividade vagal, a diminuição do fluxo sanguíneo gástrico e dos níveis de prostaglandinas, exercem importante papel na patogênese das úlceras gástricas (BIRDANE et al., 2007). Dessa forma, vários modelos experimentais podem ser utilizados na tentativa de elucidar o mecanismo de ação de do extrato de *Hortia brasiliiana*.

O Modelo de indução de úlceras utilizando o etanol 95% permite avaliar se as formulações elaboradas a partir do extrato de *Hortia brasiliiana* possuem atividade gastroprotetora. A preferência por este ensaio se deve ao mecanismo geral de formação da lesão, com vários fatores envolvidos na formação das úlceras, além de ser um método de

curta duração e boa visibilidade (lesões grandes de fácil medição). Para isso esta espécie vegetal deverá ter o poder de estimular e ou manter a resistência da mucosa do estômago frente às lesões produzidas pelo etanol que estará mimetizando substâncias produtoras de úlceras gástricas.

A formação de lesões na mucosa por esse agente necrotizante é decorrente da redução dos mecanismos de defesa do estômago levando a constrição de veias e artérias da mucosa gástrica, produzindo congestão, inflamação e lesão tecidual (REPETTO e LLESUY, 2002). Os processos patológicos são desencadeados no estômago devido a capacidade do etanol em romper a barreira muco-bicarbonato, alcançar o epitélio da mucosa e romper a parede dos vasos sanguíneos acarretando lesões hemorrágicas que causam edema ao tecido, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias que podem acarretar úlceras da mucosa gástrica causada por estresse oxidativo, provocado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (KOUNTOURAS, *et al.*, 2001). Conseqüentemente ocorre a produção excessiva de radicais livres que ataca constituintes celulares essenciais como ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos (LA CASA, *et al.*, 2000). Portanto as úlceras aparecem devido à ação necrotizante do etanol na mucosa gástrica, com menor participação da secreção gástrica (MINCIS, *et al.*, 1995).

Para verificar se o sistema antioxidante está envolvido no mecanismo protetor dos extratos de *Hortia brasiliana* contra as lesões agudas induzidas por etanol, foi analisada a ação do mesmo como sequestrador de radicais livres DPPH. Os resultados obtidos demonstram que a planta possui baixa atividade antioxidante (10,02%), não possuindo substâncias capazes de degradar os radicais livres que alteram patologicamente a mucosa do estômago.

A ação gastroprotetora do extrato pode ser explicada pelo aumento dos níveis das enzimas glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e os grupamentos sulfidrílicos não protéicos (GSH) que possuem a função de degradar os radicais livres tendo, portanto uma ação antioxidante impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo causado pelo etanol na mucosa gástrica. (CNUBBEN, *et al.*, 2001). Porém não temos provas para suportar esta noção, pois os testes de dosagem destas enzimas protetoras da mucosa assim como os grupamentos sulfidrílicos não protéicos, contra agentes oxidantes, não foi realizado neste modelo.

O EEHb foi efetivo em proteger a mucosa gástrica nos dois modelos utilizados (etanol, indometacina), sugerindo que nas cascas de *Hortia brasiliana* existem princípios ativos capazes de aumentar os fatores de proteção gástrica. Como discutido anteriormente, a

indicação da presença do alcalóide Ruteocarpina é uma provável explicação para a ação protetora do extrato. Este alcalóide reduz o teor de Dimetil Arginina Assimétrica (ADMA) que é um inibidor endógeno circulante da enzima NOS (Síntases do Óxido Nítrico) responsável por catalisar a oxidação da L-arginina formando o Óxido Nítrico e L-citrulina (YING-Z, *et al.*, 20083). O NO, produzido por síntases do óxido nítrico (NOS), é um mensageiro molecular da mucosa gástrica e desempenha um papel crítico na regulação da defesa desta camada (XIAO *et al.*, 2006).

Os resultados nos experimentos sugerem que a gastroproteção seja mediada pela presença da rutaecarpina no extrato que poderá desencadear um aumento da produção de NO. A consequência desta ação é a regulação da microcirculação da mucosa gástrica mantendo a integridade desta camada, em colaboração com as Prostaglandinas e neurônios sensoriais (XIAO *et al.*, 2006).

A microcirculação da mucosa é essencial para a entrega adequada de oxigênio e nutrientes e para a remoção de substâncias tóxicas. Quando a mucosa gástrica é exposta a um agente irritante ou ao ácido gástrico que sofreu difusão para dentro do epitélio, ocorre um rápido e acentuado aumento do fluxo sanguíneo da mucosa permitindo a remoção dos agentes nocivos. Esta resposta é essencial, pois a restrição mecânica do fluxo sanguíneo leva a necrose hemorrágica (LANAS, 2008).

Conforme discutido no item anterior à semelhança do que acontece com outros extratos de plantas, a gastroproteção dos EEHb pode ser exercida em consequência da ação de várias substâncias presentes na planta, atuando de modo sinérgico. Como exemplo os taninos identificados nos testes de classes podem estar exercendo uma proteção física na mucosa do estômago, tornando-a mais resistente a agressões químicas e mecânicas, também podem estar inibindo os mediadores dos receptores H₂ da histamina nas células parietais inibindo as ações da gastrina (FERREIRA, *et al.*, 2004) (DONATINI, *et al.*, 2009). Porém não podemos afirmar sobre quais substâncias estão atuando na proteção do estômago, pois é necessário identificar e quantificar as substâncias presentes no extrato e o seu mecanismo de ação característico.

5.5.3 Avaliação da Atividade Anti-Secretora Ácida em Modelo de Ligadura do Píloro

As três doses da formulação (suspensão) elaborada a partir do extrato etanólico de *Hortia brasiliiana* não exibiram diferenças significativas em relação ao controle negativo em nenhum dos 3 parâmetros verificados. Os resultados dos experimentos utilizando o modelo ligadura do píloro estão expostos na Tabela 11 e na Figura 34

Tabela 11: Acidez Total (AT, [H⁺] em mol.L⁻¹), pH da Secreção Gástrica e Volume de Secreção Gástrica (VSG, em mL) do experimento com extrato de raízes de Hortia brasiliana, em modelo de ligadura do piloro. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com p < 0,05.

Grupo	Símbolo	Acidez Total ([H ⁺]molL/4 h)	pH	VSG (mL)
Grupo doente tratado com veículo	Salina	(5,96±0,98)x10 ⁻²	3,80±0,43	1,20±0,21
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 50mg/kg	S 50	(4,65±0,64)x10 ⁻²	3,72±0,31	1,92±0,29
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 100mg/kg	S 100	(4,54±0,37)x10 ⁻²	3,33±0,42	1,50±0,19
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 200mg/kg	S 200	(4,31±0,71)x10 ⁻²	3,37±0,19	1,72±0,49
Grupo doente tratado com Omeprazol	Omeprazol	(5,64±0,77)x10 ⁻²	3,33±0,28	2,20±0,89

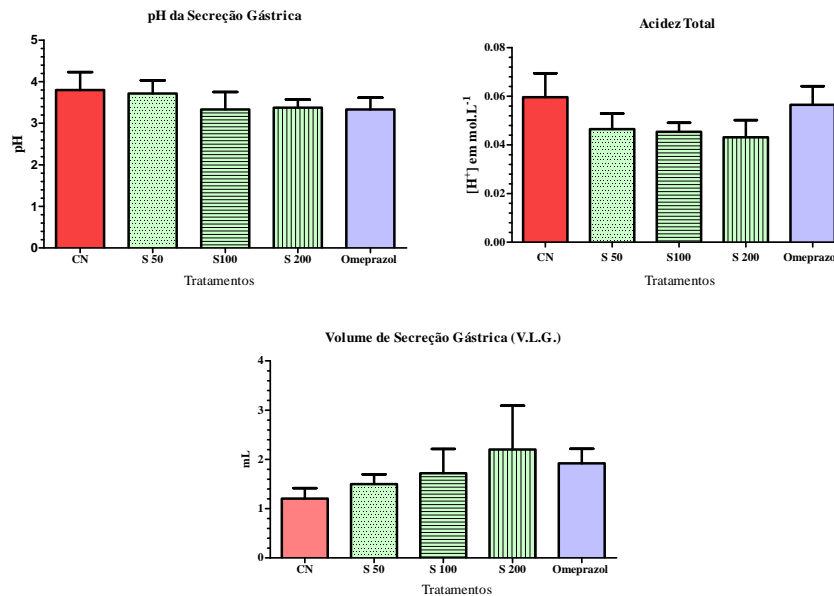


Figura 34: Gráfico Acidez Total (AT, [H⁺] em mol.L⁻¹), pH da Secreção Gástrica e Volume de Secreção Gástrica (VSG, em mL) do experimento com extrato de raízes de *Hortia* brasileira, em modelo de ligadura do piloro. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=6). Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's * Diferença em relação ao Grupo doente tratado com veículo com $p < 0,05$.

Através da metodologia de ligadura pilórica, foi possível avaliar a influência do EHB sobre a atividade secretória das células do estômago. Ao realizar o procedimento de ligadura pode ocorrer à hipersecreção ácida estimulada por reflexo vago-vagal, em decorrência da distensão gástrica provocada pelo aumento do volume gástrico devido à obstrução do piloro. Este método estimula a secreção do hormônio gastrina, cuja função no trato gástrico é estimular as células parietais a secretar em HCl. (BAGGIO, FREITAS, *et al.*, 2003)

Como já era de conhecimento, as doses de 1 e 10 mg/kg não apresentaram resultados gastroprotetores, afim de uma melhor análise para este procedimento foi realizado o desdobramento da dosagem (suspensão 100 mg/Kg) que apresentou melhores índices nos modelos de indução por etanol e indometacina. Portanto foram utilizados neste ensaio suspensões nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Os grupos tratados com formulações elaboradas com extrato resultaram em médias de concentração de H⁺ inferiores ao animais que receberam veículo, porém sem significância. Este fato mostra que a planta não teve atividade na supressão da produção de secreção gástrica (concentração de íons H⁺) não atuando de maneira a aumentar o pH significativamente do grupo tratado. Portanto as análises referentes aos valores de pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de íons H⁺

concluíram que o EEHb nas três doses não alterou estes parâmetros, pelo tratamento oral, não atuando na gastroproteção de maneira anti-secretória de íons H⁺.

5.5.4 Avaliação das Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético

Nas análises macroscópicas, a administração das formulações durante 8 dias de EEHb e dos fármacos controles apresentaram como resultados significativos, em relação ao grupo tratado com veículo, para os tratamentos com a Nanoemulsão (p valor 0,05) na dose de 100 mg/Kg e do fármaco Ranitidina (p valor 0,025). Os resultados estão expressos na tabela 12 e figura 35.

Tabela 12. Área de Lesões Gástricas (A.T.L.) Induzidas por Ácido Acético do extrato etanólico de raízes de *Hortia brasiliiana*. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: Análise estatística entre os grupos: Teste T * Diferença em relação aos grupos com p < 0,05. ** Diferença em relação ao Grupos com p < 0,001

Grupo	Símbolo	ATL (cm²)
Grupo doente tratado com veículo	CN*	0,24 \pm 0,06
Grupo doente tratado com Suspensão de EEHb dose 100mg/kg	S 100	0,13 \pm 0,09
Grupo doente tratado com Nanoemulsão de EEHb dose 100mg/kg	N 100*	0,04 \pm 0,06
Grupo doente tratado com Omeprazol	Omeprazol	0,20 \pm 0,06
Grupo doente tratado com Ranitidina	Ranitidina	0,05 \pm 0,04

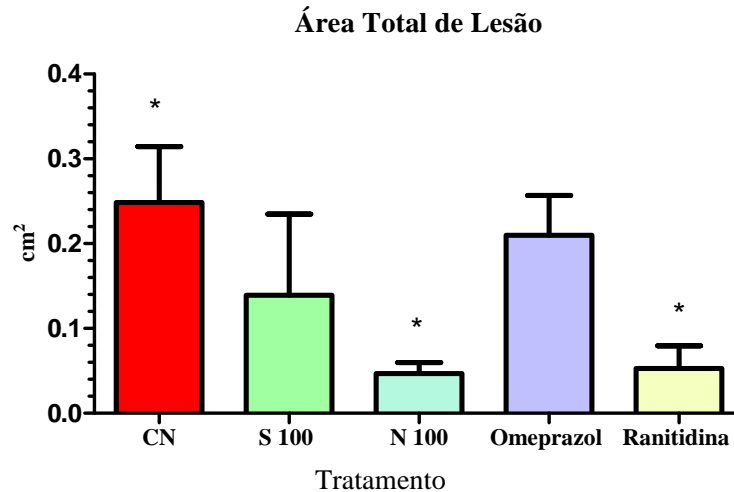


Figura 35: Gráficos representativo da Área de Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético do Extrato Etanólico de raízes de *Hortia brasiliiana*. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: Teste T * Diferença em relação aos grupos com $p < 0,05$. ** Diferença em relação ao grupos com $p < 0,0001$

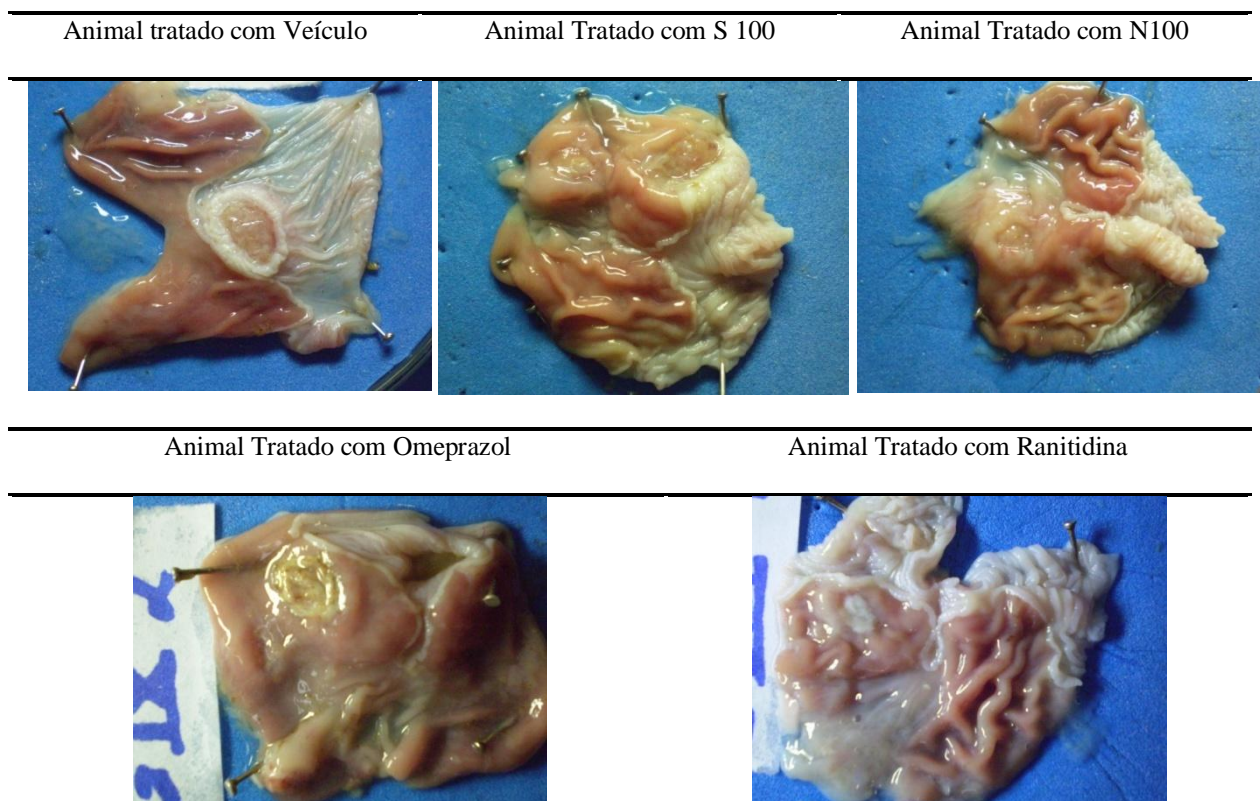


Figura 36: Imagens de estômagos do ensaio utilizando formulações de EEHb, ranitidina, omeprazol e veículo em modelo de indução por Ácido Acético. Foto de apenas um estômago por grupo para ilustrar as aparências dos resultados.

O modelo de úlcera crônica induzida pelo ácido acético também foi utilizado neste trabalho afim de melhor compreender os prováveis mecanismos envolvidos no efeito gastroprotetor e cicatrizantes causado pelo EEHb. A aplicação de ácido acético na superfície da serosa de estômagos de ratos resulta em úlceras muito semelhantes à úlcera humana, no que se refere ao aspecto macroscópico e microscópico. A localização, severidade, cronicidade e o processo de cicatrização são as características que aproximam estas lesões (OKABE e PFEIFFER, 1972).

O ácido acético induz lesões gástricas que envolvem a camada muscular do estômago, envolvendo alterações nos níveis de prostaglandinas, fatores de crescimento, óxido nítrico, citocinas e a quantidade de muco (KOBAYASHI *et al.*, 2001). Além disto, existem indícios de que os radicais livres gerados pelos neutrófilos podem representar importante fator no retardo da cura de lesões gástricas induzidas por ácido acético (LIMA *et al.*, 2006).

Além de proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol e indometacina, o extrato etanólico de *Hortia brasiliiana* também foi capaz de aumentar a capacidade de resolução das lesões gástricas (cicatrização) induzidas com ácido acético (modelo de úlcera crônica). As análises macroscópicas mostraram que a nanoemulsão na dose de 100 mg/Kg promoveu uma aceleração na cicatrização das úlceras juntamente com o fármaco Ranitidina, em relação ao grupo tratado somente com o veículo da formulação.

A análise histológica da avaliação semi-quantitativa (comparação subjetiva) de inflamação por meio do índice, ausência de inflamação (0), leve (1), moderada (2) e inflamação intensa (3); revelou diferenças na geração de inflamação entre os grupos que receberam a dose de 100 mg/kg de EEHb e o controle negativo. Os dados estão organizados na figura 34. Já a análise histológica de formação de novos vasos não demonstrou diferença significativa entres os grupos de acordo com a figura 35.

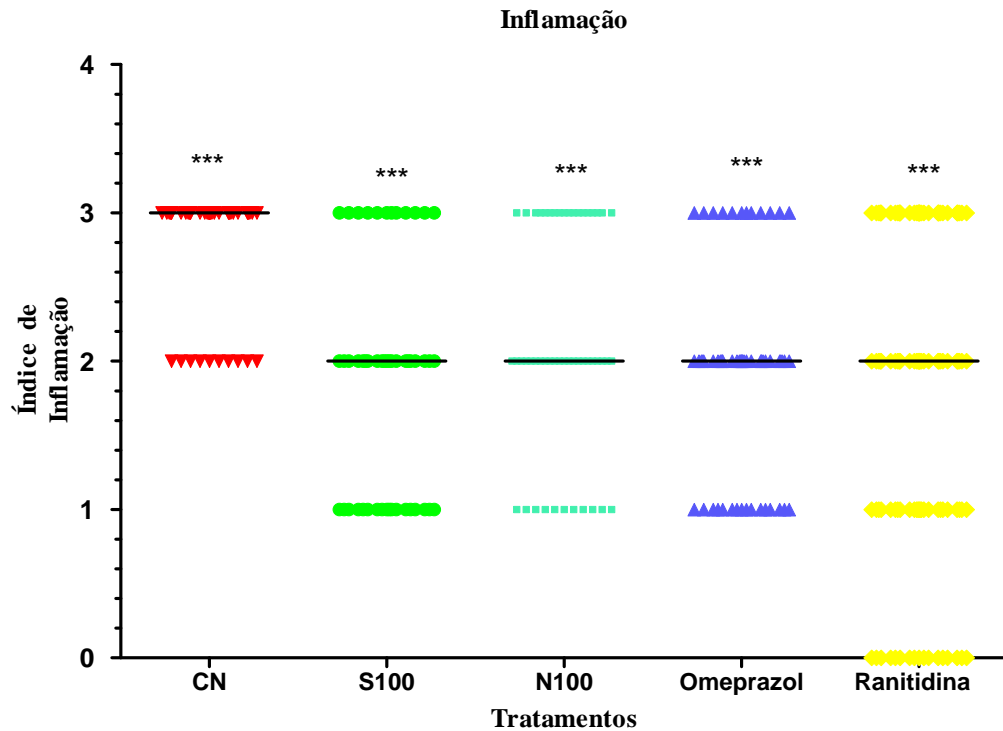


Figura 37: Avaliação por índice da presença de infiltrado inflamatório no fundo da lesão ulcerativa nas lâminas dos estômagos do ensaio com extrato de cascas de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por ácido acético (n=5). Os valores estão representados pela mediana. Análise estatística entre os grupos: Teste T * Diferença em relação aos grupos com $p < 0,05$. *** Diferença em relação ao grupos com $p < 0,0001$.

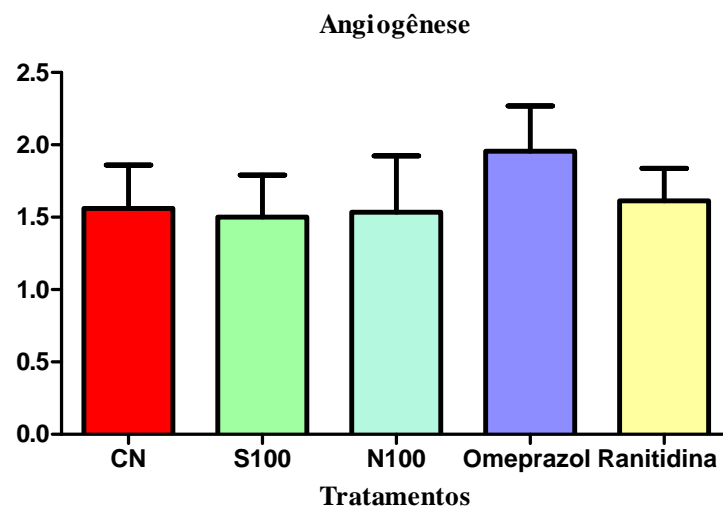


Figura 38: Avaliação da formação de novos vasos em lâminas de estômagos do ensaio com extrato de cascas de *Hortia brasiliiana*, em modelo de indução por ácido acético. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão (n=5). Análise estatística entre os grupos: Teste T * Diferença em relação aos grupos com $p < 0,05$. *** Diferença em relação ao grupos com $p < 0,0001$.

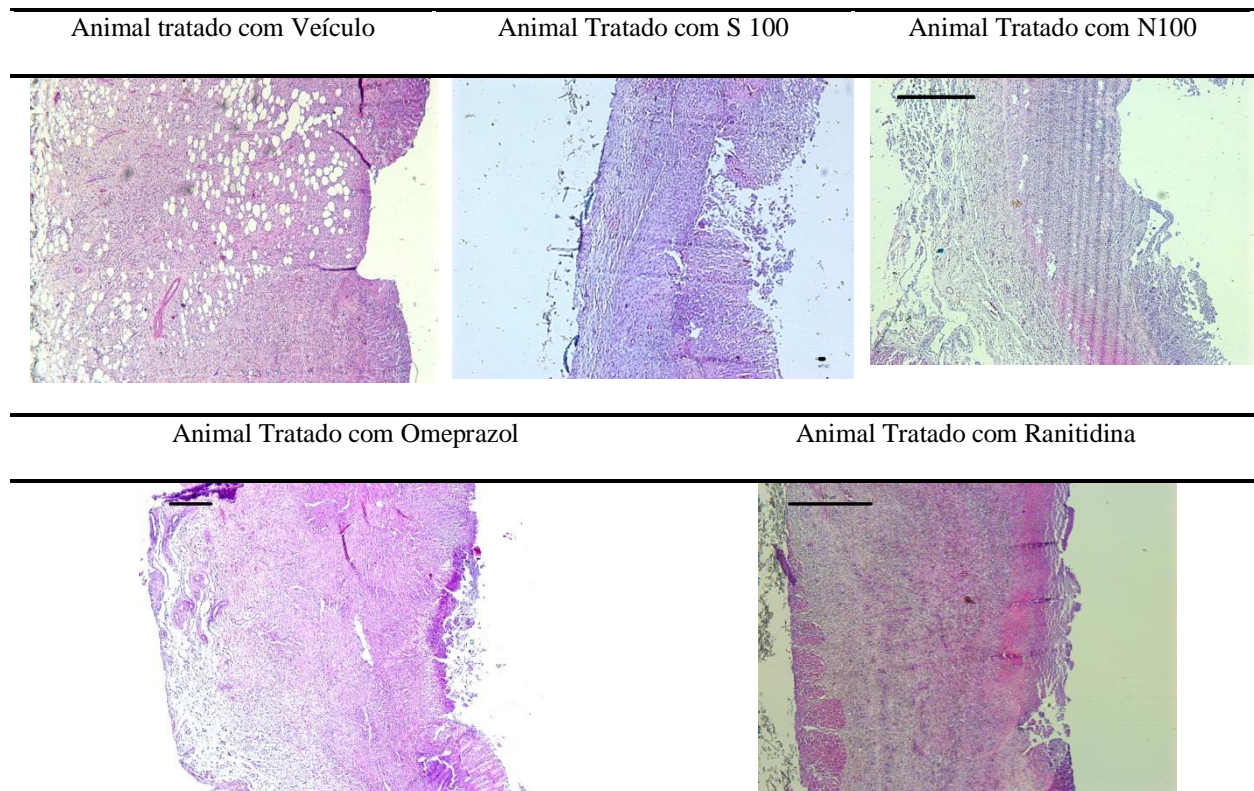


Figura 39: Fotos das lâminas histológicas do ensaio com extrato de *Hortia brasiliana*, em modelo de indução por ácido acético. Presença de infiltrado inflamatório no fundo da lesão ulcerativa (porção superficial, desprovida de mucosa). O lúmen do estômago encontra-se voltado para a direita. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 5 x.

Os resultados do gráfico da figura 37 mostram que os grupos tratados com EEHb, omeprazol e ranitidina apresentaram inflamação moderada enquanto que o grupo tratado com o veículo da formulação apresentou inflamação intensa. A diminuição da inflamação pode ser a uma das explicações em relação à melhor cicatrização dos animais tratados principalmente com Ranitidina e Nanoemulsão de EEHb na dose 100mg/Kg.

A inflamação da camada mucosa do trato gastrointestinal desempenha um papel importante na produção e cura das lesões. Os mediadores que coordenam as respostas inflamatórias possuem a capacidade de alterar a resistência da mucosa a lesão induzida pelas substâncias nocivas. Os neutrófilos estão entre as primeiras células recrutadas para os locais de inflamação e ao serem ativados aderem ao endotélio vascular transmigando para o espaço extravascular até o sítio alvo da inflamação, onde liberam ROS, proteases, e diversas quimiocinas. ROS e proteases danificam o tecido normal e proteínas da matriz extracelular e citocinas liberadas posteriormente mantêm o influxo de células inflamatórias. Portanto a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular contribui para a formação de úlceras gastroduodenais. (WALLACE, 2001).

O óxido nítrico (NO) exerce várias ações em comum com as prostaglandinas no trato gastrointestinal, podendo modular a atividade das células imunológicas da mucosa, dos mastócitos, bem como modular as interações dos leucócitos com o endotélio e a permeabilidade do epitélio intestinal. O NO também inibe o recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação reduzindo a infiltração destes para a mucosa do trato gastrointestinal (WALLACE, 2001).

Os resultados obtidos nos modelos de indução por etanol, indometacina e relacionando com os resultados dos testes usando ácido acético podemos sugerir que EEHb pode atuar nos fatores de proteção da mucosa tendo influência sobre o mecanismo de produção de prostaglandinas, NO, muco e bicarbonato. Sobre a secreção ácida, é pouco provável que o EEHb tenha alguma ação, devido ao resultado obtido através do modelo de ligadura do piloro.

5.6 Caracterização Física da Nanoemulsão do Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana*.

Os resultados da caracterização física da nanoemulsão do EEHb apresentou como índice de polidispersão (IP) o valor de $0,33 \pm 0,03$ e seu diâmetro de gotícula apresentou valor médio de $294,4 \pm 4,37$ nm. O índice de polidispersão (IP) determina a condição da formulação, esse índice entre 0 e 0,7 indica que as nanoemulsões apresentam homogeneidade no tamanho de partículas e valores menores que 0,3 indicam que as mesmas apresentam-se monodispersas (SOUZA, 2007). Já que as nanoemulsões com ou sem marcador apresentaram índice de polidispersão abaixo de 0,3, pode-se considerar que são monodispersas.

Basicamente, nanoemulsões são emulsões que possuem gotículas com diâmetro entre 20 e 500 nm (FORGIARINI et. al., 2001; FERNANDEZ et. al., 2004) e são considerados sistemas metaestáveis, cuja estrutura é dependente do processo utilizado em sua preparação. São passíveis de sofrerem diluição, mantendo a sua estrutura inicial, principalmente em relação ao tamanho dos glóbulos (MORALES et. al., 2003). Além disso, não requerem altas concentrações de tensoativos (entre 3,0 a 10%) comparado às microemulsões na qual a concentração destes pode chegar a 20% (BOUCHEMAL et. al., 2004).

A estrutura das nanoemulsões consiste em gotículas da fase dispersa (ou interna) rodeada pela fase contínua (dispersante ou externa). Pode ser classificada de acordo com a composição dessas fases em água em óleo (A/O), na qual gotículas da fase aquosa estão dispersas na fase dispersante oleosa; ou óleo em água (O/A), quando a fase contínua é

composta por água e as gotículas da fase dispersa são oleosas, conforme na Figura 40 (FORGIANINI *et. al.*, 2001;)

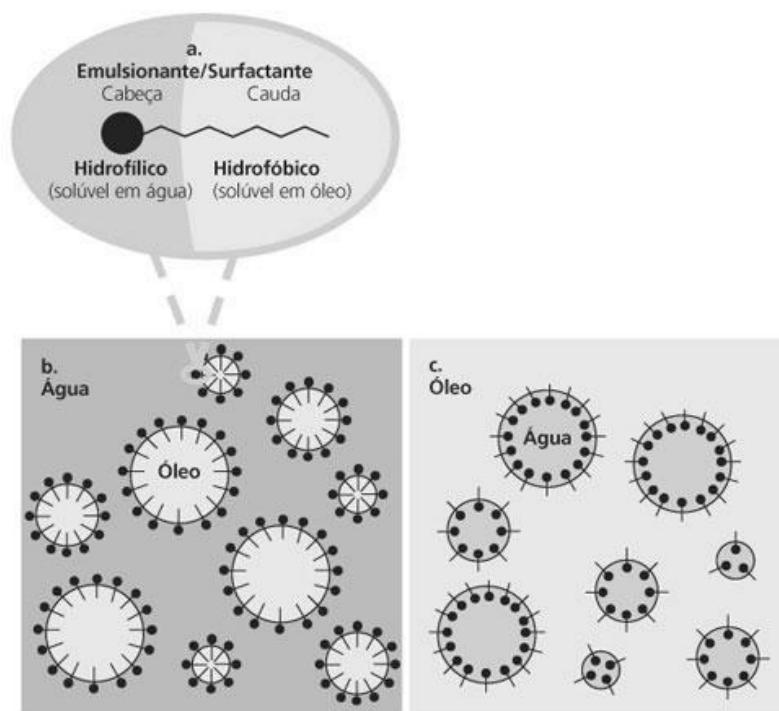


Figura 40: Representação esquemática de (a.) tensoativo, (b.) nanoemulsão O/A e (c.) nanoemulsão A/O.

Possuem três fases em sua composição: aquosa, oleosa e a de tensoativos. As duas primeiras fases são estabilizadas cineticamente pelos agentes tensoativos, capazes de diminuir tensão interfacial do sistema e formam um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna (CAPEK, 2004).

Se compararmos os resultados de proteção gástrica dos dois tipos de formulação empregada nos ensaios em animais, veremos que a nanoemulsão possuiu uma desempenho um pouco melhor em relação a suspensão. Este fato pode ser explicado, pois as nanoemulsões possuem uma maior capacidade de solubilização do que simples soluções micelares e sua estabilidade termodinâmica oferecem vantagens sobre dispersões instáveis, tais como emulsões e suspensões. O uso de nanoemulsões como sistemas de entrega de fármacos pode melhorar a eficácia da droga, permitindo que a dose total seja reduzida e, portanto, minimizando os efeitos colaterais (CHOUKSEY, KUMAR e PAN, 2011).

Em resumo este aumento da eficácia possa ser parcialmente atribuído ao tamanho de partícula reduzido da nanoemulsão, em comparação com a suspensão, a produção de uma dispersão aquosa estável em relação à suspensão instável, o índice de polidispersão da nanoemulsão é menor em comparação com suspensão e devido a maior estabilidade de

fármacos formulados em uma nanoemulsão, em comparação com a suspensão (KAKUMANU *et al.*, 2011)

5.7 Ensaio de Letalidade com *Artemia salina* sp

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido, morte ou vida (MEYER, *et al.*, 1982) O ensaio de letalidade utilizando a espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* sp, permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Assim este teste biológico foi utilizado no monitoramento da toxicidade de Extratos Etanólicos de *Hortia brasiliiana*. (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993)

Os resultados do ensaio de *Artemia salina* sp estão apresentados na tabela 13 partir dos dados, por regressão linear simples (Probitos), constatou-se que a DL50 do Extrato Etanólico de *Hortia brasiliiana* é igual a 190 µg/mL, já o controle utilizando Lapachol apresentou o valor de 204 µg/mL. Existe uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, DL50, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, portanto, considera-se que quando são verificados valores de DL 50 acima 1000 µg/mL para substâncias naturais, estes, são considerados atóxicos (MEYER, *et al.*, 1982).

A toxicidade com *Artemia salina* mostra boa correlação com atividades antitumoral, inseticida (Meyer *et al.*, 1982; Mclaughlin *et al.*, 1995) para substâncias com DL50 < 103 µg/mL. Por outro lado, uma baixa toxicidade pode ser considerada uma característica interessante para utilização dos compostos no controle ambiental. Os resultados obtidos mostraram-se interessantes, em função dos valores de DL50 do Extrato de *Hortia brasiliiana* e permitem a previsão de apresentarem potencial atividade citotóxica.

Tabela 13: Mortalidade média de *Artemia salina* de acordo com as concentrações do extrato de *Hortia brasiliana*

Concentração do extrato de <i>Hortia brasiliana</i>	Número de organismos expostos	Número de organismos mortos	Porcentagem de organismos mortos	Média de Organismos Mortos+ Erro Padrão da Média
10µg/mL	30	3	10%	0,1±0,05
100µg/mL	30	10	33,3%	0,33±0,08
500µg/mL	30	26	86,6%	0,86±0,06
1000 µg/mL	30	28	93,3%	0,93±0,04

Tabela 14: Mortalidade média de *Artemia salina* de acordo com as concentrações do grupo controle utilizando Lapachol.

Concentração do Lapachol	Número de organismos expostos	Número de organismos mortos	Porcentagem de organismos mortos	Média de Organismos Mortos+ Erro Padrão da Média
10µg/mL	30	0	0%	0
100µg/mL	30	5	16%	0,16±0,06
500µg/mL	30	26	86,6%	0,86±0,06
1000 µg/mL	30	30	100%	1,00±0,0

Tabela 15: Mortalidade média de *Artemia salina* de acordo com as concentrações do grupo controle utilizando Salina.

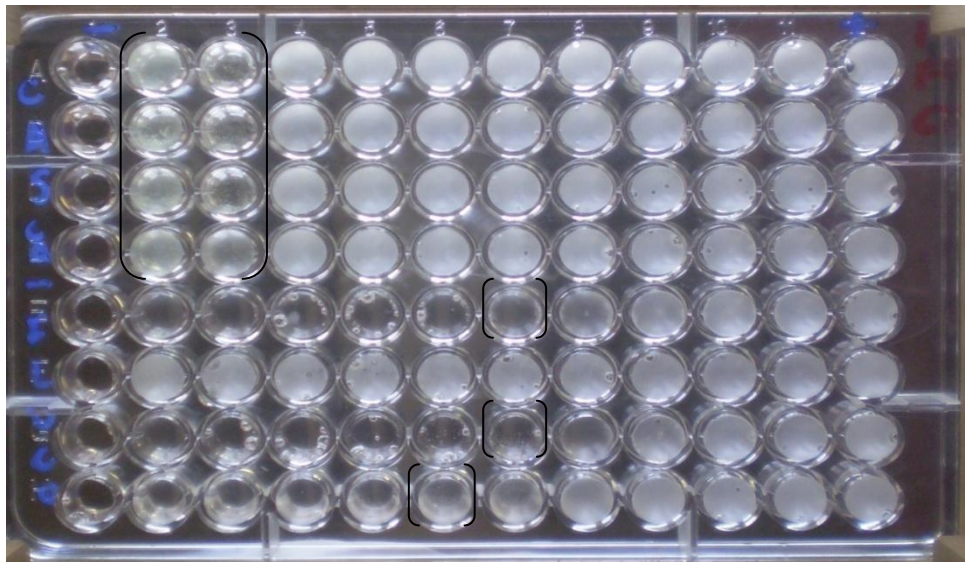
Solução Salina	Número de organismos expostos	Número de organismos mortos	Porcentagem de organismos mortos	Média de Organismos Mortos+ Erro Padrão da Média
Controle negativo	30	0	0%	0

5.8 Avaliação Antifúngica dos Extratos de *Hortia brasiliana*

Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos da casca de *Hortia brasiliana*. O Extrato Etanólico de *Hortia brasiliana* (EEHb), casca, inibiu o crescimento fúngico conforme descrito na Tabela 16

Tabela 16: Concentração inibitória mínima do extrato Etanólico de Hortia Brasileira pelo método de microdiluição em placa.

Candidas	ATCC	Extrato Casca de <i>H. brasiliana</i> (CIM)	Cetoconazol (CIM)	Fluconazol (CIM)
<i>C. albicans</i>	2209	256,0 µg/mL	0.0625 µg/mL	1.0 µg/mL
<i>C. tropicalis</i>	750	256,0 µg/mL	16.0 µg/mL	-
<i>C. parapsilosis</i>	2209	256,0 µg/mL	0.0625 µg/mL	1.0 µg/mL
<i>C. krusei</i>	6258	256,0 µg/mL	0.125 µg/mL	2.0 µg/mL

Figura 41: Resultados da CIM de extratos da casca de *Hortia brasiliana* e o antifúngico Fluconazol

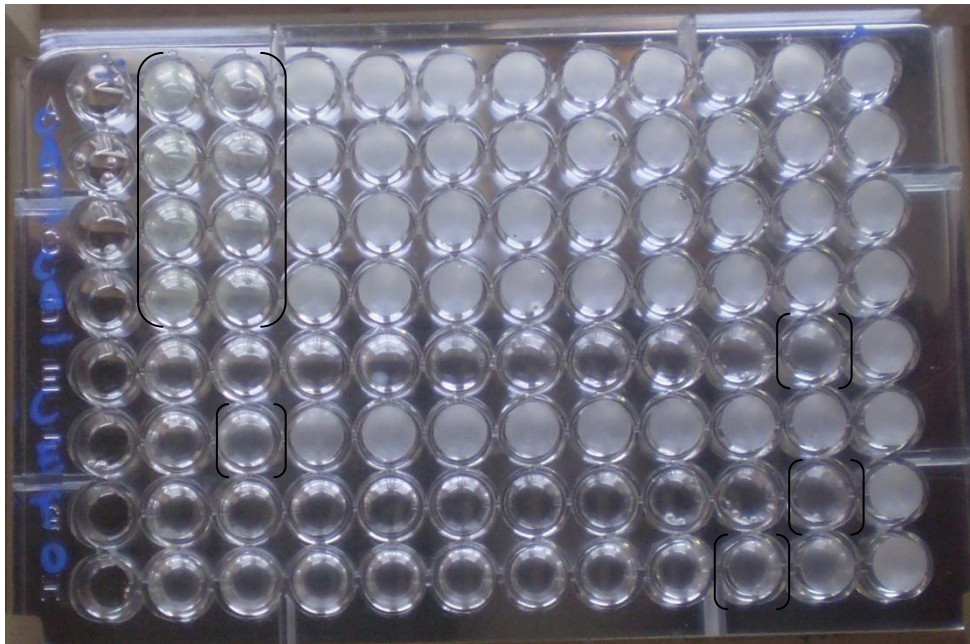


Figura 42 Resultados da CIM de extratos da casca de Hortia brasileira e o antifúngico cetoconazol

Infecções humanas, particularmente aquelas envolvendo a pele e mucosas constituem um sério problema, especialmente em países desenvolvidos tropicais e subtropicais, sendo os fungos dermatófitos e a levedura *Candida* spp os patógenos mais frequentes (DUARTE, 2006).

Diante dos resultados obtidos os extratos apresentaram melhores resultados de CIM para a espécie *Candida tropicalis* em comparação com o Fluconazol. Porém não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antifúngicos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antifúngicos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores.

ALIGIANIS *et al.* (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição – MIC até 500 $\mu\text{g/mL}$; inibição moderada – MIC entre 600 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ e como fraca inibição - MIC acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$. No trabalho de MAGINA *et al* (2007), foram considerados ativos os extratos com MIC menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$, e muito ativos os extratos com MIC inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Diante dos critérios adotados podemos dizer que o Extrato Etanólico de Hortia apresentou segundo ALIGIANIS *et al.* (2001) forte inibição para todas as espécies de *Candida*. Ensaiadas, pois apresentaram a mesma CIM no valor de 256,0 $\mu\text{g/mL}$. Não se encontra na literatura atividade antifúngica referente a espécie estudada e seus metabólitos secundários produzidos.

6.0 Conclusão

Os extratos de *Hortia brasiliana* ainda não haviam sido estudados quanto à atividade antiúlcera, e através dos diferentes modelos testados é possível extrair algumas conclusões

O extrato etanólico de *Hortia brasiliana* apresentou atividade gastroprotetora frente aos agentes indutores de lesões gástricas mais comuns ao homem, tais como o etanol e as drogas antiinflamatórias não esteroidais, confirmando assim a informação etnofarmacológica e a base quimiotaxonômica utilizada para a seleção das espécies testadas.

O extrato etanólico de *Hortia brasiliana* confirma sua atividade protetora gástrica acelerando a cicatrização (resolução) de úlceras induzidas por ácido acético

A planta não teve atividade na supressão da produção de secreção gástrica (concentração de íons H^+) não atuando de maneira a aumentar o pH dos animais tratados. As análises referentes aos valores de pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de íons H^+ concluíram que a planta, pelo tratamento oral, não atua na gastroproteção de maneira anti-secretora de íons H^+ .

O sistema antioxidante parece não estar envolvido no mecanismo de proteção gástrica do extrato etanólico de *Hortia brasiliana*. O extrato obteve baixa atividade sequestrante de radicais livres em experimento *in vitro*.

Os resultados obtidos em relação às análises toxicológicas utilizando *Artemia salina* sp mostraram-se interessantes, em função dos valores de DL50 do Extrato de *Hortia brasiliana* e permitem a previsão de apresentarem potencial atividade citotóxica.

Os dados obtidos nesse estudo indicam que extratos de cascas apresentaram potencial antifúngico, porém são necessários teste com os constituintes químicos isolados para o melhor entendimento do mecanismo de ação antifúngico e para buscar atividade superior na inibição do crescimento de *Candida spp.*

Referências Bibliográficas

7.0 Bibliografia

2004A, B. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.**

ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 49, 2001. 4168-4170.

ALLEN, A.; FLEMSTRO, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288, p. C1-C19, 2005. ISSN doi:10.1152/ajpcell.00102.2004.

AL-SHABANAH, O. A.; ISLAM, M. W.; AL-GHARABLY, N. M. Effect of khatamines and their enantiomers on aspirin, indomethacin, phenylbutazone and reserpine induced gastric ulcers in rats. **Res Commun. Subst. Abuse**, v. 14, p. 81-94, 1993.

ANDRADE, C. A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17(2), p. 231-235, Abr./Jun. 2007.

ANNUK, H. et al. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiol Lett**, v. 172, p. 41-45, 1999.

APPEZZATO DA GLORIA, B.; CARMELLO GUERREIRO, S. M. Anatomia Vegetal, Viçosa, 2006.

ATUMA, C.; STRUGALA, V.; ALLEN, A. The adherent gastric mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, p. 922-929., 2001.

BABYATSKY, M. et al. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. **Gastroenterology**, v. 10, p. 489-497, February 1996. ISSN 0016-5085.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S. The stomach is a source of leptin. **Nature.**, v. 394, p. 790-793, 1998.

BAGGIO, C. H. et al. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 93-98, 2003.

BARBOSA, A. A. A. *Hortia brasiliana* Vand. (Rutaceae): polinização por aves Passeriformes no cerrado do sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, Abril 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. **Artmed**, p. 271, 2002.

- BARTH, T. et al. Stereoselective determination of midodrine and desglymidodrine in culture medium: application to a biotransformation study employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, v. 31, Issue: 9, p. 1521-1528, 2010.
- BECH, P. et al. Mechanism of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. **Gastroenterology**, v. 119, p. 699–705, 2000.
- BIGHETTI, A.; ANTÔNIO, M.; CARVALHO, J. Regulação e modulação da secreção gástrica. **Rev. Ciênc. Méd**, Campinas, p. 55-60, nov. 2002.
- BIRDANE FM, CEMEK M, BIRDANE YO, GÜLÇİN I, BÜYÜKOKUROĞLU. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **World J Gastroenterol** 13, p. 607-611, 2007.
- BITTENCOURT, P. et al. Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 325-34, 2006.
- BOMPADRE, S.; FERRANTE, L.; LEONE, L. On-line solid phase extraction of cephalosporins. **Journal of Chromatography**, v. 812, p. 191-196, 1998.
- BORGES, K. B. et al. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, Issue: 3, p. 669-674, 2007.
- BORGES, K. B. et al. LC MS MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 915-925, 2011.
- BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURAN-PATRON, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron. Asymmetry**, v. 20, p. 385-397, 2009.
- BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies, v. 14, p. 581-91, 2002.
- BOUCHEMAN, K.; BRIANCON, S.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.
- BRENOL JCT, X. R. M. J. Antiinflamatórios não hormonais. **Rev Bras Med**, v. 57, 2000.
- BROWN, T.; HOOPER, L.; ELLIOTT, R. A comparison of the cost-effectiveness of the cost-effectiveness of five strategies for the prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal toxicity: a systematic review with economic modelling. **Health Technol Assess**, v. 10, p. 1–183, 2006.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. décima primeira. ed. [S.l.]: Ed. United States of America : Mc Graw-Hill Companies, 2006.

- CACCAMESE, S.; BIANCA, S.; CART, G. T. Direct high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of venlafaxine and 11 analogs using amylose-derived chiral stationary phases. **Journal: Chirality**, v. 21, p. 569-577, jun. 2009. ISSN DOI: 10.1002/chir.20633.
- CAPEK, I. Degradation of Kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125-155, 2004.
- CARRÃO, D. B. et al. Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis (Weinheim. Print)**, v. 32, p. 2746-2756, 2011.
- CARVALHO, A. Úlcera péptica. **J Pediatr** , (Rio J), p. 76 , 2000.
- CARVALHO, ANA C. B.; BALBINO, EVELIN E.; MACIEL, ARTUR; PERFEITO, JOÃO P. S. **Situação do registro de medicamentos fi totéricos no Brasil**. [S.l.]: [s.n.], 2008. 314-319 p.
- CARVALHO, C. A. et al. Aspectos Macroscópicos e Histológicos da Mucosa Gástrica de Ratos Wistar e Sua Utilização em Modelo de Úlceras Gástricas. **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 44-53, 2011. ISSN 1517-784X.
- CHANDRASOMA, P. Controversies of the cardiac mucosa and Barrett's oesophagus. **Histopathology**, v. 46, p. 361–373., 2005.
- CHANG, H. M.; BUT, P. P. H. Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica. **World Scientific Publishing**, Singapore, p. 605– 609, 1986.
- CHIOU, S.; TANIGAWA, T.; AKAHOSHI, T. Survivin: a novel target for indomethacin-induced gastric injury. **Gastroenterology**, 2005. 128:63–73.
- CHOUKSEY, R.; KUMAR, A.; PAN, J. H. Development and bioavailability studies of atorvastatin nanoemulsion. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES**, v. 2(8), p. 982-988, Aug 2011. ISSN ISSN: 0976-7126.
- CINARA, V. D. S.; REIS, A. L. V.; HYGIA, M. N. G. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20 (3), 2010.
- CNUBBEN, N. et al. The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Environ Toxicol Pharmacol** , v. 10, p. 141–52, 2001.
- COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination. **Colegate, S. M.**, London, n. CRC Press, p. 441, 1993.
- COOKE, J. P. & D. V. J.; DZAU, V. J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. **Annu Rev Med** , v. 48, p. 489-509, 1997.

- DAMY, S. B. et al. Aspectos Fundamentais da Experimentação Animal - Aplicações. **Rev Assoc Med Bras**, 56(1), 103-11, 2010.
- DE JESUS, L. I. et al. Enantioselective fungal biotransformation of risperidone in liquid culture medium by capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction. **Electrophoresis (Weinheim. Print)**, v. 32, p. 2765-2775, 2011.
- DENG, P. Y. et al. Stimulation of calcitonin gene-related peptide synthesis and release: mechanisms for a novel antihypertensive drug rutaecarpine. **J. Hypertens.**, v. 22, p. 1819–1829, 2004.
- DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 4, p. 265–267, 1969.
- DOMER, F. R. Animal experiments in pharmacological analysis. [S.l.]: [s.n.], 1971. p. 669.
- DONATINI, R. S. et al. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 89-94, Jan./Mar 2009.
- DONG X., X.; SMOLL, E. J.; KO, K. H. P2Y receptors mediate Ca²⁺ signaling in duodenocytes and contribute to duodenal mucosal bicarbonate secretion. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 2009. 296:G424–G432.
- DONG, M. H.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Stomach and duodenum**, 22:599–606, 2006.
- DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v. v. 7, 2006.
- D'YAKONOV, A. L.; TELEZHENETSKAYA, M. V. QUINAZOLINE ALKALOIDS IN NATURE. **Chemistry of Natural Compounds**, Vol. 33, No. 3. 221-267, 1997
- ESPLUGUES, J. A pharmacological approach to gastric acid inhibition. **Drugs.**, v. 65, p. 7-12., 2005.
- EVANGELISTA, S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. **Curr Pharm Des**, p. 2977–84, dez. 2006.
- EXARCHOU, V. et al. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. **J. Agric. Food Chem.**, 2002, v. 50, p. 5294-5299, 2002.
- FALCÃO, H. D. S. et al. Gastric and Duodenal Antiulcer Activity of Alkaloids: A Review. **Molecules**, v. 13, ISSN 1420-3049, 2008.
- FALLONE, C. A.; MORRIS, G. P. Topical nicotine protects rat gastric mucosa against ASA-induced damage. A role for mucosal fluid secretion in cytoprotection. **Digest. Dis. Sci.**, v. 40, p. 936-942, 1995.

- FARROW, D. C. et al. Gastroesophageal reflux disease, use of H₂ receptor antagonists, and risk of esophageal and gastric cancer. **Cancer causes and control**, v. 11, p. 231-238, 2000.
- FERREIRA, P. et al. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. **Planta**, v. 219, p. 319-324, 2004.
- FLEMSTRÖM, G.; ISENBERG, J. I. Gastroduodenal Mucosal Alkaline Secretion and Mucosal Protection. **News Physiol Sci**, February, 23-28, 2001
- FONSECA, P.; BONATO, P. S. Chiral HPLC analysis of venlafaxine metabolites in rat liver microsomal preparations after LPME extraction and application to an in vitro biotransformation study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, Issue: 2, p. 817-824, 2010.
- FORGIARINI, A. . E. J. . G. C. . S. Formation of nanoemulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. **Langmuir**, v. 17, p. 2076-2083, 2001.
- GANOG, W. F. Review of medical physiology. **Lange Medical Books**, San Francisco, n. 21 ed., 2003.
- GARCIA, E.S; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASINI, T. T. Fitoterápicos, janeiro, 17, 1996.
- GOMES, C. M. R.; RIBEIRO, P. L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 13(Supl. 1), p. 27-38, 1997.
- GOTO, P. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização in situ a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases**. UFOP. [S.l.], p. 31-32. 2011.
- GREEN, T.; DOCKRAY, G. Characterization of the peptidergic afferent innervation of the stomach in the rat. **Neuroscience** , v. 25, 1988.
- GRISHAM, M.; GRANGER, D. Neutrophil-mediated mucosal injury: role of reactive oxygen metabolites. **Dig Dis Sci**, 6S–15S, 1988.
- GROPPO, M. New Synonyms in *Hortia* and *Dictyoloma* (Rutaceae), with Validation of the Name *Hortia badinii*. **NOVON**, v. 20, p. 163–165, june 2010.
- GROPPO, M.; KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R. Synonymy of *Hortia arborea* with *H. brasiliana* (Rutaceae) and a new species from Brazil. **Brittonia**, march 28-34, 2005.
- GÜLCIN, I. et al. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts.. **Food Chem** , v. 83, p. 371-382, 2003.
- GUPTA, A. K.; KOHLI, Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and intraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and evaluation

- of combination antifungal activity. **British Journal of Dermatology**, v. 149, p. 296-305, 2003.
- GURIB, F. A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, 27 Feb 2006.
- GYÍRES, K.; MULLNER, K.; RONA, A. Activation of central opioid receptors may induce gastric mucosal defense in the rat. **J Physiol Paris**, v. 95., p. 189–96, 2001.
- HALL, J. E.; GUYTON, A. C. Fisiologia gastrointestinal. **Tratado de Fisiologia Médica**, 9 edição 715-723, 1997.
- HALTER, F.; TARNAWSKI, A. S.; SCHMASSMANN, A. Cyclooxygenase 2--implications of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, p. 443-453, 2001.
- HARADA, N.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M.; KATSURAGI, T. Contribution of capsaicin-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 285:G1214–G1224, 2003.
- HIGHAM, J.; KANY, J. Y.; MAJEED, A. Recent trends in admissions and mortality due to peptic ulcer in England: increasing frequency of haemorrhage among older subjects. **Gut**, p. 50:460-64, 2002.
- HIGHAM, J.; KANY, J.; MAYEED, A. Recent trends in admissions and mortality due to peptic ulcer in England: increasing frequency of haemorrhage among older subjects. **Gut**, 50: 460-464, 2002.
- HILÁRIO, V. C. et al. Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (Print)**, v. 61, p. 100-107, 2012.
- HOLZER, B. Neural emergency system in the stomach. **Gastroenterology** , v. 114, p. 823–39, 1998.
- HOLZER, P.; GUTH, P. Neuropeptide control of rat gastric mucosal blood flow. Increase by calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide, but not substance P and neurokinin A. **Circulation Research** , v. 68, p. 100-105, 1991.
- HOU, W.; SCHUBERT, M. L.. Gastric secretion.. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 593–598, 2006.
- HRITZ, I.; HERSZENYI, L.; MOLNAR, B. Proton pump inhibitor co-therapy normalizes the increased cell turnover of the gastric mucosa both in NSAID and selective COX-2 users. **Int J Immunopathol Pahrmacol**, 18:75–84, 2005.
- HU, C. P. et al. Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in cardioprotection of rutaecarpine in rats. **Regul. Pept.** , v. 114., p. 45–49, 2003.

- JAIN, R.; SAMUELSON, L. Differentiation of the gastric mucosa: role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** , v. 291, p. G762–G765, 2006.
- JANUÁRIO, A. H. et al. ALCALOIDES β -INDOLOPIRIDOQUINAZOLÍNICOS DE *Esenbeckia grandiflora* MART. (RUTACEAE). **Quim. Nova**9, v. 32, p. 2034-2038, 2000.
- JIANG, X.; SUZAKI, E.; KATAOKA, K. Immunofluorescence detection of gastric H⁺/K⁺-ATPase and its alterations as related to acid secretion. **Histochem Cell Biol** , v. 117, p. 21–27, 2002.
- JOHNSON, L.; CRISTENSEN, J.; GROSSMAN, J. Flemstrom G. Gastric and duodenal mucosal bicarbonate secretion. **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, New York, 1011-1034, 1987.
- JONES, MK; PADILLA, OR; WEBB, NA; NORNG, M. The anti-apoptosis protein, survivin, mediates gastric epithelial cell cytoprotection against ethanol-induced injury via activation of the p34(cdc2) cyclin-dependent kinase. **J Cell Physiol**, 215:750–64, 2008.
- JOSEPH, I.; ZAVROS, Y.; MERCHANT, J. A model for integrative study of human gastric acid secretion. **J Appl Physiol**, v. 94, p. 1602–1618, 2003.
- KAKUMANU, S.; TAGNE, J. B. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** , v. 7, p. 277–283, 2011.
- KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 926-950, 2011.
- KAWASHIMA, K. et al. Localization of calcitonin gene related peptide receptors in rat gastric mucosa. **Peptides** , v. 23 , p. 955–966, 2002.
- KENT, L. K.; DEBAS, H. Peripheral regulation of gastric acid secretion. **In Physiology of the Gastrointestinal Tract**, New York, p. 1126-1185, 1994.
- KHATTAB, F.; KHATTAB, I. Histological and Ultrastructural Studies on the Gastric Mucosa of Rat after Treatment with Ethylene Glycol. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, p. 157-168, mar. 2007.
- KOBAYASHI, T. et al. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 23 - 30, 2001.
- KONTUREK, P. C. et al. Melatonin affords protection against gastric lesions induced by ischemia-reperfusion possibly due to its antioxidant and mucosal microcirculatory effects. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 322, p. 73-77, 1997.

- KOSONE, T.; TAKAGI, H.; KAKIZAKI, S. Integrative roles of transforming growth factor-alpha in the cytoprotection mechanisms of gastric mucosal injury. **BMC Gastroenterol** , p. 22, jun. 2006.
- KOUNTOURAS, J.; CHATZOPOULOS, D.; ZAVOS, C. Reative oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. **Hepatogastroenterology** , v. 48: , p. 743-51, 2001.
- KULAKSIZ, H.; ARNOLD, R.; GÖKE, B. Expression and cell-specific localization of the cholecystokinin B/gastrin receptor in the human stomach. **Cell Tissue Res** , v. 299, p. 289–298, 2000.
- KURATA, J. H. Epidemiology of peptic ulcer disease. **Clin Gastroenterol**, p. 13:289, 1984.
- KUTCHAI, H. Gastrointestinal secretions. **In: principles of Physiology**, St. Louis, Missouri, n. Berne RM, Levy MN, p. 516-589, 1996.
- LA CASA C, VILLEGAS I, ALARCÓN DE LA LASTRA C, MOTILVA V, MARTÍN CALERO MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J Ethnopharmacol** , p. 71: 45-5, 2000.
- LAINÉ, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWS, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **GASTROENTEROLOGY**, v. 135, p. 41–60, 2008.
- LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Res Ther** , p. 1–6., out. 2008.
- LEE, S. H. et al. Progress in the Studies on Rutaecarpine. **Molecules** , v. 13, p. 272-300, 2008.
- LEVENSTEIN, S. Stress and peptic ulcer: life beyon Helicobacter. **BMJ.**, v. 316, 1998.
- LICHTENBERGER, L. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Opin Gastroenterol**, p. 15:463–472., 1999.
- LILES, J. H.; FLECKNELL, P. A. The influence of buprenorphine or bupivacaine on the post-operative effects of laparotomy and bile-duct ligation in rats. **Laboratory Animals**, 27, 374-380, 1993.
- LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 197-201, 2006.
- LIMA, Z. et al. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? **J Ethnopharmacol**, v. 106, p. 29-37., 2006.
- LOW, S. et al. The role of protein nitration in the inhibition of platelet activation by peroxynitrite. **FEBS Lett** , v. 511, p. 59–64, 2002.
- MABE, K.; YAMADA, M.; OGUNI, I. In vitro and in vivo activities of tea catechins aigainist Helicobacter pylori. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p. 1788-1791, 1999.

- MAGINA, M. D. A. et al. **Antifungal activity of three Eugenia species. In: 1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**, São Pedro, SP, 2007.
- MARTI, G.; WALLACE, J. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Exp Biol Med (Maywood)**, 231:130–136, 2006.
- MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2a. ed. [S.l.]: Eduções UFC, p. 43-57, 1997.
- MCCARTHY, D. Ulcers, Helicobacter pylori infection, platelets and gastrointestinal complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs: what are the connections? **Eur J Surg Suppl**, v. 587, p. 89–99, 2002.
- MCLAUGHLIN, A.; SAIZARBITORI, T.; ANDERSON, J. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. **Rev Soc Venez Quim**, v. 18, p. 13-18, 1995.
- MELWANKI, M. B.; FUH, M.-R. Partitioned dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, p. 24-28, 2008.
- MEYER, B. N. et al. Brime shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. **Planta Med**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 360-71, 2001.
- MILTON GROPPA, J. A. K. J. R. P. Synonymy of Hortia arborea with H. brasiliana. **The New York Botanical Garden Press**, 31 março 28-34, 2005.
- MINCIS, M.; CHEBLI, J. M. F.; KHOURI, S. T. Etanol e o trato gastrointestinal. **Arq Gastroenterol.**, v. 32, p. 131-139, 1995.
- MODLIN, I.; KIDD, M.; LYE, K. Gastric stem cells: an update. **Keio J Med**, v. 52, p. 134–7, 2003.
- MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of muçus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosa injury in rats. **Physiol. Res.**, v. 49, p. 41-46, 2000.
- MOLINARI, S. L. et al. NADH-DIAPHORASE POSITIVE MYENTERIC NEURONS OF THE AGLANDULAR REGION OF THE STOMACH OF RATS (Rattus norvegicus) SUBJECTED TO DESNUTRITION. **Rev. chil. anat.**, v. 20, 2002.
- MONTROSE, M. H.; YASUTADA, A.; TAKEUCHI, K. Gastroduodenal mucosal defense. **In: L.R. Johnson**, New York, n. Academic Press, p. 1259–1291, 2006.
- MOON, T. C.; MURAKAMI, M.; KUDO, I.; SON, K. H.; KIM, H. P.; KANG, S. S.; CHANG, H. W. A new class of COX-2 inhibitor, rutaecarpine from Evodia rutaecarpa. **Inflammation Research**, 48 621–625, 1999.

- MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T. Physicochemical characterization of Canola oil/water nano-emulsion obtained by HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. v. 27, p. 109-115, 2006.
- MORALES, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; GARCIA-CELMA, M. J. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. **Langmuir**, v. 19, p. 7196-7200, 2003.
- MOTILVA, V. et al. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in chronic gastric lesion induced by acetic acid in rat.. **Gen. Pharmacol.** , v. 27, p. 545–550, 1996.
- MUNNANGI, S. Time trends of physician visits and treatment patterns of peptic ulcer disease in the United State. **Arch Intern Med**, p. 157:1489-94, 1997.
- NAJM, W. I. Peptic Ulcer Disease. **Prim Care Clin Office Pract**, v. 38 , p. 383–394, 2011.
- NAKAMURA, E. et al. Luminal amino acid-sensing cells in gastric mucosa. **Digestion**, v. 83, p. 13–18, 2011.
- NAM, K. W.; JE, K. H.; SHIN, Y. J. Inhibitory Effects of Furoquinoline Alkaloids from *Melicope confusa* and *Dictamnus albus* against Human Phosphodiesterase 5 (hPDE5A) In Vitro. **Archives of Pharmcal Resource**, No 6 675-679, 2005.
- NGUYEN, T.; CHAI, J.; TANIGAWA, T. Novel roles of local IGF-1 activation in rat gastric ulcer healing: promotes actin polymerization, cell proliferation, re-epithelisation and induces COX-2 in PI3K-dependent manner. **Am J Pathol** 1219–28, 2007.
- OHNO, T.; HATTORI, Y.; KOMINE, R. Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. **Gastroenterology**, 134 215–225, 2008.
- OKABE, S.; PFEIFFER, C. J. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. **American Journal of Physiology**, v. 17, p. 619 – 629, 1972.
- OLIVEIRA, FLÁVIA CAMARGO; ALBUQUERQUE, ULYSSES PAULINO; FONSECA-KRUEL, VIVIANE STERN; HANAZAKI, NATALIA. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 23 fevereiro 590-605, 2009.
- PACHTER, I. J.; RAFFAUF, R. F.; ULLYOT, G. E.; RIBEIRO, O. The alkaloids of *Hortia arborea* engl. **Journal of the American Chemical Society**, 5 oct 5187-5193, 1960.
- PAI, R.; SOREGHAN, B.; SZABO, I. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nat Med**;8:289–93, 2002.

- PARK, J. S. et al. Capsaicin protects against ethanolinduced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. **Life Sci.**, v. 67, p. 3087-3093, 2000.
- PELLATI, F. et al. Development and validation of HPLC methods for the analysis of phenethylamine and indoloquinazoline alkaloids in *Evodia* species. **J. Sep. Sci.**, v. 29, p. 641 – 649, 2006.
- PICÓ, Y. et al. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 117–131, March 2007.
- PINEDO-RIVILLA, C.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Enantiomeric oxidation of organic sulfides by the filamentous fungi *Botrytis cinerea*, *Eutypa lata* and *Trichoderma viride*. **J. Mol. Catal.B: Enzym.**, v. 49(1-4), p. 18-23, 2007.
- PITTLER, E. et al. Enantioseparation of amino acids, α -hydroxy acids, and dipeptides by ligand-exchange CEC using silica-based chiral stationary phases. **Electrophoresis** **30**, AUG 2009.
- POHLE, T.; BRZOZOWSKI, T.; BECKER, J. C. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage. **Aliment Pharmacol Ther**, 677-687, 2001..
- PORTH, C. M.; KUNERT, M. P. **Pathophysiology Concepts of Altered Health States**. sexta edição. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2002.
- PUPO, M. T. et al. Fungal Biotransformations: a Powerful Tool in Drug Metabolism Studies. In: Ratul Saikai; Rajib L. Bezbaruah; Tarun Ch. Bora. (Org.), New Delhi: New India Publishing Agency, 47-66, 2008.
- RAGHUNATH, A. S.; MORAIN, C. O.; MCLOUGHLIN, R. C. Review article: the long-term use of proton-pump inhibitors. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 22 (Suppl. 1), p. 55–63, 2005.
- RAVIA, S. P. et al. Novel fungi-catalyzed reduction of α -alkyl- β -keto esters. **Tetrahedron : asymmetry**, v. 20, p. 1393-1397, 2009.
- REPETTO, M.; LLESUY, S. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 523–34, maio 2002.
- REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1–9, 2006.
- RIAL-OTERO, R. et al. **Talanta. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview**, v. 71, p. 503-514, 2007.
- ROBINSON, M. Review article: the pharmacodynamics and pharmacokinetics of proton pump inhibitors-overview and clinical implications. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 20, p. 1-10, 2004.

- RUDAZ, S. et al. Enantioseparation of Venlafaxine and O-Desmethylvenlafaxine by Capillary Electrophoresis with Mixed Cyclodextrins. **Chromatographia**, v. 50, p. 369-372, 1999.
- RUDAZ, S. et al. Infinite enantiomeric resolution of basic compounds using highly sulfated cyclodextrin as chiral selector in capillary electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, v. 24 (15), p. 2633-2641, August 2003.
- RUFINO, M. D. S. M. et al. Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico on line**, Fortaleza, 2007.
- RUIZ, A. L. T. G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, p. 15(2): 98-102, junho 2005.
- SACHS, G.; SHIN, J. Pharmacology of the gastric acid pump: the H⁺,K⁺ ATPase. **Annu. Rev. Pharmacol.**, v. 35, p. 277-305, 1995.
- SAMUELSON, L. C.; HINKLE, K. L. Insights into the regulation of gastric acid secretion through analysis of genetically engineered mice. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 65, p. 383–400, 2003.
- SANTANA, F. J. M. et al. Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences. [S.l.]: [s.n.], p. 19-49. 2009.
- SANTANA, F. J. M.; JABOR, V. A. P.; BONATO, P. S. Chiral determination of antidepressant drugs and their metabolites in biological samples. **Bioanalysis**, v. 1, p. 221-237, 2009.
- SANTOS, V. R. L. **Distribuição de macrófagos e alterações no coração e na medula espinhal de cães inoculados com formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice 78 do Trypanossoma cruzi submetidos a imunossupressão durante a fase aguda da infecção.** UFOP. Ouro Preto, p. 30. 2006.
- SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 18, p. 639–649, 2002.
- SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, p. 536–542, 2011.
- SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **GASTROENTEROLOGY**, v. 134, p. 1842–1860, 2008.
- SCHUBERT, M.; EDWARDS, N.; MAKHLOUF, G. Regulation of gastric somatostatin secretion in the mouse by luminal acid: a local feedback mechanism. **Gastroenterology**, v. 94, p. 317–322, 1988.
- SCHUBERT, M.; HOU, M. Treatment of gastric carcinoids. **Curr Treat Options Gastroenterol**, v. 10, p. 123–133, 2007.

- SEVERINO, V. G. P.; SILVA, M. F. G. Determination of the antibacterial activity of crude extracts and compounds isolated from *Hortia oreadica* (rutaceae) against oral pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 40: 535-540, 2009.
- SEVERINO, VANESSA GISELE PASQUALOTTO; CAZAL, CRISTIANE MELO; FORIM, MOACIR ROSSI; SILVA, MARIA FÁTIMA DAS GRAÇAS FERNANDES; VIEIRA, PAULO CÉZAR. Isolation of secondary metabolites from *Hortia oreadica* (Rutaceae) leaves through high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, p. 4275–4281, 2009.
- SHAH, V. et al. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. **GASTROENTEROLOGY**, v. 126, p. 903–913, 2004.
- SHEU, J. R. Pharmacological Effects of Rutaecarpine, an Alkaloid Isolated from *Evodia rutaecarpa*. **Cardiovasc. Drug Rev.**, 17. 237-245, 1999.
- SHEU, J. R. et al. Antithrombotic effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*, on platelet plug formation in in vivo experiments.. **Br. J. Haematol.**, v. 110, p. 110–115, 2000.
- SHIN, J. M. et al. The gastric HK-ATPase: structure, function, and inhibition. **Pflugers Arch**, v. 457, p. 609–622, January, 2009.
- SILVA, S. R. C.; CUNHA DE SÁ, B. P.; LENGYEL, A.-M. J. Ghrelina e secretagogos do hormônio de crescimento (GHS): modulação da secreção do hormônio de crescimento e perspectivas terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 52, n. 5, July, 2008.
- SINGER, G.; TRIADAFILOPOULUS, G. Epidemiology of NSAID induced GI complications. **F Rheumatol**, 26 18-24, 1999.
- SMITH, V.; DHATT, N.; BUCHAN, A. The innervation of the human antro-pyloric region: organization and composition. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 79, p. 905–918, 2001.
- SOARES, L. E. C.; MENICHINI, F.; MONACHE, F. D. Tetranortriterpenoids and Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Hortia colombiana*. **Journal Brazilian Chemical Society**, 13 march 339-344, 2002.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, fevereiro 352-355, 2007.
- SUAREZ, L. E. C. Tetranortriterpenoids and Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Hortia colombiana*. **J. Braz. Chem. Soc.**
- SZABO, S.; VINCZE, Á. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **Journal of Physiology**, v. 94, p. 77-81, 2000.
- TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZ, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Jap J Pharmacol**, v. 19, p. 418-426, 1969.

- TAKEUCHI, K. et al. ISE, F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced HCO₃-secretion in stomach. **Jour. of Phys. and Pharm**, v. 57, p. 661-676, 2006.
- TANAKA, A.; ARAKI, H.; HASE, S. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in reresponse. **J Physiol Paris**, v. 95, p. 21–27, 2001.
- TANAKA, A.; ARAKI, H.; HASE, S. Roles of COX-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal antiinflammatory drug-induced gastric damage in rats: relation to functional responses. **Aliment Pharmacol Ther** , v. 16, p. 90–101, 2002.
- TARI, A.; KAMIYASU, T.; YONEI, Y. Role of gastrin/CCK-B receptor in the regulation of gastric acid secretion in rat. **Dig Dis Sci**, v. 42, p. 1901–1907, 1997.
- TARNAWSKI, A. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig Dis**, v. 50, p. S24–33, 2005.
- TARNAWSKI, A.; STACHURA, J.; DURBIN, T. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, 102:695–8, 1992.
- TINTO, W. F. Hortiamide, a new tyramine alkaloid from *Hortia regia*. **Journal of Natural Products**, november, 1676-1678, 1992.
- TOMA, W. et al. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 345-351, 2004.
- TOMINAGA, K. et al. In vivo action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, p. 547–552, 2002.
- TULASSAY, Z.; HERSZÉNYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24 , p. 99–108, 2010.
- TYAGARAJAN, K. et al. Structural interactions between a and b-subunits of the gastric H,K-ATPase. **Biochimic et Biophysica Acta.**, v. 1236, p. 105-113, 1995.
- VASANTH, S.; KUNDU, A. B. Biological activities of limonoids. **Journal of scientific industrial research**, v. 50, n. 11, p. 884-896, 1991.
- VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activities and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain product. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.
- VIDYAVATHI, M. et al. Rapid HPLC Determination of Venlafaxine in Microbial Biotransformation Studies. **Current Trends Biotechnological and Pharmacy**, v. 3, p. (1) 64-70, January 2009.
- WADIE, N. I. Peptic Ulcer Disease. **Prim Care Clin Office Pract**, v. 38, p. 383–394, 2011.

WALLACE JL; MILLER MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119(2), p. 512-20., Aug 2000.

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

WALLACE, J. et al. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor. **Br J Pharmacol**, v. 148, p. 274–8, 2006.

WALLACE, J. L. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **The American Journal of Medicine**, v. 110, p. 19-23, 2001.

WALLACE, J.; MCKNIGHT, G. The mucoid cap over superficial gastric damage in the rat. A high-pH microenvironment dissipated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and endothelin. **Gastroenterology**, v. 99, p. 295–304, 1990.

WANG, GJ; SHAN, J.; PANG, P.K.T; YANG, M.C.M; CHOU, C. The vasorelaxing action of rutaecarpine: Direct paradoxical effects on intracellular calcium concentration of vascular smooth muscle and endothelial cells. **J Pharmacol Exp Ther**, 1016–1, 1996.

WANG, GUEI JANE; WU, XI CHEN; CHEN, CHIEH FU; LIN, LIE CHWEN; HUANG, YI TSAU; SHAN, JIE; PANG, PETER K. T. Vasorelaxing Action of Rutaecarpine: Effects of Rutaecarpine on Calcium Channel Activities in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, 28 January, 1237–1244, 1999

WOLFE, M.; SOLL, A. The physiology of gastric acid secretion. **T. N Engl J Med**, v. 26, p. 1707-15, 1988.

WU, J. et al. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 5917-5921, 2005.

XIAO YU, Y. et al. Gastroprotective Effect of Fructus Evodiae Water Extract on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, No. 6, p. ,1027–1035, 2006.

XIONG, J.; HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, p. 7–18, June 2008.

YANG, Y.; WU, W.; TAI, E. The cationic host defense peptide rCRAMP promotes gastric ulcer healing in rats. **Pharmacol Exp Ther**, v. 318, p. 547–554, 2006.

YAROSH, D. B. et al. Anti- inflammatory activity in skin by biomimetic of *Evodia rutaecarpa* extract from traditional Chinese medicine. **J. Dermatol. Sci.**, v. 42, p. 13–21, 2006.

YING-Z, I. et al. Reduction of asymmetric dimethylarginine in the protective effects of rutaecarpine on gastric mucosal injury. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 86, p. 675-681, 2008.

YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, H.; LI, Y. 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**, v. 65, p. 27-32, 1999.

ZANNER, R.; HAPFELMEIER, G.; GRATZL, M. Intracellular signal transduction during gastrin-induced histamine secretion in rat gastric ECL cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 282, p. C374–C382, 2002.