

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

NEYRES ZÍNIA TAVEIRA DE JESUS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO
ETANÓLICO BRUTO E DA FASE HEXÂNICA DE *Hyptis suaveolens*
(L.) Poit (LAMIACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

JOÃO PESSOA-PB

2012

NEYRES ZÍNIA TAVEIRA DE JESUS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DA FASE HEXÂNICA
DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (LAMIACEAE) EM
MODELOS ANIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte do requisito para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientadora: Prof^a. Dra. Leônia Maria Batista

João Pessoa-PB

2012

J58a Jesus, Neyres Zínia Taveira de.
Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico
bruto e da fase hexânica de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit
(Lamiaceae) em modelos animais / Neyres Zínia Taveira de
Jesus.- João Pessoa, 2012.
131f. : il.
Orientadora: Leônia Maria Batista
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS
1. Farmacologia. 2. Produtos Naturais. 3. *Hyptis suaveolens*
(Lamiaceae). 4. Gastroprotetora. 5. Antioxidante.

UFPB/BC

CDU: 615(043)

NEYRES ZÍNIA TAVEIRA DE JESUS


AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DA FASE HEXÂNICA DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (LAMIACEAE) EM MODELOS ANIMAIS

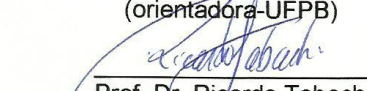
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte do requisito para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração em Farmacologia.

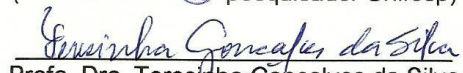
Aprovada:

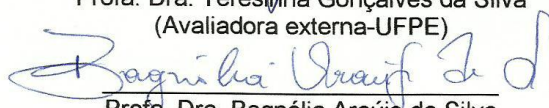
07 de dezembro de 2012

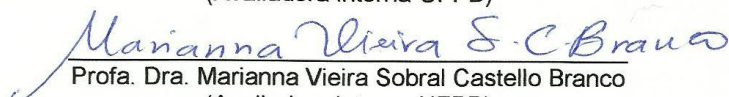
Banca examinadora:


Prof. Dra. Leônia Maria Batista
(orientadora-UEPB)


Prof. Dr. Ricardo Tabach
(Avaliador externo- pesquisador Unifesp)


Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
(Avaliadora externa-UFPE)


Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Avaliadora interna-UEPB)


Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco
(Avaliadora interna-UEPB)

“Que teu coração não tenha vaidade em razão do quanto conheces. Busca conselho tanto junto ao ignorante quanto junto ao sábio, pois os limites da arte são inatingíveis e não existe artesão que tenha atingido a perfeição”.

Ptah- Hotep- Egito antigo

**Dedico ao meu pai, Benedito Pedroso de Jesus, que
um dia sonhou em ter uma filha farmacêutica e à minha
mãe,
Iolanda Taveira Rosa, por ajudá-lo a realizar esse
sonho.**

**Ao meu companheiro Uirá Rodrigues Schroeder, pelo
apoio incondicional e ao meu filho Gabriel de Jesus
Schroeder
que é a razão de tudo.**

AGRADECIMENTOS

À professora doutora Leônia Maria Batista, orientadora, por seu amor e dedicação à ciência e por ter aceitado o desafio de realizar este projeto de pesquisa em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Rogério Alexandre Nunes dos Santos (UNEMAT), por sua generosidade e por me apresentar a este programa de Pós-graduação tão ilustre.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB, na pessoa da Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, pelo apoio recebido durante a realização do doutorado.

Ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, pela parceria na realização dos procedimentos fitoquímicos e ao Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho pelo apoio e generosidade.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB, pela dedicação ao ofício de ensinar e pela doce convivência no período de realização das disciplinas.

À Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso (SES-MT) e ao Centro Estadual de Alta e Média complexidade (CERMAC), na pessoa da sua diretora, Cresa Moreira Pinto por conceder a licença das minhas funções de Farmacêutica, necessária ao cumprimento desta tarefa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo apoio a esta pesquisa, por meio do aporte dos recursos financeiros referentes ao projeto 445323/2009.

À Universidade de Cuiabá pelo apoio no transcorrer do trabalho, nas pessoas da profa. Ilza Martha de Souza e profa. MSc. Angela Maria Selhost Beserra diretoras do curso de Farmácia, bem como à profa. Ângela Maria Nolasco Monteiro, coordenadora do ciclo básico e do Professor Dr. Marcial Francis Galera, diretor do Curso de Medicina da Universidade de Cuiabá.

Aos servidores da Universidade Federal da Paraíba, em especial às secretárias Tânia Maria Alves e Carolina Helena Meireles de Medeiros Manguiera e ao servidor da UFPB e responsável pelo biotério José Crispim Duarte pelo carinho, paciência e atenção.

À servidora da empresa ALERTA, Mônica Rodrigues da Silva, pelo auxílio e palavras de carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. João Batista de Pinho, do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso, pela colaboração na coleta do material botânico.

Ao Prof. MSc Iberê Ferreira da Silva Júnior (UNIC/UFMT) pela amizade e apoio na realização da análise fitoquímica preliminar e ensaios da atividade antimicrobiana, bem como ao Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins por sua generosidade ao permitir a realização dessas análises nas dependências do seu laboratório (UFMT).

À Profa. Dra. Nair Honda Kawashita (UFMT) e sua equipe pela colaboração na realização dos ensaios da atividade antioxidante, fundamental para a conclusão deste estudo.

Ao Instituto *Plantarum* para Estudos da Flora em Nova Odessa-SP, em especial ao MSc. Harri Lorenzi pela ratificação taxonômica da planta.

À MSc. Isis Fernandes Gomes pela obtenção das fases da planta e padronização do seu extrato e fase realizados juntamente com Dr. Sócrates Gólzio dos Santos. Agradeço também a ambos pelas palavras de incentivo durante o transcorrer deste trabalho.

À MSc. Aline Lira Xavier e MSc. João Carlos Lima Rodrigues Pita pela realização dos ensaios bioquímicos e hematológicos e pela atitude sempre receptiva na intenção de colaborar com este trabalho.

À MSc. Hermann Ferreira Costa, colega de turma do doutorado, Amanda Paula Izidro Bezerra e Adriano Francisco Alves pela realização das análises histológicas.

Aos colegas do Laboratório de farmacologia do trato gastrointestinal, Dra. Heloína de Souza Falcão, MSc. Gedson Rodrigues de Moraes Lima, MSc. Camila Albuquerque, MSc. Flávia Danniele Frota Machado, Marcelo Ricardo Dutra Caldas Filho, Igor Rafael Praxedes de Sales, Thaylan M. Souza, Raphaela Francelino do Nascimento, Rodrigo de Oliveira Formiga e Vitor Thiago Cavalcante de Carvalho pela amizade e auxílio na realização dos experimentos.

Aos meus futuros alunos, que tornam necessário o aperfeiçoamento constante.

Aos animais de laboratório, que com sua vida, colaboram para o desenvolvimento da ciência e a cura das doenças humanas.

RESUMO

Partes aéreas de *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae), conhecida como “alfazema-brava” e “tapera-velha”, são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de problemas gástricos, inflamações e infecções. Estudos farmacológicos realizados com esta espécie e evidenciaram as atividades antinociceptiva, cicatrizante, anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo deste estudo foi realizar ensaios farmacológicos relacionados à gastroproteção, cicatrização e toxicidade de *Hyptis suaveolens*, na perspectiva de validar a sua eficácia e segurança e corroborar aos dados já existentes. Para isto, foi realizada uma triagem comportamental e ensaio da toxicidade aguda do extrato etanólico-EEtOH-*Hs* e fase hexânica-FaHex-*Hs* (2.000 mg/kg). Foi realizada uma triagem farmacológica utilizando o EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs*, fase diclorometânica-FaDCM-*Hs* e fase acetato de etila-FaAE-*Hs* pelo modelo de indução de úlceras gástricas por etanol acidificado. Foram realizados ensaios de indução de úlceras agudas pelo etanol, AINES, estresse por imobilização e frio (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg), contensão do suco gástrico por ligadura do piloro e isquemia-reperfusão (250 mg/kg). Para avaliar a propriedade cicatrizante do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, foi realizado o ensaio de indução de úlceras por ácido acético e avaliação da toxicidade do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* por doses repetidas durante 14 dias nesse modelo. Realizou-se a investigação do efeito contra a bactéria *Helicobacter pylori* pelo método de difusão em ágar. Os parâmetros do suco gástrico foram avaliados no ensaio de ligadura do piloro. Foram investigadas as participações do muco, grupamentos sulfidrilas e NO na gastroproteção do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*. Foram determinados os parâmetros antioxidantes pela determinação dos níveis de lipoperoxidação (LPO) e atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na mucosa gástrica, utilizando o modelo de isquemia-reperfusão. A administração do EEtOH-*Hs*, provocou hiperatividade nos animais, entretanto, não causou morte nos animais, não tendo sido possível determinar a DL₅₀. Nenhum sinal de toxicidade foi evidenciado nos animais tratados com a FaHex-*Hs*. O EEtOH-*Hs*, bem como todas as fases testadas promoveram inibição significativa do índice de lesão ulcerativa-ILU no modelo de indução por etanol acidificado, sendo que a FaHex-*Hs* foi a mais eficaz. O EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs*, reduziram significativamente o ILU nos modelos de úlceras gástricas induzidas por todos os agentes lesivos. O EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* não alteraram os parâmetros do suco gástrico e os níveis de muco gástrico, entretanto, foram observadas alterações na área de lesão ulcerativa-ALU mediante a utilização do bloqueador de grupamentos sulfidrilas, indicando sua participação na atividade gastroprotetora. Foi observada inibição da peroxidação lipídica e aumento da atividade da enzima SOD da mucosa gástrica. Portanto, o efeito gastroprotetor do EEtOH-*Hs* e da FaHex-*Hs* pode envolver mecanismos antioxidantes e citoprotetores.

Palavras-chave: *Hyptis suaveolens*, lamiaceae, gastroprotetora, antioxidante.

ABSTRACT

Aerial parts of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae), known as “alfazema-brava”, “tapera-velha”, “erva-canudo”, “cheirosa” and “alfavacão”, is used in traditional medicine to treat stomach ailments, inflammations and infections. The aim of this study was to evaluate the gastroprotection, wound healing and toxicity of *Hyptis suaveolens*, with a view to validate its efficacy, safety as well as to corroborate existing data. To this end, behavioral evaluation and acute toxicity study of the ethanol extract (EEtOH-*Hs*) and hexane fraction (FaHex-*Hs*) at a single dose of 2.000 mg/kg (p.o) was performed in mice. Pharmacological effects, in particular, the gastroprotective activities of EEtOH-*Hs* and FaHex-*Hs* were evaluated. Initial pharmacological screening was conducted with EEtOH-H, Hs-FaHex, dichloromethanic fraction (FaDCM-*Hs*) and ethyl acetate fraction (FaAE-*Hs*) against acidified ethanol-induced gastric ulcers. Acute gastric ulcers induced by ethanol, NSAIDs, immobilization and cold stress, at the were carried out at doses of 62.5, 125, 250 and 500 mg / kg (po), and at 250 mg/kg (id) in gastric juice containment by pylorus ligation and ischemia-reperfusion. To evaluate ulcer healing property of EEtOH-*Hs* and FaHex-*Hs*, acetic acid-induced ulcers experiment was realized. In addition the toxicity of EEtOH-*Hs* and FaHex-*Hs* by repeated dosing for 14 days was also assessed using acetic acid ulcer model. The antimicrobial effect against *Helicobacter pylori* bacterium was investigated by agar diffusion method. Gastric juice parameters were evaluated in the pylorus ligation assay. Next, was investigated participation of mucus, sulfhydryl groups and nitric oxide (NO) in the gastroprotection and determine endogenous antioxidants parameters through the levels of lipid peroxidation (LPO) and superoxide dismutase (SOD) activity in gastric mucosa following ulcers induction by ischemia-reperfusion. Oral administration of EEtOH-*Hs* caused hyperactivity in the animals. However, it caused no death to none of the animals. Thus it was not possible to determine LD₅₀. In this assay, no sign of toxicity was evidenced in animals treated with FaHex-*Hs*. In pharmacological screening, EEtOH-*Hs*, as well as all fractions studied (FaHex-*Hs*, FaDCM-*Hs*, FaAE-*Hs*) caused significant inhibitions of the ulcerative lesion index (ULI) in the acidified ethanol ulcer model, being that FaHex-*Hs* was the most effective. EEtOH-*Hs* and FaHex-*Hs*, significantly reduced ULI in all models tested. EEtOH-*Hs* and FaHex-*Hs* exhibited healing properties in the acetic acid model of ulcers. EEtOH-*Hs* and FaHex-*Hs* had no effect on the gastric juice parameters and left unaltered the levels of mucus of the gastric mucosa. However changes were observed in the ulcerative lesion area (U.L.A) with the use of sulfhydryl groups' blocker, inhibition of lipid peroxidation and increased SOD activity in the gastric mucosa. Therefore, the antiulcerogenic effect of EEtOH-*Hs* and FaHex-*Hs* may involve antioxidant and cytoprotective mechanisms.

Keywords: *Hyptis suaveolens*, lamiaceae, gastroprotection, antioxidant

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Mecanismos de regulação da secreção ácida gástrica	30
2	Vias de formação de EROs, processo de peroxidação lipídica e papel da glutatona e outros antioxidantes	39
3	Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo	45
4	Fotos da planta <i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit.	47
5	Fotos da planta <i>Hyptis suaveolens</i> e sua respectiva exsicata	51
6	Marcha fitoquímica para obtenção do EEtOH e das fases de <i>Hyptis suaveolens</i>	54
7	Fluxograma do protocolo experimental	57
8	Fotos da Lupa Olympus optical e estômago ulcerado	59
9	Foto da úlcera crônica induzida por ácido acético	63
10	Fotos dos estômagos de ratos pré-tratados com veículo (A), carbenoxolona(B) e EEtOH- <i>Hs</i> (62,5 (C), 125 (D) 250 (E) e 500 mg/kg (F) e submetidos à indução de úlcera por etanol	78
11	Fotos dos estômagos de ratos pré-tratados com veículo (A), carbenoxolona(B) e FaHex- <i>Hs</i> (62,5 (C), 125 (D) 250 (E) e 500 mg/kg (F) e submetidos à indução de úlcera por etanol	78
12	Fotos dos estômagos dos ratos pré-tratados (v.o) com Tween 80 8% (A), rutina (B), EEtOH- <i>Hs</i> (C), FaHex- <i>Hs</i> (D) e grupo <i>sham</i> (E) no modelo de úlcera por isquemia-reperfusão	82
13	Fotos dos cortes histológicos dos estômagos dos ratos corados com azul de toluidina, pré-tratados (v.o) com Tween 80 8% (A), Lansoprazol (B), EEtOH- <i>Hs</i> (C), FaHex- <i>Hs</i> (D) e grupo <i>sham</i> (E) no modelo de úlcera por ácido acético	89

- 14 Fotos dos cortes histológicos dos estômagos dos ratos corados com hematoxilina eosina, pré-tratados (v.o) com Tween 80 8% (A), Lansoprazol (B), EEtOH-*Hs* (C), FaHex-*Hs* (D) e grupo sham (E) no modelo de úlcera por ácido acético 90
- 15 Efeito do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* no crescimento da bactéria *H. pylori* em meio de cultura (ágar sangue) 91
- 16 Fotos de estômagos dos ratos ulcerados pelo etanol, tendo sido pré-tratados com solução Tween 80 8% (A), Tween/carbenoxolona (B), Tween/EEtOH-*Hs* (250mg/kg) (C), Tween/FaHex-*Hs* (250 mg/kg) (D), e NEM/Tween (E), NEM/carbenoxolona (F), NEM/EEtOH-*Hs* (250mg/kg) (G), NEM/FaHex-*Hs* (250 mg/kg) (H) 94
- 17 Fotos de estômagos dos ratos ulcerados e pré-tratados (v.o) com solução Tween 80 8% (A), Tween/carbenoxolona (B), Tween/EEtOH-*Hs* (250mg/kg) (C), Tween/FaHex-*Hs* (250 mg/kg) (D), e NEM/Tween (E), L-NAME/carbenoxolona (F), L-NAME/EEtOH-*Hs* (250mg/kg) (G), L-NAME/FaHex-*Hs* (250 mg/kg) (H) 95

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO		PÁGINA
1	Efeito da administração oral do veículo, rotina, EEtOH- <i>Hs</i> e FaHex- <i>Hs</i> nas úlceras agudas induzidas por isquemia- reperfusão em ratos	82
2	Efeito da administração oral do veículo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e lansoprazol nas úlceras agudas induzidas por ácido acético em ratos	83
3	Efeito da administração oral do veículo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e lansoprazol no número de mastócitos nas úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos	89
4	Efeito da administração intraduodenal do veículo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e cimetidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro	92
5	Efeito da administração oral do veículo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e carbenoxolona nas úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos pré tratados com NEM	93
6	Efeito da administração oral do veículo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e carbenoxolona nas úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos pré tratados com L-NAME	95
7	Efeito da administração oral do veículo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e carbenoxolona na produção de muco da parede gástrica	96
8	Efeito da administração oral do veículo, rotina, EEtOH- <i>Hs</i> e FaHex- <i>Hs</i> nas níveis de MDA em ratos	97
9	Efeito da administração oral do veículo, rotina, EEtOH- <i>Hs</i> e FaHex- <i>Hs</i> na atividade da SOD da mucosa gástrica em ratos	98

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Principais fatores defensivos da mucosa gástrica	32
2A	Efeito do EEtOH- <i>Hs</i> no ganho de peso corporal, consumo de ração e consumo de água em camundongos depois de 14 dias de observação	72
2B	Efeito da FaHex- <i>Hs</i> no ganho de peso corporal, consumo de ração e consumo de água em camundongos depois de 14 dias de observação	73
3	Efeito da administração oral de lansoprazol, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> , FaDCM- <i>Hs</i> e FaAE- <i>Hs</i> nas úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos	75
4	Efeito da administração de veículo (Tween 80 8%), controle positivo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e controle positivo nas úlceras agudas induzidas por etanol em roedores	77
5	Efeito da administração de veículo (Tween 80 8%), controle positivo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e controle positivo nas úlceras agudas induzidas por AINES (Piroxicam) em roedores	79
6	Efeito da administração de veículo (Tween 80 8%), controle positivo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e controle positivo nas úlceras agudas induzidas por estresse por imobilização e frio em roedores	80
7	Efeito da administração de veículo (Tween 80 8%), controle positivo, EEtOH- <i>Hs</i> , FaHex- <i>Hs</i> e controle positivo nas úlceras agudas induzidas por contensão da secreção gástrica por ligadura do piloro em roedores	81
8	Efeito da administração oral do EEtOH- <i>Hs</i> e FaHex- <i>Hs</i> durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético	84
9	Efeito da administração oral do EEtOH- <i>Hs</i> e da FaHex- <i>Hs</i> durante 14 dias sobre o peso dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético	85
10	Efeito da administração oral do EEtOH - <i>Hs</i> e FaHex- <i>Hs</i> durante 14 dias sobre o peso relativo dos órgãos dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético	86

11	Efeito da administração oral do EEtOH- <i>Hs</i> e FaHex- <i>Hs</i> durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos em ratos no modelo de úlceras induzidas por ácido acético	87
12	Efeito da administração oral do EEtOH- <i>Hs</i> e FaHex- <i>Hs</i> durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlceras induzidas por ácido acético	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	absorbância
ABTS	Sal diamônio
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AKAP	Proteína Ancoradora de Cinase
ALT	Alanina aminotransferase
ALU	Área de Lesão Ulcerativa
AMPc	3'5' adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Butilato hidroxianisol
Cag A	Citotoxina associada ao gene de patogenicidade <i>island</i>
CAT	Catalase
Cav	Canais de Ca ²⁺ sensíveis à voltagem
CCK2	Receptores de gastrina
CGRP	Peptídio Relacionado ao Gene da Calcitonina
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular
COX	Ciclooxigenase
CSNP	Compostos Sulfidrilas Não Proteicos

DAG	Diacilglicerol
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTNB	5,5'- dithil-bis (2-nitrobenzoic acid)
DPPH	1,1 Difenil-2-picrilhidrazil
ECL	Células semelhantes às Enterocromafins
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético sal dissódico
EEtOH- <i>Hs</i>	Extrato Etanólico obtido das partes aéreas de <i>Hyptis suaveolens</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EP	Receptor de Prostaglandina E
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
Fa-AE- <i>Hs</i>	Fase Acetato de Etila obtida das partes aéreas de <i>Hyptis suaveolens</i>
FaDCM- <i>Hs</i>	Fase Diclorometânica obtida das partes aéreas de <i>Hyptis suaveolens</i>
FaHex- <i>Hs</i>	Fase Hexânica obtida das partes aéreas de <i>Hyptis suaveolens</i>
GR	Glutathione Redutase
GPCRs	Receptores Acoplados à Proteína G
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSH	Glutathione oxidada
H ₂	Receptor histamínico do tipo 2
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
IC	Intervalo de confiança
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL	Interleucina

IP	Receptor de Prostaciclina
IP ₃	1, 4, 5 trisfosfato de inositol
i. p	Intraperitonal
ILU	Índice de Lesão Ulcerativa
L-NAME	<i>N</i> - Nitro-L-Arginina-Metil-Éster
LT	Leucotrieno
M	Molar
MDA	Malondialdeído
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
NAC	N-acetilcisteína
NEM	N-etilmaleimida
NFκB	Fator Nuclear kapa B
NOS _i	Sintase do óxido nítrico induzível
NOS _c	Sintase do óxido nítrico constitutiva
NR	Número de Registro
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
ONOO [•]	Peroxinitrito
PK	Proteína cinase
PNA	Peptídio Natriurético Atrial
PG	Prostaglandina
RO [•]	Radical alcóxil
RO ₂ [•]	Radical peróxil
s.c	Subcutânea
SGHR	Receptor Secretagogo do Hormônio de Crescimento
SH	Sulfidrila
SOD	Superóxido dismutase
SSTR	Receptores de Somatostatina
TGFα	Fator de Crescimento Transformador alfa

TNB	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide
Vac A	Citotoxina vacuolizante
VCM	Volume Corpuscular Médio
v.o	Via oral

Obs: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Considerações gerais	23
1.2	Fisiopatologia da úlcera péptica.....	24
1.2.1	Etiologia e epidemiologia	24
1.2.2	Secreção gástrica.....	28
1.2.3	Mecanismos de defesa da mucosa gástrica	31
1.3	Terapia da úlcera péptica	41
1.4	Plantas medicinais com atividade antiulcerogênica	43
1.5	Família Lamiaceae.....	44
1.6	<i>Hyptis jacq.</i> (Lamiaceae)	46
1.7	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit	46
1.7.1	Características gerais.....	46
1.7.2	Fitoquímica e farmacologia	47
2	OBJETIVOS	50
2.1	Geral	50
2.2	Específicos	50
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	Material	51
3.1.1	Material botânico	51
3.1.2	Local da pesquisa	52
3.1.3	Procedimentos fitoquímicos	52
3.1.4	Animais	54
3.1.5	Drogas utilizadas.....	55
3.2	Métodos	57
3.2.1	Ensaio toxicológico de <i>Hyptis suaveolens</i>	58
3.2.2	Avaliação da atividade gastroprotetora de <i>Hyptis suaveolens</i> em modelos de indução aguda de úlcera.....	58
3.2.3	Avaliação da atividade cicatrizante de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.....	62
3.2.4	Investigação do efeito antimicrobiano pelo método de difusão em ágar.....	65
3.2.5	Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit	66_Toc349123318
3.2.6	Avaliação da atividade antioxidante de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.....	68
3.3	Análises estatísticas	70
4	RESULTADOS	71

4.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	71
4.2 Avaliação da atividade gastroprotetora de <i>Hyptis suaveolens</i>	74
4.2.1 Indução de úlcera gástrica por etanol acidificado.....	74
4.2.2 Indução de úlcera gástrica por etanol	76
4.2.3 Indução de úlcera gástrica por anti-inflamatórios não esteroidais.....	79
4.2.4 Indução de úlcera gástrica por estresse por imobilização e frio	80
4.2.5 Indução de úlcera gástrica por ligadura do piloro.....	81
4.2.6 Indução de úlcera por isquemia-reperfusão	81
4.3 Avaliação da atividade cicatrizante de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit	83
4.3.1 Indução de úlcera gástrica por ácido acético	83
4.3.2 Avaliação da toxicidade do EEtOH-Hs e FaHex-Hs por doses repetidas durante 14 dias no modelo do ácido acético	84
4.4 Investigação do efeito antimicrobiano pelo método de difusão em ágar.....	90
4.5 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.....	91
4.5.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico, após contensão da secreção gástrica.....	91
4.5.2 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas - SH na gastroproteção	93
4.5.4 Determinação da concentração do muco aderido à parede gástrica	96
4.5.5 Avaliação da atividade antioxidante	97
5 DISCUSSÃO	99
6 CONCLUSÕES	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

No mundo inteiro, as plantas são utilizadas com finalidades curativas e têm servido de matéria prima para a síntese de muitas drogas e são fontes importantes de novos agentes terapêuticos (ANDREO et al., 2006).

Segundo afirmam Giliani e Rahman (2005), a seleção de produtos naturais e a triagem de seus extratos por atividade farmacológica, em especial as plantas utilizadas na etnomedicina, podem levar à descoberta de novos medicamentos para o tratamento de muitos males.

A seleção de espécies vegetais na pesquisa de novos medicamentos pode consistir na abordagem randômica, tendo como fator determinante de escolha a disponibilidade local das plantas, abordagem quimiotaxonômica ou filogenética que ocorre quando as espécies são selecionadas em função da presença de determinadas classes químicas de substâncias em um gênero ou família, bem como na abordagem etnofarmacológica, cuja seleção da planta ocorre de acordo com o uso evidenciado por um determinado grupo étnico (MACIEL, et al., 2002).

O etnoconhecimento sobre o uso das plantas é vasto e, em muitos casos, torna-se o único recurso terapêutico disponível às populações rurais de países em desenvolvimento (PASA et al., 2005), tais como o Brasil.

As plantas medicinais são consideradas estratégicas para o fortalecimento da agricultura familiar, geração de emprego e renda, uso sustentável da biodiversidade, avanço tecnológico e para a melhoria da atenção à saúde da população brasileira (BRASIL, 2006).

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais, além de fornecer, também, modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas. As estruturas químicas de muitos dos constituintes de produtos naturais servem inclusive para orientar a química sintética de medicamentos e estima-se que cerca de 30% de todas as drogas

avaliadas atualmente como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (VEIGA-JÚNIOR; MELO, 2008).

Muitas plantas medicinais são utilizadas como recurso no tratamento de diversas doenças pela população de pequenas comunidades, inclusive para combater os problemas estomacais e inflamações (RODRIGUES; CARLINI, 2003).

As investigações etnofarmacológicas de plantas com potencialidade antioxidante costumam ser realizadas com plantas que exibem propriedades antiúlcera e anti-inflamatória, que têm em comum o estresse oxidativo gerado pela atividade aumentada de células fagocitárias nos locais das lesões (CARVALHO, 2004).

Desta forma, a atividade antioxidante gástrica de compostos vegetais tem atraído interesse, em virtude da forte evidência que o processo oxidativo está envolvido nos mecanismos de diversas enfermidades que acometem o estômago, incluindo gastrites, úlceras gástricas e câncer gástrico (SUZUKI et al., 2012).

1.2 Fisiopatologia da úlcera péptica

1.2.1 Etiologia e epidemiologia

A úlcera péptica é uma afecção caracterizada por inflamações severas, pontos hemorrágicos e lesões necrozantes (CALAM; BARON, 2001) que podem acometer a parede esofágica, gástrica ou intestinal, atingindo a camada mucosa, podendo penetrar nas camadas submucosa e muscular da parede do trato gastrintestinal (TARNAWSKI, 2005).

A úlcera péptica constitui-se de etiologia pluricausal, que segundo Tarnawski (2010), é desenvolvida quando fatores nocivos (ácido clorídrico - HCl, pepsina, toxinas do *Helicobacter pylori*, etc) “sobrecarregam” a mucosa intacta ou quando a integridade da mucosa está prejudicada.

Dentre os fatores nocivos endógenos, destacam-se o HCl, pepsina (UCHIDA et al., 2001), refluxo biliar, estresse, radicais livres (SZELENYI;

BRUNE, 1988) e o processo isquêmico (KONTUREK et al., 2006). Dentre os fatores agressivos exógenos destacam-se a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (USTÜN et al., 2006), uso de anti-inflamatórios não esteroidais (WARNER; MITCHELL, 2004; JAINU; DEVI, 2006), consumo de etanol (KONTUREK et al., 2003; SOBUE et al., 2003), uso de nicotina (SZELENYI; BRUNE, 1988), entre outros.

Os principais fatores que promovem a defesa da mucosa gástrica são o óxido nítrico (KONTUREK et al., 2006); peptídio relacionado ao gene da calcitonina – CGRP (BRZOZOWSKI, et al., 2012); compostos sulfidrilas (PAIVA et al., 2004); muco (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005); bicarbonato (WALLACE, 2008); gastrina (KOMORI et al., 2002); prostaglandinas PGE₂ e PGI₂ (WALLACE, 2008); assim como a manutenção do fluxo sanguíneo mucosal (ABDEL-SALAM et al., 2001); presença de enzimas antioxidantes na mucosa como a superóxido dismutase–SOD, catalase-CAT, glutathione peroxidase-GPx e glutathione redutase-GR (JAINU; DEVI, 2006; CHATTOPADHYAY et al., 2006); fatores de crescimento, incluindo o Fator de Crescimento Epidérmico-EGF e o Fator de Crescimento Transformador α - TGF α (BRZOZOWSKI, et al., 2012); peptídio grelina (SUZUKI et al., 2006) e, peptídeos trefoil e proteínas de choque térmico (TARNAWSKI et al., 2010). Recentemente, pesquisas realizadas por Brzozowski et al. (2012), apontam que um novo metabólito do peptídio angiotensina II também pode estar envolvido nos mecanismos de gastroproteção.

Helicobacter pylori é um bastonete gram negativo e microaerófilo que coloniza o estômago humano, sendo considerado o maior agente etiológico das desordens gastroduodenais (FUNATOGAWA et al., 2004). A infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* afeta 50% da população (FOCK; ANG, 2010; BACKERT; NAUMANN, 2010), sendo considerado o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico (VIALA et al., 2004; AYHIRO et al., 2005).

Estima-se que dentre as pessoas infectadas pelo *H. pylori*, 10 a 15% desenvolverão úlcera péptica durante a vida (WALSH; PETERSON, 1995) e isso pode estar relacionado ao fator de virulência da bactéria, bem como a resposta do hospedeiro frente à infecção (RUGGIERO, et al., 2006).

A citotoxina (Vac A) é considerada o maior fator de virulência do *H. pylori* causando vacuolização na célula infectada e dano tecidual (TOMBOLA et al., 2003; BACKERT; NAUMANN, 2010).

Na lesão da mucosa gastrintestinal a partir da infecção pelo *H. pylori* ocorre o aumento da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β), IL-8 e TNF α ; alterações na secreção ácida gástrica; alterações nos níveis de somatostatina e gastrina, além de alterações no muco e bicarbonato (KONTUREK et al., 2005).

Outros fatores bacterianos também estão envolvidos no desenvolvimento e gravidade das úlceras pépticas, dentre eles destacam-se a citotoxina associada ao gene de patogenicidade *island* (CagA), os lipopolissacarídeos, a flagelina e a urease (BACKERT; NAUMANN, 2010).

Os AINES, dentre eles ácido acetil salicílico, piroxicam e indometacina, estão entre os fármacos mais utilizados da atualidade como analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios (ANDREO et al., 2006; BOTTING, 2006). São utilizados como primeira linha na terapêutica das osteoartrites, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e outras síndromes inflamatórias (SIMMONS et al., 2004).

O uso crônico de AINES pode acarretar ulcerações gástricas como seu principal efeito colateral, em decorrência tanto de efeitos locais na mucosa gástrica, tais como a lise osmótica e morte de células epiteliais, redução na secreção de muco e bicarbonato e rompimento da barreira de fosfolípidos da superfície mucosa, como também os efeitos sistêmicos dos AINES, com destaque para a inibição não seletiva das ciclooxygenases–COX, acarretando assim depleção das prostaglandinas citoprotetoras da mucosa gástrica (WALACE, 2008).

O consumo excessivo de álcool acarreta ulcerogênese multifatorial que inclui o estresse oxidativo, danos no DNA e decréscimo no conteúdo total de glutathiona nas células da mucosa gástrica, produzindo necrose e hemorragia nos tecidos. Além disso, a atividade ulcerogênica do etanol é conduzida por sua capacidade em dissolver os constituintes do muco e aumentar a retrodifusão de íons H⁺ do lúmem, além de estimular a secreção de histamina, pepsina e íons H⁺ (TAKAYAMA et al., 2011). As bebidas alcoólicas como

cerveja e vinho tinto representam potentes secretagogos de ácido gástrico (AIHARA et al., 2003).

O estresse emocional também representa importante fator etiológico das úlceras gástricas e está diretamente envolvido com o estilo de vida do indivíduo (FILARETOVA et al., 2007). Os modelos experimentais de ulceração gástrica induzida pelo estresse apontam para o aumento da secreção ácida e redução na produção do muco gástrico mediados pela liberação de histamina (HIRUMA-LIMA et al., 2006). Além disso, o aumento da motilidade gástrica em decorrência da estimulação vagal, degranulação de mastócitos, decréscimo no fluxo sanguíneo mucosal e decréscimo na síntese de prostaglandinas também estão relacionados à ulcerogênese no modelo (RAO et al., 2004).

Nessa perspectiva, a úlcera péptica é considerada uma doença em franca expansão nos dias atuais em decorrência do estilo de vida moderno que inclui consumo excessivo de álcool e anti-inflamatórios não-esteroidais, além dos altos padrões de estresse nas sociedades modernas (ANDREO et al., 2006).

A úlcera péptica é uma das doenças do trato gastrointestinal mais prevalente do mundo, seguida de colite ulcerativa e doença de Crohn (SZABO et al., 2007). A sua prevalência é estimada em torno de 10% da população mundial (ZAPATA- COLINDRES, 2010).

A úlcera péptica atinge aproximadamente de 11 a 20% dos homens e 8 a 11% das mulheres (FERREIRA, 2005). A proporção entre os gêneros masculino e feminino é de 3:1 nas úlceras duodenais e de 2:1 nas úlceras gástricas (LIU; CRAWFORD, 2005).

A úlcera duodenal é geralmente mais prevalente nos países ocidentais, enquanto que as úlceras gástricas prevalecem nos países orientais (YUAN; PADOL; HUNT, 2006).

Em relação à faixa etária, estudos apontam para a prevalência de úlceras duodenais em pessoas mais jovens enquanto as gástricas são mais prevalentes em indivíduos mais velhos (GROENEM et al., 2009).

1.2.2 Secreção gástrica

A secreção de ácido gástrico ocorre nas células parietais gástricas das glândulas oxínticas, que produz em torno de 2 a 3 L de suco gástrico por dia (JAIN et al., 2007). Em sua composição, destacam-se os seguintes constituintes: muco fluido, eletrólitos, HCO_3^- , pepsinogênio, fator intrínseco, peptídeos e o HCl, seu principal constituinte (KONTUREK, KONTUREK; OCHMANSKI, 2004).

A secreção gástrica ocorre em três fases distintas: a **fase cefálica**, regulada parcialmente pelo hipotálamo e mediada pelo nervo vago, estimulada por fatores como a visão, cheiro e sabor dos alimentos; a **fase gástrica**, estimulada pelo contato do alimento no lúmen gástrico, assim como a distensão estomacal, que acarreta a ativação de receptores sensoriais do corpo e antro gástrico, com a ativação dos reflexos vagais e o consequente aumento da secreção gástrica; e a **fase intestinal**, estimulada pela distensão mecânica e pela presença de aminoácidos e peptídeos provenientes do quimo (GOO, AKIBA, KAUNITZ, 2010; FRY, 2009).

O controle da secreção ácida gástrica ocorre pela interação de três processos: (a) estimulação neural via nervo vago com liberação de acetilcolina; (b) estimulação endócrina pela gastrina; e (c) regulação parácrina, promovida pela liberação local de histamina (AIHARA, 2003; JAIN et al, 2007), sendo, portanto, estes secretagogos, os principais estimulantes da secreção ácida gástrica (SCHUBERT, 2009).

Na estimulação neural, a acetilcolina liberada pelo nervo vago estimula diretamente a secreção gástrica, por meio da interação com receptores muscarínicos (M_3), localizados na membrana basolateral da célula parietal, promovendo o aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma. A acetilcolina estimula indiretamente a liberação de histamina pelas células semelhantes às células enterocromafins (ECL) e da gastrina pelas células G (AIHARA, 2003; JAIN et al, 2007).

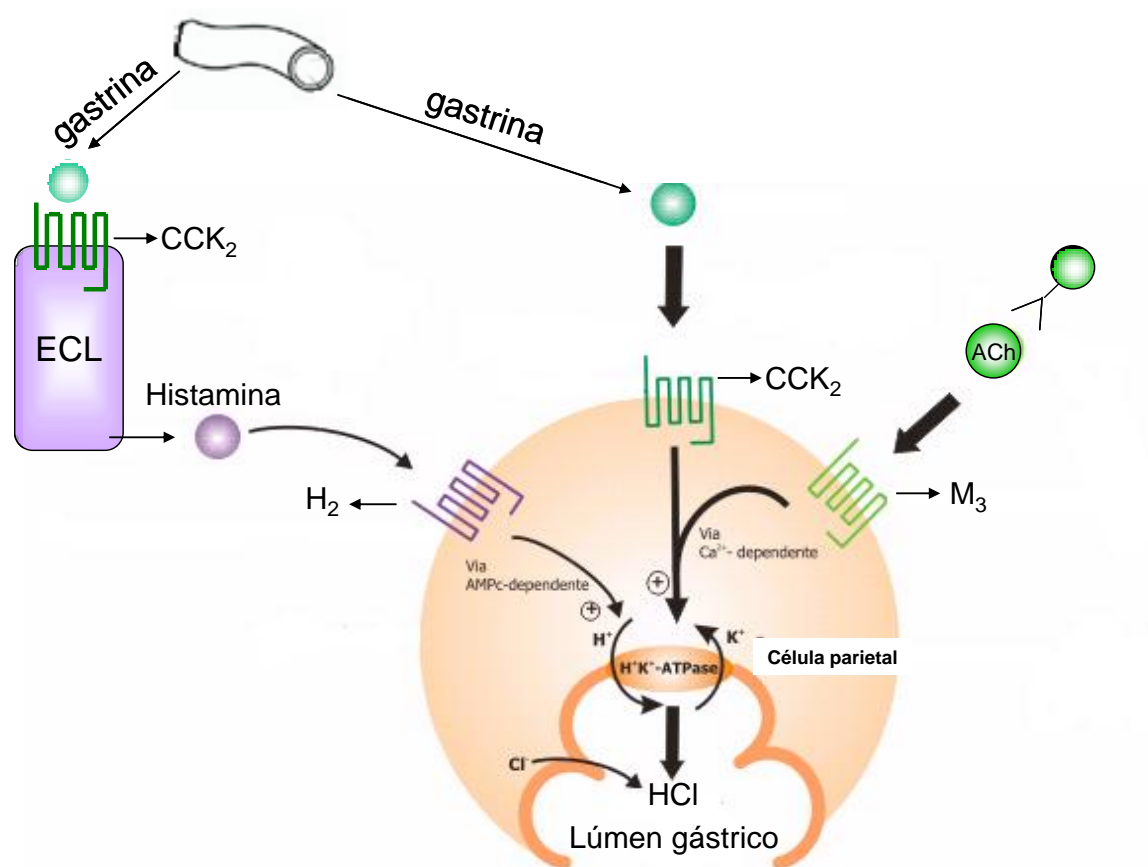
A gastrina liberada interage diretamente com os receptores de gastrina (CCK_2) na célula parietal gástrica e promove o aumento da concentração de Ca^{2+} e indiretamente causam liberação de histamina das células ECL (JAIN et al., 2007; SCHUBERT; PEURA, 2008). Dados da literatura também sugerem

que a secreção ácida estimulada pela gastrina pode ser também mediada via liberação de grelina (SCHUBERT et al., 2009).

A histamina liberada ativa os receptores H_2 na célula parietal promovendo elevação dos níveis intracelulares de 3',5' adenosina monofosfato cíclico - AMPc e ativação de proteínas cinases específicas, acarretando aumento da secreção ácida gástrica (SCHUBERT ; PEURA, 2008).

Os receptores para gastrina e acetilcolina pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e são acoplados à proteína Gq/11. A ligação destes agonistas ao respectivo receptor, ativa a fosfolipase C, e promove a liberação intracelular de 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 aumenta a concentração de Ca^{2+} citosólico por meio da liberação dos estoques intracelulares do retículo endoplasmático e o DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila e ativa os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Cav- tipo L) da membrana plasmática, promovendo a entrada do Ca^{2+} extracelular na célula parietal com consequente ativação da H^+ , K^+ ATPase (ZANNER et al., 2002; SOUCCAR et al., 2008; ZHAO et al., 2008). Estas informações podem ser observadas na representação esquemática da Figura 1.

Figura 1 Mecanismos de regulação da secreção ácida gástrica



Fonte: (adaptado de OLBE, CARLSSON; LINDBERG, 2003).

Em estado de repouso, a H⁺, K⁺ ATPase está localizada no interior da célula como elemento tubulovesicular. Nesta situação, a concentração intracelular de K⁺ é baixa, e a membrana vesicular impermeável ao K⁺. A estimulação da célula parietal, promove o aumento da concentração de AMPc e Ca²⁺, o que causa a fusão do elemento tubulovesicular com a membrana apical da célula e sua consequente ativação por exposição da enzima ao fluido luminal rico em K⁺ (GEIBEL, 2005).

A ativação da bomba de prótons pela via histaminérgica é mediada pela ativação da proteína Gs, com elevação do AMPc e estimulação da proteína cinase dependente do AMPc–PKA (SOUCCAR et al., 2008; ZHAO et al., 2008).

Dentre os substratos para a fosforilação da PKA, estão a H⁺, K⁺ ATPase (bomba de prótons) e a proteína ezerina, sendo que, essa última

funciona como uma proteína ancoradora de cinase (AKAP) e, uma vez fosforilada conecta o citoesqueleto com as proteínas da membrana plasmática, e promove a translocação da H^+ , K^+ ATPase (SZASZÁK et al., 2008). Assim, o H^+ é liberado nos canalículos da célula parietal em troca do K^+ . Os íons cloreto (Cl^-) são secretados através de canais de cloreto na membrana apical da célula parietal, de tal forma que para cada H^+ secretado, ocorre troca de Cl^-/HCO_3^- na membrana basolateral (GEIBEL, 2005).

A enzima H^+ , K^+ ATPase existe em dois estados conformacionais importantes (E1 e E2): No estado E1, o sítio de ligação aos íons tem alta afinidade para o H^+ e baixa afinidade ao K^+ . A forma E1 é convertida em E2 por meio da fosforilação (hidrólise do ATP). Já no estado E2, o sítio de ligação aos íons tem alta afinidade para o K^+ e baixa afinidade ao H^+ . A sua ativação ocorre mediante desfosforilação que, por sua vez, ocorre após a ligação do K^+ ao sítio localizado na subunidade α da enzima (GEIBEL, 2005).

Após a ocorrência de suficiente secreção ácida gástrica, um sistema de retroalimentação é ativado. O decréscimo no pH intragástrico estimula a liberação de somatostatina pelas células D, que ao interagir com receptores de somatostatina ($SSTR_2$), inibe a liberação de gastrina das células G, assim como inibe o efeito da gastrina nos receptores CCK_2 localizados nas células parietais e células ECL. Além disso, a acidificação no duodeno também causa a liberação do hormônio secretina, que age inibindo a secreção ácida gástrica (AIHARA et al., 2003; ZHAO et al., 2008).

1.2.3 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

O estômago é considerado um órgão que, embora submetido a condições fisiopatológicas inóspitas (meio de pH ácido $\sim 1,0$ e presença de enzimas proteolíticas ativas como a pepsina, presença de bile, entre outros), é capaz de manter-se íntegro e funcional. Isso se deve aos mecanismos de defesa da mucosa gástrica, frente principalmente, à secreção ácida necessária ao desempenho das suas funções fisiológicas (WALLACE, 2008; LAINE et al., 2008).

A integridade da mucosa gástrica é mantida por mecanismos de defesa que incluem fatores pré-epiteliais, epiteliais e sub-epiteliais, conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Principais fatores defensivos da mucosa gástrica

Níveis de defesa	Principais fatores defensivos
1-Defesa pré-epitelial	<ul style="list-style-type: none"> - Suco gástrico - ácido gástrico, Imunoglobulinas e lactoferrina - Muco - Bicarbonato - Fosfolipídios presentes na membrana apical do epitélio gástrico.
2- Defesa epitelial	<ul style="list-style-type: none"> - Renovação do epitélio celular-fatores de crescimento, PGE₂ e survivina.
3- Defesa pós-epitelial	<ul style="list-style-type: none"> - Manutenção do fluxo sanguíneo mucosal-PGs, grelina, CGRP, NO - Inflamação, elevação do fluxo sanguíneo, exsudação de plasma e recrutamento de leucócitos - PGs.

Fonte: Adaptado de Laine; Takeuchi; Tarnawski (2008). CGRP- peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, NO – óxido nítrico, PGs- prostaglandinas.

A primeira linha de defesa da mucosa (**defesa pré-epitelial**), é constituída pela camada de fosfolipídios da célula epitelial, que apresenta elevada hidrofobicidade, e por uma fina camada de muco gel (95% de mucina e 5% de água), que aprisiona os íons bicarbonato, mantém o pH em aproximadamente 7,0 e se deposita sobre a superfície das células epiteliais da mucosa gástrica, protegendo-a contra os efeitos deletérios, principalmente de agentes como o ácido clorídrico e a pepsina (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005; LAINE et al., 2008; WALLACE, 2008).

O ácido clorídrico também contribui com a primeira linha de defesa da mucosa gástrica em razão da sua ação antimicrobiana, evitando assim o crescimento de bactérias presentes na água e alimentos ingeridos (SCHUBERT; PEURA, 2008).

O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago e duodeno, em resposta a vários estímulos, dentre os quais, prostaglandinas e peptídeos intestinais (TAKEUCHI et al., 2001). Além disso, o muco atua impedindo a difusão de íons H^+ da luz para a membrana apical das células epiteliais (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005) e auxilia a remoção de radicais livres potencialmente lesivos à mucosa gástrica (HIRUMA-LIMA et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que a membrana apical das células gástricas previne a difusão de H^+ na mucosa (WALLACE, 2008) e isto se deve à renovação das células epiteliais gástricas.

A renovação celular da mucosa gástrica mantém a sua integridade estrutural. O epitélio é continuamente renovado por um processo bem coordenado e controlado da proliferação de células pró-genitoras, de tal forma que o epitélio gástrico se renova completamente em torno de 3 a 7 dias, sem que ocorra perda significativa na continuidade da “barreira” funcional denominada de **defesa epitelial** (LAINE, TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

A proliferação celular é controlada pelos fatores de crescimento, com especial destaque para o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), bem como pelo Fator Transformador de Crescimento α ($TGF\alpha$) e o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1), sendo que as prostaglandina E_2 (PGE_2) realizam transativação do receptor para o EGF (NGUYEN et al., 2007). Estudos apontam para a participação da proteína anti-apoptótica survivina no controle do processo de renovação celular do epitélio gástrico e estas são expressas nas células epiteliais e nas células progenitoras do epitélio gástrico (CHIOU et al., 2005).

A **defesa pós-epitelial (endotelial)** é constituída pelo contínuo fluxo sanguíneo mucosal, que promove o adequado suprimento de oxigênio e nutrientes para as células da mucosa gástrica, assim como a remoção de substâncias tóxicas (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Uma das mais importantes funções do fluxo sanguíneo mucosal consiste na remoção/diluição dos íons H^+ que podem se retro-difundir a partir do lúmen gástrico para as camadas mais internas da mucosa gástrica (WALLACE, 2008).

O fluxo sanguíneo mucosal, mediante a presença de fatores nocivos, é compensatoriamente incrementado por substâncias vasodilatadoras endógenas tais como o NO, PGE₂ e PGI₂, liberadas principalmente das células endoteliais dos microvasos sanguíneos que irrigam a mucosa gástrica. O estímulo para a liberação do óxido nítrico envolve a participação de nervos aferentes, localizados na mucosa gastrintestinal, que estimulados, liberam substância P e neurocinina A e a consequente liberação pelas vias eferentes do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina–CGRP (WALLACE, 2008).

1.2.3.1 Fatores moduladores da barreira gástrica

a) Prostaglandinas

As prostaglandinas são mediadores lipídicos originados por ação da enzima ciclooxigenase (COX) e prostaglandina endoperóxido sintase, a partir do ácido aracdônico (ácido 5,8,11,14 eicosanotetranóico), um componente da membrana fosfolipídica das células (ATAY et al., 2000; HATA; BREYER, 2004). Após ser liberado da membrana das células por ação da fosfolipase A₂, o ácido aracdônico sofre oxidação pelas ciclooxigenases do tipo constitutiva (COX₁) e induzível (COX₂) formando PGG₂, seguido da redução para o endoperóxido instável PGH₂.

A PGH₂ serve como substrato para as enzimas prostaglandinas sintases, responsáveis pela síntese de cinco principais prostaglandinas geradas *in vivo*, PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂, também denominada de prostaciclina. A PGE₂ é o maior produto das ciclooxigenases em diversos locais. No trato gastrintestinal, PGE₂ derivada da COX₁, desempenha um papel protetivo na manutenção da integridade da mucosa gástrica (HATA; BREYER, 2004).

As prostaglandinas, formadas pela ação da COX₁, estão envolvidas na citoproteção gástrica (regulação da acidez, fluxo sanguíneo e motilidade, além da produção de muco e bicarbonato), enquanto que as provenientes da COX₂ são responsáveis pelos processos inflamatórios, além da regulação da aderência de leucócitos nos vasos sanguíneos, angiogênese e reparo celular

por meio dos fatores de crescimento (KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2005).

As prostaglandinas estão associadas à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios. A PGE_2 tem se mostrado um potente inibidor da liberação de histamina, fator de necrose tumoral α ($TNF\alpha$), fator de agregação plaquetária (PAF) e interleucina 1 (IL_1) de macrófagos e da liberação de leucotrieno B_4 (LTB_4) e interleucina 8 (IL_8) de neutrófilos (WALLACE, 2008).

Segundo Mózsic (2010), os receptores para as PGE_2 , pertencem ao grupo dos receptores acoplados à proteína G (subtipos EP_1 - EP_4). A inibição da secreção ácida gástrica pela PGE_2 é mediada por receptores EP_3 . Outra prostaglandina, a prostaciclina (PGI_2), também promove diminuição da secreção ácida gástrica por meio de sua ação em receptores IP (SIMMONS et al., 2004). O aumento da secreção de muco e bicarbonato é mediado por receptores EP_3/EP_4 .

De acordo com Hata e Breyer (2004), a estimulação do receptor EP_1 acarreta elevação do Ca^{2+} intracelular, por estar acoplado à proteína $Gq/11$, que leva à ativação da fosfolipase C. Os receptores EP_2 e EP_4 são acoplados à proteína G_s , levando à estimulação da adenililciclase e por consequência ao aumento dos níveis do AMPc intracelular. O receptor EP_3 é acoplado à proteína G_i e acarreta inibição da adenililciclase e por consequência a diminuição dos níveis intracelulares de AMPc, embora tenham sido encontrados variantes individuais de receptores EP_3 que promovem elevação do AMPc intracelular.

A PGE_2 exerce potente efeito imunomodulador. Estudos apontam que o receptor EP_2 está relacionado com os efeitos pró-inflamatórios desta prostaglandina. Em contraste, muitos estudos *in vitro* sugerem que PGE_2 , ao interagir com receptores EP_4 , é capaz de suprimir as funções dos mastócitos, e assim, desencadear respostas anti-inflamatórias (AKAOGI et al., 2004).

A cura da úlcera péptica requer formação de tecido de granulação, angiogênese, re-epitelização, proliferação e remodelamento tecidual (HAMPTON; HALE, 2011). Estudos apontam para o preponderante papel das prostaglandinas na recomposição da mucosa e cura da úlcera, por atuar na

elevação do fluxo sanguíneo, exsudação de plasma e recrutamento de leucócitos (LAINE et al., 2008).

b) Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro intracelular presente em todos os vertebrados, modulando o fluxo sanguíneo, trombose e a atividade neural (PACHER, BECKMAN; LIAUDET, 2007). É um mediador endógeno gasoso, lipossolúvel, que acarreta efeitos semelhantes aos das prostaglandinas no TGI, atuando como um importante fator gastroprotetor (WALLACE, 2008).

O NO é sintetizado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintetase (NOS), que catalisam a oxidação de um nitrogênio guanidínico do L-arginina para formar óxido nítrico e citrulina. As enzimas são expressas em resposta a citocinas ou endotoxinas em macrófagos, células endoteliais vasculares, células musculares lisas, neutrófilos e miócitos cardíacos (PACHER, BECKMAN; LIAUDET, 2007). As NOS constitutivas (cNOS) presentes nas células endoteliais (NOS₃) e células do tecido nervoso (NOS₁) requerem cálcio e calmodulina como cofatores e a NOS induzível (iNOS-NOS₂), presente especialmente nos leucócitos polimorfonucleares, não requer esses co-fatores e produz continuamente grandes quantidades de óxido nítrico (PACHER, BECKMAN; LIAUDET, 2007; NAGESWARARAO et al., 2011).

O NO endógeno apresenta um papel dual na patogênese de lesões gastrintestinais, sendo protetor quando produzido por NOS constitutiva, relacionado com a manutenção da integridade da mucosa, tais como a inibição da secreção ácida gástrica e da vasodilatação (SATYANARAYANA, 2006).

Na mucosa gástrica normal, o NO é responsável por estimular a síntese de prostaglandinas, resultando em efeitos citoprotetores tais como aumento da produção de muco e bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo, inibição do acúmulo de neutrófilos inflamatórios por regular a expressão de moléculas de adesão no vaso e participação no processo de cicatrização das úlceras do TGI (TATEMICHII et al., 2003).

O NO é ulcerogênico quando produzido por iNOS, em função de provocar injúria microvascular (WEST et al., 2003). A expressão da enzima iNOS em macrófagos, é regulada pela transcrição do gene, ativado pelo fator

de transcrição NF- κ B. Diversos supressores de iNOS, agem inibindo a ativação deste fator nuclear, suprimindo a expressão desta isoforma da enzima (BALTRONS et al., 2003).

c) Grupamentos sulfidrilas (GSH)

Compostos sulfidrilas são substâncias que apresentam grupamentos tióis (SHs) e estão presentes no muco e em diversas enzimas do sistema antioxidante. Podem ser classificados em não-proteicos (glutathiona) e proteicos (enzimas antioxidantes) (JORDÃO-JÚNIOR et al., 1998).

A glutathiona é o mais abundante tiol celular de baixo peso molecular e possui papel central na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER; ALMEIDA, 2008). A glutathiona existe na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo que no estado reduzido, o grupo tiol da cisteína é hábil em doar e reduzir elétron diretamente para moléculas instáveis como as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (JOSEFEZAK et al., 2012).

Segundo Valko et al. (2007), dentre as principais ações antioxidantes da glutathiona, destacam-se: (a) a glutathiona é um cofator de diversas enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona transferase e outras; (b) participa do transporte de aminoácidos, através da membrana plasmática; (c) promove varredura do radical hidroxil e do oxigênio singlete diretamente, detoxificando o peróxido de hidrogênio, inibindo assim a peroxidação lipídica e indiretamente pela ação catalítica da glutathiona peroxidase; (d) é hábil em regenerar as vitaminas C e E para as suas formas ativas; (e) pode reduzir o radical tocoferol da vitamina E direta ou indiretamente, via redução do semidehidroascorbato para ascorbato, além de promover a quelação de metais de transição, evitando a formação do radical hidroxil a partir do H_2O_2 (JOSEFEZAK et al., 2012).

d) Sistema antioxidante

Radical livre pode ser definido como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais

atômicos ou moleculares (VALKO et al., 2007) que podem estar centrados em um átomo de oxigênio, nitrogênio, carbono ou enxofre.

Os radicais livres de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser formados nos tecidos a partir da redução do oxigênio molecular, levando à produção, entre outros, do ânion superóxido [$\bullet\text{O}_2^-$], radical hidroxila [$\bullet\text{OH}$], peroxil [$\bullet\text{RO}_2^-$] e alcóxil [$\bullet\text{RO}$]. Na mitocôndria, ocorre a maior produção celular de EROs. Em condições fisiológicas, ocorre produção de ânion superóxido nessa organela citoplasmática, como resultado do processo de fosforilação oxidativa objetivando a produção celular de ATP. Em outra organela citoplasmática—o peroxissomo—ocorre a produção do radical hidroxila (CIRCU; AW, 2010).

A geração do radical hidroxila ocorre pela quebra do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um produto da dismutação do ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), sendo necessária presença de um íon metálico de transição (geralmente Cu^{2+} ou Fe^{2+}) (VALKO et al., 2007; JOZEFEZAK et al., 2012).

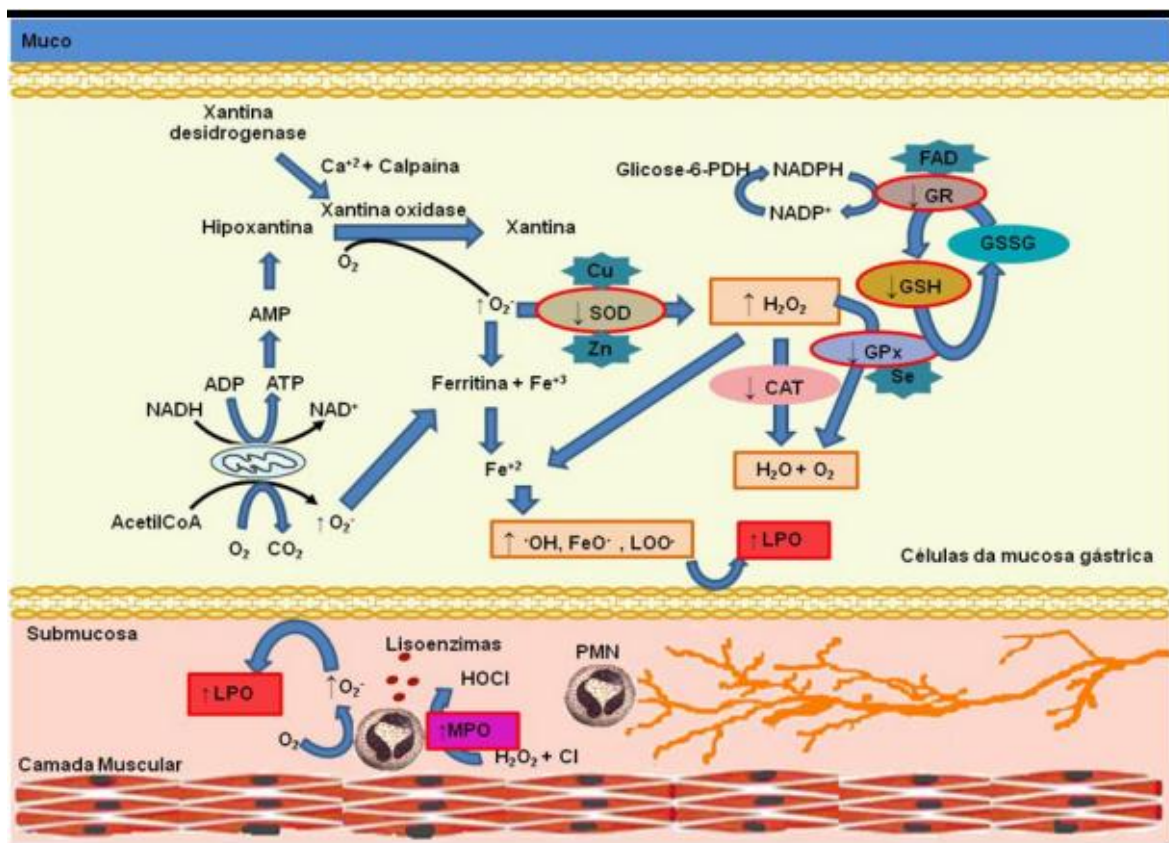
O organismo possui um sistema antioxidante que atua na detoxificação dos radicais livres. Pode ser classificado em enzimático e não enzimático. O sistema antioxidante enzimático é a primeira linha de defesa contra os radicais livres e é constituído pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR). O sistema não enzimático é representado pelos captadores de radicais livres de baixo peso molecular como substâncias contendo grupos tióis, como a glutathione reduzida (GSH), vitamina E, vitamina C e NADPH (SCANDALIOS, 2005; VALKO et al., 2007).

A SOD compõe um grupo de metaloproteínas e catalisa a dismutação de $\text{O}_2\bullet^-$ para O_2 e espécies menos reativas, como H_2O_2 . No homem, apresentam-se nas isoformas citosólica (Cu, Zn-SOD), mitocondrial (Mn-SOD) e extracelular (EC-SOD) (LANDIS, 2005). A isoforma Cu, Zn-SOD catalisa essa dismutação, enquanto a isoforma Mn-SOD é responsável pela segunda fase da dismutação do superóxido alterando o estado redox de Mn^{3+} a Mn^{2+} . A isoforma EC-SOD é uma glicoproteína de Zn/Cu com alta afinidade por glicosaminoglicanos, como heparina e sulfato de heparina, e regula os tecidos por coordenação de citocinas (MATES; PEREZ-GOMEZ; DE CASTRO, 1999).

Posteriormente, o H_2O_2 é degradado por GPx e CAT (VALKO et al., 2006). As glutations peroxidases apresentam-se nos tecidos nas isoformas independente (glutathione-S-transferase, GST) e dependente (GPx) de selênio e têm por função proteger os tecidos contra baixos níveis de estresse oxidativo. A GPx decompõe peróxidos inorgânicos (H_2O_2) e orgânicos (ROOH) em água ou álcool e O_2 , enquanto simultaneamente oxida a GSH. O processo de decomposição de H_2O_2 ocorre sob competição com CAT, localizada nos peroxissomos (MATES; PEREZ -GOMEZ; DE CASTRO, 1999).

A representação esquemática das vias de formação e detoxificação das EROs pode ser evidenciada na Figura 2.

Figura 2 Vias de formação de EROs, processo de peroxidação lipídica e papel da glutathione e outros antioxidantes



Fonte: Falcão (2011). Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoperoxidação (LPO), glutathione reduzida (GHS), glutathione redutase (Gr), glutathione oxidada (CSSG), Mieloperoxidase (MPO), polimorfonucleares (PMN), Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD^+).

Além das EROs, espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERNs) também podem ser formadas. As células endoteliais produzem óxido nítrico,

que em excesso, como ocorre durante a isquemia, torna-se potencialmente lesivo.

O NO gerado em grandes quantidades, em função do aumento da atividade de iNOS, interage com as EROs, especialmente por meio da reação com radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), e esta é catalisada pela SOD com formação do ânion peroxinitrito ($\bullet\text{ONOO}^-$), que em meio ácido, pode provocar a formação do óxido peroxinitroso ($\bullet\text{ONOOH}^+$), tratando-se de dois potentes oxidantes utilizados pelas células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos para a neutralização de patógenos (BALESTIERI, 2006; VALKO et al., 2007; PACHER, BECKMAN; LIAUDET, 2007).

O ânion peroxinitrito exibe reatividade química, podendo causar nitração de proteínas, quebra no DNA, e, ainda, provocar não somente efeito citotóxico, mas também mutagênico (NAPOLITANO et al., 2005; VALKO et al., 2007; PACHER, BECKMAN; LIAUDET, 2007).

A formação desses radicais no ambiente celular causa um estado de instabilidade, o que resulta em reatividade das moléculas (HENKEL, 2011). Situações patológicas como a inflamação, infecções virais, doenças autoimunes e desordens no trato gastrintestinal, podem levar a uma ruptura do equilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes orgânicos, em função da geração de quantidades de EROs e ERNs superiores à capacidade orgânica de neutralizá-los, caracterizando a situação de estresse oxidativo (REPETTO; LLESUY, 2002; ZÁDAK et al., 2009).

O estresse oxidativo tem como consequência o ataque oxidativo dos lipídios de membrana, proteínas estruturais e funcionais e os ácidos nucleicos, acarretando danos na mucosa gástrica (ARUOMA, 1995; McCORD, 2000; ANDREOLI, 2000; CIRCU; AW, 2010). Nesta situação, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, infiltração de neutrófilos com a consequente liberação de interleucinas, especialmente IL-1 β e TNF- α , o que acarreta inflamação aguda e excessiva produção de EROs (Figura 2) (PAN et al., 2008).

O estresse oxidativo está envolvido na patogênese da inflamação gástrica, ulcerogênese e carcinogênese gástrica na infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (SUZUKI et al., 2012).

Além dos mecanismos de proteção da mucosa gástrica já classicamente descritos, novos estudos têm revelado a participação dos hormônios reguladores do apetite na manutenção da integridade da mucosa gástrica, dentre os quais se destaca a grelina (KONTUREK et al., 2008).

e) Grelina

A grelina é um peptídeo constituído por 28 aminoácidos, que atua como ligante natural para o receptor secretagogo do hormônio do crescimento (SGHR), sendo produzido nas células *A-like* no estômago (SUZUKI et al., 2006), e, também, em pequenas quantidades pelas glândulas pituitárias, rins, placenta e hipotálamo (OSAWA, 2008). Seu papel fisiológico está relacionado com a liberação do hormônio do crescimento, regulação do apetite e da motilidade gástrica (SIBILIA et al., 2003). Segundo Osawa (2008), a grelina exibe uma forte gastroproteção devido às suas ações anti-inflamatórias, mediadas pelas prostaglandinas e de acordo com Suzuki et al. (2011), ocorre diminuição plasmática da grelina circulante durante a infecção pela bactéria *H. pylori*.

1.3 Terapia da úlcera péptica

O tratamento da úlcera péptica pode ser realizado por meio de dois grandes grupos: (a) drogas que modulam a secreção ácida, dentre elas, os antagonistas do receptor H_2 da histamina e inibidores da bomba de prótons; (b) agentes protetores da mucosa gástrica, dentre eles, sucralfato, bismuto e análogos das prostaglandinas (MEJIA; KRAFT, 2009) ou por antiácidos.

Os agentes antiácidos são empregados para neutralizar o HCl estomacal, sendo que os hidróxidos de alumínio e magnésio são os constituintes mais comuns nas preparações antiácidas, entretanto, o bicarbonato de sódio e o carbonato de cálcio também são utilizados (JAIN et al., 2007). Os antiácidos elevam o pH intragástrico imediatamente, mas a elevação é transitória, geralmente com duração em torno de 3 a 12 minutos (SCHUBERT, 2009).

Eventos adversos relacionados aos antiácidos dependem das doses utilizadas. Altas concentrações de cálcio, magnésio e alumínio das formulações podem ocasionar hipercalcemia, insuficiência renal, alcalose metabólica, diarreia, hipermagnesemia, encefalopatia e osteomalácia em pacientes com insuficiência renal. O uso de antiácidos também pode acarretar interações medicamentosas, em razão das mudanças no pH gástrico e urinário, alterando assim as taxas de absorção de algumas drogas (MEJIA; KRAFT, 2009).

Os antagonistas dos receptores H_2 da histamina e os inibidores da bomba de prótons demoram mais tempo para promover a elevação no pH (*delayed* em torno de 60 min), mas apresentam ação prolongada, em torno de 3-6 horas quando comparados aos agentes antiácidos (SCHUBERT, 2009).

Os antagonistas dos receptores H_2 da histamina (cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina) inibem completamente a interação da histamina com o receptor H_2 , desta forma, reduzem tanto o volume quanto a concentração do íon H^+ do suco gástrico (JAIN et al., 2007). São geralmente considerados seguros, com efeitos adversos que incluem tonturas, náuseas, *rashes* cutâneos, sonolência, confusão, impotência, ginecomastia, efeitos hematológicos e alterações na função imune. Raramente podem causar hepatites e anafilaxia (JAIN et al., 2007; MEJIA; KRAFT, 2009).

A enzima H^+ , K^+ ATPase foi identificada como a via comum para a produção do ácido estomacal, assim, a descoberta dos inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol, esomeprazol e dexlansoprazol) tem revolucionado o tratamento das doenças do trato gastrointestinal (MEJIA; KRAFT, 2009). Atuam inibindo covalentemente a enzima H^+ , K^+ ATPase, por meio da formação de um dissulfeto no aminoácido cisteína 813, que estabiliza a enzima na conformação (inativa) E_2 (JAIN et al., 2007).

Esses medicamentos apresentam efeitos gastroprotetores não apenas por inibirem a secreção ácida gástrica, mas também por promoverem aumento na secreção de bicarbonato, aumento na expressão do fator de crescimento endotelial vascular e da proliferação celular (SCHUBERT, 2011).

Também são considerados seguros nos ensaios clínicos e estudos de farmacovigilância (pós-comercialização) com alguns efeitos indesejáveis, dentre eles náuseas, diarreias e infecções entéricas associadas à redução do

pH intragástrico (JAIN et al., 2007). Entretanto, estudos que avaliam os efeitos, após o uso prolongado têm relacionado o uso desta classe de substâncias com hipergastrinemia, sendo a gastrina um hormônio com propriedades proliferativas com potencial para o desenvolvimento de câncer gástrico (MEJIA; KRAFT, 2009).

A propriedade citoprotetora é exercida por agentes terapêuticos que protegem a mucosa sem influenciar a secreção ou a neutralização da acidez gástrica (SAIRAM et al., 2003). Na terapia da úlcera gástrica, são empregados pró-secretores de muco, bicarbonato e fatores surfactantes (prostaglandinas, sais de bismuto e sucralfato), que pertencem ao grupo de medicamentos que visam manter a integridade da mucosa gástrica (AIHARA et al., 2003).

A terapia recomendada pelo *American College of Gastroenterology* para erradicar a bactéria *Helicobacter pylori*, segundo Luther et al. (2010), baseia-se na adoção de dois esquemas terapêuticos: (a) terapia quádrupla, constituída por Inibidor de bomba de prótons, bismuto, tetraciclina e metronidazol e (b) terapia tripla, constituída por Inibidor de bomba de prótons, claritromicina e amoxicilina. Esses autores, após a realização de uma revisão sistemática e meta análise de diversos estudos abordando o tema, concluíram que ambos os esquemas terapêuticos são equivalentes quanto às taxas de erradicação do *H. pylori*, complicações nos pacientes e efeitos adversos.

1.4 Plantas medicinais com atividade antiulcerogênica

No decurso da evolução e nos rápidos ajustamentos sazonais, as plantas realizam a síntese de um formidável arsenal químico, por meio do metabolismo secundário, com as mais variadas finalidades fisiológicas e de interações com o meio ambiente (QUIDEAU et al., 2011). De acordo com Sumbul et al., (2011), os polifenóis desempenham importante papel na prevenção das úlceras pépticas em virtude de suas propriedades antissecretórias, citoprotetoras e antioxidantes.

Dentre os metabólitos de plantas considerados como possuidores de atividade antiúlcera, destacam-se os flavonoides (quercetina, narigina, silimarina) antocianosídeos, soforadina, taninos, saponinas, gomas e mucilagens (BORELLI; IZZO, 2000).

Estudos também apontam para importantes propriedades gastroprotetoras exibidas por plantas medicinais ricas em terpenos como, por exemplo, *Egletes viscosa* (GUEDES et al., 2008), *Copaifera officinalis* (ARROYO et al., 2009) e *Maytenus ilicifolia* (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2009). Essa última espécie foi incluída na lista dos fitoterápicos ofertados pelo SUS da Relação nacional de Medicamentos essenciais–RENAME (DOU, 2012).

Gomes et al., (2009) atribuíram os efeitos gastroprotetores de *Vochysia tucanorum* à presença de triterpenoides pentacíclicos (ácido betulínico, eritrodiol, ácido ursólico e ácido oleanólico) encontrados na fração butanólica, obtida do extrato metanólico da planta.

Podemos ainda citar as espécies *Praxedes clematídea* (FALCÃO, 2011), *Herissantia crispa* (LIMA, 2008), *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008), *Maytenus obtusifolia* (MOTA, 2009), *Combretum duarteanum* (LIMA, 2011) e *Xylopia langsdorffiana* (MONTENEGRO, 2011) estudadas por nosso grupo de pesquisa, com atividade gastroprotetora.

Estudos clínicos têm confirmado a gastroproteção conferida pela utilização de plantas medicinais. Segundo Mofleh, (2010), após a realização de diversos ensaios clínicos, observou-se que os agentes que apresentam atividades antioxidantes são os que desempenham o papel mais importante no tratamento das úlceras pépticas.

Assim, a literatura científica aponta que os efeitos gastroprotetores e antiulcerogênicos mediados por produtos vegetais consistem, principalmente, de propriedades antissecretórias de HCl (LAKSHMI et al., 2010); pró-secretórios de muco (VASCONCELOS et al., 2008), bicarbonato, prostaglandinas (HIRUMA-LIMA et al., 2006); anti-inflamatórios (VASCONCELOS et al., 2010), antioxidantes, tais como elevação nos níveis de compostos sulfidrilas, varredura de radicais livres, diminuição da peroxidação lipídica (ANDREO et al., 2006; FARIA et al., 2012) e atividade anti *Helicobacter pylori* (USTÜN et al., 2006), dentre outros.

1.5 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae é constituída por aproximadamente 295 gêneros e 7.775 espécies. É um grupo de distribuição cosmopolita, ocorrendo

principalmente em savanas abertas e regiões montanhosas de clima tropical e subtropical. Estima-se que existam pelo menos 22 gêneros e 402 espécies ocorrendo no Brasil (BASÍLIO et al., 2006), conforme o mapa representado na Figura 3.

Figura 3 Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo (representada em vermelho)



(Adaptado de: [HTTP://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html](http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html) Acesso em 05 de jul. de 2012).

Tratam-se de plantas com grande diversidade na forma vegetativa, desde anual efêmera (ex. *Hyptis nudicaulis* Benth), até árvores pequenas (ex. *Hyptis arborea*), porém com predominância de subarbustos ou ervas perenes (MAIA et al., 2008).

As plantas da família Lamiaceae vêm sendo estudadas com a intenção de validar o seu uso popular no tratamento de úlceras pépticas. As propriedades farmacológicas destas plantas têm sido atribuídas, parcialmente aos seus constituintes voláteis—os óleos essenciais (TAKAYAMA et al., 2011). Assim, estudos foram conduzidos com *Plectranthus grandis* (RODRIGUES et al., 2010), *Salvia officinalis* (MAYER et al., 2009), e diversas espécies do gênero *Hyptis*, dentre elas, *Hyptis spicigera* (TAKAYAMA et al., 2011), *Hyptis martiusii* (CALDAS et al., 2011) e *Hyptis fasciculata* (ISOBE et al., 2006).

1.6 *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae)

O gênero *Hyptis* Jacq. é constituído por mais de 400 espécies encontradas nas regiões tropicais do mundo, principalmente na África e América (CONTI et al., 2011). É considerado de grande importância econômica devido ao conteúdo de óleos essenciais aromáticos presentes nas plantas desse gênero (CALDAS et al., 2011).

Diversas espécies deste gênero possuem propriedades medicinais e são reportadas para o tratamento de infecções, cólicas, e dor, assim como para o tratamento de infecções de pele (AZEVEDO et al., 2002). Óleos essenciais de diferentes espécies de *Hyptis* são utilizados na medicina popular e algumas propriedades farmacológicas desses óleos têm sido descritas na literatura científica como as suas propriedades antiulcerogênica, inseticida, antibacteriana, antifúngica e antinociceptiva (CALDAS et al., 2011).

Segundo McNeil et al., (2011), os óleos voláteis obtidos de várias partes de plantas desse gênero têm como constituintes majoritários, principalmente mono e sesquiterpenos, como exemplo o 1,8 cineol (*H. fruticosa*, *H. goyazensis*, *H. martiusii* e *H. suaveolens*); beta-cariofileno (*H. marruboides*, *H. pectinata*, *H. spicigera* e *H. suaveolens*); eugenol (*H. recurvata* e *H. suaveolens*); gama-cadineno (*H. glomerata* e *H. ovalifolia*); p-cimeno (*H. mutabilis* e *H. pectinata*); alfa-pineno (*H. crenata* e *H. emoryi*).

1.7 *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

1.7.1 Características gerais

A espécie *Hyptis suaveolens* L. Poit, pertence à família Lamiaceae (Figura 4). É encontrada no nordeste da Índia, Filipinas, América tropical e África (GAVANI; PAARAKH, 2008; CHUKWUJEKWU et al., 2005; EDEOGA et al., 2006). No nordeste do Brasil é conhecida como “alfazema de caboclo” e “alfavaca brava” (BASÍLIO et al., 2006) e “erva canudo”, “cheirosa”, “alfavacão”, “mentrasto-do-grande”, “pataquera”, “betônia-branca”, “chá-de-frança” (MAIA et al., 2008) e particularmente na região Centro Oeste como “tapera-velha” (JESUS et al., 2009). É uma planta que se apresenta na forma de subarbustos

que podem atingir até 2 m de altura e apresenta um cheiro característico de menta quando esmagada. É considerada invasora de lavouras e pastagens crescendo naturalmente em ambientes abertos e secos, preferencialmente em lugares onde os solos foram profundamente perturbados (WULFF, 1973).

Figura 4 Fotos da planta *Hyptis suaveolens* L. Poit.



Local de coleta: Distrito de Pirizal MT/ 2009. (Fotos: Dra. Mônica Aragona).

É utilizada na medicina tradicional na forma de decocto ou infuso para o tratamento de diversas doenças, sendo considerada estimulante, carminativa, sudorífica, antisséptica, anti-inflamatória e repelente de insetos (MANDAL et al., 2007) e, ainda, no tratamento dos distúrbios digestórios (BASÍLIO et al., 2006).

1.7.2 Fitoquímica e farmacologia

Estudos fitoquímicos demonstraram que *Hyptis suaveolens* é rica em óleos essenciais que, segundo Martins et al. (2006) são constituídos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos. Manchand (1974) isolou dois diterpenos (suaveolol e ácido suaveólico) a partir das folhas de *Hyptis*

suaveolens. Misra (1981) utilizando extratos obtidos a partir das partes aéreas da planta identificou os esteróides β -sitosterol e ácido oleanólico.

O óleo essencial desta espécie já foi caracterizado quimicamente em vários estudos, tendo sido verificada elevada variabilidade na composição e no teor dos constituintes majoritários (MARTINS et al., 2006). Azevedo et al. (2001), tendo coletado o óleo essencial de *Hyptis suaveolens* em diversas localidades do cerrado brasileiro, constataram a presença de 55 compostos, dentre eles o 1,8- cineol, sabineno, espatulenol, cariofileno, limoneno, biciclogermacreno, bourboneno e α bulseneno. Martins et al., (2006). Além disso, verificaram a interferência de fatores ambientais na composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* cultivada em Alfenas-SP, assim como Conti et al. (2011), constaram significativas diferenças na composição do óleo essencial de plantas de *Hyptis suaveolens*, quando comparado com estudos de Peerzada (1997), tanto na quantidade de constituintes químicos, quanto no teor das substâncias identificadas.

Edeoga et al. (2006) analisaram o extrato aquoso obtido das folhas desta planta e observaram a presença de altos teores de alcaloides e flavonoides, assim como a presença de taninos.

Foram realizados ensaios farmacológicos que demonstraram a atividade antinociceptiva (SANTOS et al., 2007), antioxidante (GAVANI ; PAARAKH, 2008, RAJPUT et al., 2010); cicatrizante do extrato etanólico (SHIRWAIKAR et al., 2003), antiinflamatória dos diterpenos suaveolol e metil suaveolato (GRASSI et al., 2006), antibacteriana do óleo essencial (NANTITANON et. al., 2007), anti-hiperglicêmico do extrato hidroalcoólico (MISHRA et al., 2011), antifúngica do óleo essencial (NANTITANON et. al., 2007, TRIPATHI et al., 2009), antiúlcera duodenal do extrato etanólico (PRABHAT et al., 2009) e atividade gastroprotetora do diterpeno suaveolol (VERA-ARZAVE et al., 2012).

Dentre os estudos toxicológicos que investigaram a toxicidade aguda do extrato aquoso de *H. suaveolens*, citam-se os ensaios pré-clínicos realizados por Santos et al., (2007) e toxicidade subcrônica conduzidos por Attawish et al., (2005). Nesses ensaios, os autores não verificaram sinais que pudessem atribuir propriedades tóxicas para esta espécie.

Assim, com respaldo na literatura científica da sua segurança e eficácia e a após o levantamento etnobotânico realizado na comunidade de

Pirizal, município de Nossa Senhora do Livramento–pantanal mato-grossense (JESUS et al., 2009), cujo objetivo era conhecer as espécies vegetais utilizadas simultaneamente como antiúlcera e anti-inflamatórias, destacou-se o uso de *Hyptis suaveolens*. Foi então realizada triagem farmacológica em modelos experimentais de úlceras gástricas e inflamação. O extrato bruto metanólico foi testado em animais e reduziu significativamente as lesões no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol, além de apresentar efeito antiedematogênico no modelo de edema de pata induzido por dextrana (JESUS, 2007), sendo assim, esta espécie foi selecionada para este estudo.

A pesquisa de plantas medicinais nativas, que fazem parte do arsenal utilizado por populações tradicionais, tem encontrado respaldo nas políticas de saúde brasileira. Diversas espécies foram incluídas na lista de fitoterápicos do SUS e as plantas medicinais hoje representam insumos estratégicos para a melhoria da qualidade na assistência farmacêutica à população brasileira. Dessa forma, o presente trabalho visa gerar conhecimentos nesta área, buscando contribuir com o desenvolvimento do Sistema de Saúde no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a atividade antiúlcero gênica do extrato etanólico bruto (EEtOH-*Hs*) e das fases (FaHex-*Hs*, FaDCM-*Hs* e FaAE-*Hs*), obtidos das partes aéreas de *Hyptis suaveolens*, em modelos animais que mimetizam a úlcera gástrica no homem.

2.2 Específicos

- Realizar triagem farmacológica comportamental e investigar a Dose Letal 50% do EEtOH-*Hs* e da FaHex-*Hs*;
- Avaliar o efeito gastroprotetor das fases hexânica (FaHex-*Hs*), diclorometânica (FaDCM-*Hs*) e acetato de etila (FaAE-*Hs*) frente ao agente lesivo HCl/etanol;
- Investigar o efeito do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* em modelos clássicos de indução de úlceras gástricas (etanol, AINES, estresse, contenção do suco gástrico e isquemia-reperfusão);
- Examinar o efeito do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* sobre os parâmetros da secreção ácida gástrica;
- Investigar a atividade cicatrizante e toxicidade do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* sobre o modelo de indução de úlceras por ácido acético;
- Verificar o efeito do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* frente ao crescimento da bactéria *Helicobacter pylori* por meio do método de difusão em disco;
- Elucidar possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material botânico

A espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit foi coletada na fazenda Nossa Senhora Aparecida, localizada a 24 km do distrito de Capão Grande (estrada do Capão), Várzea Grande-MT. Esta espécie (Figura 5) foi identificada botanicamente pela equipe do Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), registrada sob o número 36.376 e enviada ao Instituto Plantarum para estudos da flora em Nova Odessa-SP para ratificação taxonômica por Msc.Harri Lorenzi. Um exemplar está depositado no Herbário Lauro Peres Xavier da Universidade Federal da Paraíba, sob o número de protocolo JPB 45.154.

Figura 5 Fotos da planta *Hyptis suaveolens* e sua respectiva exsicata



Exsicata Nº 36.376

Local de coleta: Distrito de Pirizal – MT (Fotos: MSc Joaquim Corsino da Silva Lima)/2009.

3.1.2 Local da pesquisa

Os experimentos para a identificação da atividade gastroprotetora e dos mecanismos de ação do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foram realizados nos Laboratórios de Farmacologia do Trato Gastrointestinal, Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX), Laboratório de Imunologia da UFPB e nos Laboratórios de Farmacologia e de Bioquímica da UFMT.

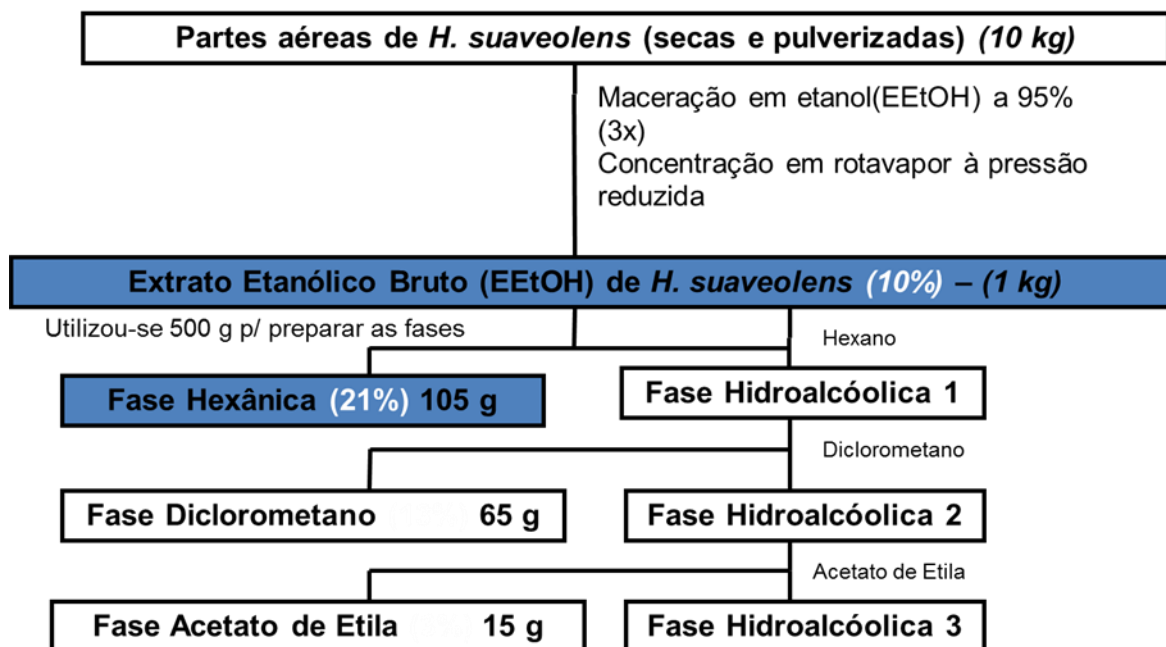
3.1.3 Procedimentos fitoquímicos

3.1.3.1 Obtenção do extrato etanólico (EEtOH-*Hs*) e fases (FaHex-*Hs*, FaDCM-*Hs* e FaAE-*Hs*)

As partes aéreas de *Hyptis suaveolens* foram secas, pulverizadas, maceradas em etanol por sete dias para a extração exaustiva pelo solvente. Em seguida, foram submetidas à rotaevaporação (40°C) para eliminar o excesso de etanol. Uma parte do extrato bruto etanólico obtido foi ressuspensão em etanol e submetido a um método sistemático de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescentes (FILHO; YUNES, 1998), com hexano, diclorometano e acetato de etila, para obtenção da FaHex-*Hs*, FaDCM-*Hs* e FaAE-*Hs*.

O rendimento do EEtOH-*Hs* foi de 10% a partir do material seco e pulverizado e o rendimento das fases variou de 3 a 21%, sendo o maior rendimento para a fase hexânica. Foi obtido 1 kg de extrato etanólico bruto a partir de 10 kg da planta seca. A quantidade referente a 500 g foi utilizada na preparação das fases, obtendo-se em torno de 105 g de FaHex-*Hs*, 65 g da FaDCM-*Hs* e 15 g da FaAE-*Hs*, conforme representado na Figura 6.

Figura 6 Marcha fitoquímica para obtenção do EEtOH e das fases de *Hyptis suaveolens*



3.1.3.2 Investigação fitoquímica preliminar

A análise qualitativa do EEtOH-*HS* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Matos (1988), sob a supervisão do prof. MSc. Iberê Ferreira da Silva Júnior (UFMT) e revelou a presença de terpenos, compostos fenólicos, taninos, alcaloides, cumarinas e saponinas.

3.1.4 Animais

Para realização desse trabalho foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), Swiss, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 25-35 g, variando não mais que 5 g em cada ensaio e ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, adultos, pesando entre 180-250 g, variando não mais que 10 g em cada ensaio, provenientes do Biotério “Prof. Thomas George” do Centro de biotecnologia (CBIotec/UFPB).

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura variando entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão Purina® e água *ad libitum*. Os animais submetidos a experimentos que necessitaram de privação de ração por (12-36 horas) foram mantidos em gaiolas especiais, contendo telas de arame para evitar a coprofagia, com livre acesso a água até 1 hora antes dos testes.

Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguindo os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (ZIMMERNAM, 1983) e quando necessário de acordo com o protocolo experimental, foram anestesiados com cloridrato de cetamina 5% (anestésico) e cloridrato de xilasina 2% (relaxante muscular), no intuito de diminuir a dor e o sofrimento.

Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal da Paraíba e aprovados sob o número de protocolo CEPA 0301/10.

3.1.5 Drogas utilizadas

As substâncias utilizadas nos ensaios farmacológicos foram, preferencialmente de pureza analítica, dentre as quais: acetato de sódio (MERCK, Germany), ácido acético glacial (SYNTH), ácido clorídrico (MERCK, Germany), alcian blue (SIGMA Chemical Co, USA), álcool etílico (MERCK, Germany), bicarbonato de sódio (MERCK, Germany), carbenoxolona (SIGMA Chemical Co, USA), cetamina (KÖNIG), cimetidina (SIGMA Chemical Co, USA), cloreto de magnésio (MERCK, Germany), cloreto de sódio (MERCK, Germany), éter etílico (MERCK, Germany), hidróxido de sódio (MERCK, Germany), indometacina (SIGMA Chemical Co, USA), lansoprazol (SIGMA Chemical Co, USA), L- Nitro Arginina Metil Ester–L-NAME (SIGMA Chemical Co, USA), N-etil maleimida–NEM (SIGMA Chemical Co, USA), piroxicam (SANDOZ), sacarose (PRO ANALISI), tampão Tris (SIGMA Chemical Co, USA), Tween 80 (MERCK, Germany),

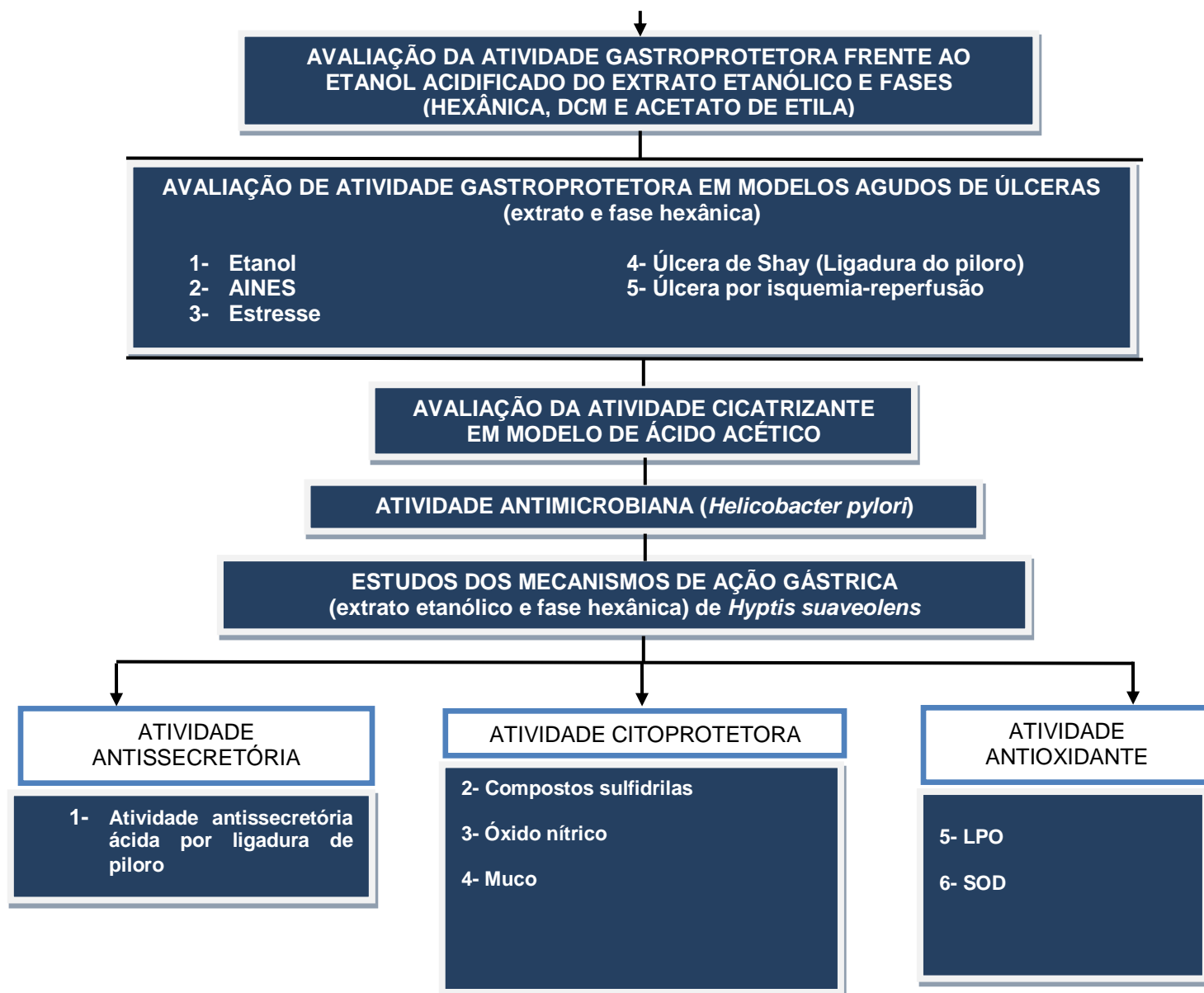
tetracetato de etilenodiamina dissódico–EDTA (SIGMA Chemical Co, USA), xilazina (VALLÉ).

O EEtOH-*Hs* e as fases (FaHex-*Hs*, FaDCM-*Hs*) foram solubilizados em solução Tween 80 a 8%. A FaAE-*Hs* e demais substâncias foram solubilizadas em solução salina 0,9%.

3.2 Métodos

Os métodos utilizados neste estudo foram realizados conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7 Fluxograma do protocolo experimental



3.2.1 Ensaio toxicológico de *Hyptis suaveolens*

3.2.1.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

O EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* foram submetidos ao ensaio toxicológico com o objetivo de avaliar as alterações comportamentais frente ao SNC, SNA, presença ou não de morte, de acordo com o modelo descrito por Almeida et al., (1999).

Para isso foram utilizados camundongos Swiss albinos, ambos os sexos, pesando entre 25-35 g, divididos em grupo veículo (6 machos e 6 fêmeas)–Tween 80 a 8% e grupo tratado com EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (6 machos e 6 fêmeas), (v.o), na dose de 2.000 mg/kg (OECD, 2001).

Os animais foram observados durante 4 horas após a administração. Nos primeiros 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas e comparado ao controle negativo. Esses mesmos animais foram diariamente observados durante 14 dias para verificar a ocorrência de mortes, e este parâmetro utilizado para determinar a DL₅₀. Outros parâmetros como peso dos animais, consumo de ração e água também foram avaliados diariamente.

Ao final dos 14 dias os animais foram eutanasiados e seus órgãos (fígado, coração, baço, rins e pulmão) foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente.

3.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora de *Hyptis suaveolens* em modelos de indução aguda de úlcera

3.2.2.1 Indução de úlcera gástrica por etanol acidificado

A triagem gastroprotetora do EEtOH-*Hs* e fases (FaHex-*Hs*, FaDCM-*Hs* e FaAE-*Hs*) foi realizada por meio do modelo de indução de úlceras agudas, utilizando-se o agente lesivo HCl/etanol, segundo o modelo, com modificações, proposto por Mizui; Doteuchi (1983). Camundongos Swiss albinos, machos, pesando entre 25-35 g, foram submetidos a um período de jejum de 24 horas, com

livre acesso a água até 1 hora antes do experimento. Em seguida, foram distribuídos em grupos de 7 animais e tratados (v.o) com veículo (Tween 80 a 8%-10 mL/kg), EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs*, Fa-DCM-*Hs* e FaAE-*Hs* (62,5; 125; 250 ou 500 mg/kg) ou lansoprazol (30 mg/kg). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam por via oral 0,2 mL de uma solução de etanol 60% (v/v) com 0,3 M de HCl e depois de 1 hora, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em salina e prensados entre duas placas de vidro para melhor visualização. A área ulcerada foi determinada por meio do índice de lesão ulcerativo (ILU), conforme o número e a severidade da injúria (SZELENY; THIEMER, 1978).

Determinação do Índice de lesões ulcerativas (ILU)

As lesões foram avaliadas por meio de visualização em Lupa OLYMPUS optical TL3- SZ40, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 Fotos da Lupa Olympus optical e estômago ulcerado



As lesões ulcerativas foram avaliadas de acordo com a quantidade e a severidade das lesões em:

- ✓ nível 1: pontos hemorrágicos e ulcerações até 1 mm;

- ✓ nível 2: ulcerações com 2 mm;
- ✓ nível 3: ulcerações profundas com 3 mm.

Para os modelos de indução aguda de úlcera gástrica, foi realizada uma somatória das lesões que corresponde ao índice ILU, conforme a equação abaixo:

$$ILU = \sum (\text{lesões nível 1} \times 1) + (\text{lesões nível 2} \times 2) + (\text{lesões nível 3} \times 3)$$

Para calcular a porcentagem de inibição das lesões gástricas utilizou-se a seguinte equação:

$$PI = [A-B/A] \times 100$$

A= média do ILU controle negativo.

B= média do ILU no grupo teste e grupo controle positivo.

3.2.2.2 Indução de úlcera gástrica por etanol

A atividade gastroprotetora do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foi avaliada utilizando como agente lesivo o etanol, conforme o modelo, com modificações, proposto por Morimoto et al. (1991). Ratos Wistar, machos (180-220g), em jejum de 24h com água *ad libitum*, distribuídos em grupos de 7 animais, foram tratados oralmente com veículo (Tween 80 a 8%-10 mL/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (62,5; 125; 250 e 500 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg). Após 1 h dos tratamentos, os animais receberam por v.o, etanol absoluto (4 mL/kg). Uma hora depois, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura, lavados em salina 0,9% e determinado o índice de lesão ulcerativo (ILU).

3.2.2.3 Indução de úlcera gástrica por anti-inflamatórios não esteroidais

O efeito gastroprotetor do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foi avaliado utilizando-se como agente lesivo o piroxicam, conforme o modelo, com modificações, descrito por Puscas et al. (1997). Camundongos Swiss albinos, machos, pesando entre 25-

35 g, em jejum de 24 horas com água *ad libitum*, distribuídos em grupos de 7 animais, foram tratados oralmente com veículo (Tween 80 a 8%-10 mL/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (62,5; 125; 250 e 500 mg/kg) ou cimetidina (100 mg/kg). Trinta minutos após os tratamentos, todos os animais receberam piroxicam (30 mg/kg, s.c.). Após 4 horas dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e determinado o índice de lesão ulcerativo (ILU).

3.2.2.4 Indução de úlcera gástrica por estresse por imobilização e frio

O efeito gastroprotetor do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foi avaliado utilizando-se do método indução de estresse por imobilização e frio, conforme modelo, com modificações, descrito por Levine et al. (1971). Os camundongos (7 animais por grupo) foram submetidos a um jejum inicial de 24 horas, posteriormente, pré-tratados por via oral com veículo (Tween 80 a 8%-10 mL/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) ou cimetidina (100 mg/kg) e trinta minutos após a administração dos diferentes tratamentos, os animais foram imobilizados pelas patas dianteiras e traseiras, colocados em contêntores de PVC (9 cm de comprimento x 3,5 cm de diâmetro) e submetidos a uma temperatura de 4° C por um período de 3 horas para indução das úlceras. Ao final desse período, os animais foram eutanasiados e na sequência, foi determinado o Índice de Lesão Ulcerativo (ILU).

3.2.2.5 Indução de úlcera gástrica por ligadura do piloro

Para determinar a atividade gastroprotetora do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foi utilizado o ensaio de indução de lesões por ligadura do piloro, conforme método proposto por Shay et al. (1945). Ratos Wistar, machos, 170-200 g, em jejum de 36 horas com água *ad libitum*, distribuídos em grupos de 7 animais, foram anestesiados com cetamina e xilazina e laparatomizados na região epigástrica e realizada a ligação do piloro. Veículo (Tween 80 a 8%-10 mL/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) ou cimetidina (100 mg/kg) foram administrados por via intraduodenal imediatamente, após a ligação do piloro em um volume de 0,5 mL/100g. Transcorridas 4 horas, os ratos foram eutanasiados, a cárdia foi pinçada

para evitar perda do material secretado e os estômagos retirados, lavados com salina 0,9% e seco em papel de filtro e posteriormente determinado o ILU.

3.2.2.6 Úlcera por isquemia-reperfusão

O experimento foi desenvolvido seguindo-se a metodologia, com modificações, descrita por Ueda (1989). Após jejum de 24 horas, ratos Wistar machos (n=7) foram tratados oralmente com 10 mL/kg de Tween 80 8%, rutina (200mg/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* na dose de 250 mg/kg. Após 45 minutos, os animais foram previamente anestesiados por via intramuscular com 0,04 mL/100g de xilasina 2% e 0,08 mL/100g de cetamina 10% e submetidos a procedimento cirúrgico para colocação de um “clamp” na artéria celíaca. Transcorrido 30 minutos da intervenção isquêmica, o “clamp” foi retirado e o processo de reperfusão foi realizado por 1 hora. Em seguida, os animais foram eutanasiados para a retirada dos estômagos, que foram posteriormente abertos, prensados e fotografados para que a Área de Lesão Ulcerativa – ALU (mm²) fosse determinada. Tiras da porção glandular dos estômagos (500 e 250 mg) foram coletadas e armazenadas a 80°C negativos, para que os parâmetros relacionados aos mecanismos antioxidantes fossem determinados.

3.2.3 Avaliação da atividade cicatrizante de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

3.2.3.1 Indução de úlcera gástrica por ácido acético

A avaliação da atividade cicatrizante do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foi realizada conforme o modelo descrito por Takagi et al., (1969). Ratos Wistar, machos, 180-250 g, após jejum de 12 horas, foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 9 animais, assim distribuídos: grupo sham, grupo controle positivo (lansoprazol 30 mg/kg), grupo controle negativo (Tween 80 a 8%), grupo EEtOH-*Hs* (250 mg/kg) e grupo FaHex-*Hs* (250 mg/kg).

Todos os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina, a parede abdominal foi aberta por laparotomia, o estômago foi exposto e a face externa da

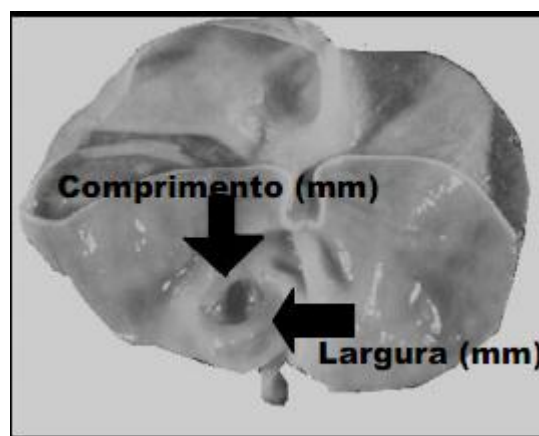
camada serosa estomacal recebeu 100µL de ácido acético absoluto, embebido em um pellet de algodão delimitado por um tubo plástico de 5,0 mm de diâmetro circular no local do contato por 1 minuto. Os estômagos foram lavados com água deionizada e a parede abdominal suturada com fio de algodão (Nº 20). Após 48 horas da exposição dos estômagos ao ácido acético, os animais foram tratados oralmente com lansoprazol (30 mg/kg), veículo (Tween 80 a 8%- 10 mL/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) uma vez ao dia, durante 14 dias.

Ao final do décimo quarto dia, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e determinada a Área de Lesão ulcerativa–ALU (mm²) com a ajuda de um paquímetro digital (Figura 9).

As formas utilizadas para a obtenção da ALU e % da taxa de cura foram as seguintes:

$$ALU = (c) \cdot (l) = \text{mm}^2$$

Figura 9 Foto da úlcera crônica induzida por ácido acético



Fonte Okabe; Amagase, (2005).

$$(\%) \text{ de cicatrização} = \frac{(AU) C - (AU) T}{(AU) C} \times 100$$

Onde:

C = AU dos animais do grupo controle;

T = AU dos animais dos grupos tratados com as amostras vegetais e controle positivo.

Após a determinação da ALU, a região que circunscreve a lesão foi removida para posterior análise histológica. Ao final dos 14 dias de tratamento, o sangue foi coletado e os órgãos internos retirados para a avaliação da toxicidade, conforme descrito a seguir.

3.2.3.2 Avaliação da toxicidade do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* por doses repetidas durante 14 dias no modelo do ácido acético

Para corroborar os resultados anteriores, foram avaliados os possíveis efeitos das amostras vegetais sobre os animais submetidos ao tratamento diário com a dose mais efetiva do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* durante 14 dias. Foram avaliados o consumo de água e ração, peso corporal e peso relativo dos órgãos (coração, fígado, rins, baço e pulmão), assim como os parâmetros bioquímicos e hematológicos.

3.2.3.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Ao final dos 14 dias de tratamento, os animais foram colocados em jejum de 12 horas, anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca e em seguida foram eutanasiados. Para a realização das análises bioquímicas, o sangue foi coletado em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados durante 10 minutos a 3.500 rpm, para obtenção do soro, que destinou-se à dosagem dos seguintes parâmetros: ureia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose, colesterol e triglicerídeos.

Para as análises hematológicas, o sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante (EDTA), seguindo-se da determinação dos seguintes parâmetros: contagem de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração hemoglobínica corpuscular (CHCM), contagem global e diferencial de leucócitos. Foram

realizados esfregaços sanguíneos que após coloração foram analisados em microscópio óptico para confirmação e controle da contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico Automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) e para o analisador hematológico celular automático Animal Blood Counter (Vet), respectivamente. Os esfregaços sanguíneos foram corados automaticamente no Hematel 200® e analisados ao microscópio óptico TAIMIN®, para confirmação e controle da contagem de células.

As análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Mariana Vieira Sobral Castello Branco no LABETOX (UFPB).

3.2.3.4 Análises histológicas dos estômagos

Amostras dos estômagos dos animais foram retiradas para a realização da histopatologia. Os estômagos foram fixados em formalina tamponada, desidratado em etanol e clarificados em xilol. Após o processamento, os tecidos foram incorporados em parafina e seccionados a uma espessura de 5 µm. As secções foram coradas com azul de toluidina para a contagem específica dos mastócitos e com hematoxilina-eosina para a avaliação de aspectos histopatológicos gerais tais como presença de edema, necrose, vasodilatação e infiltrados celulares inflamatórios. Os tecidos foram examinados em microscópio óptico, em ordem aleatória e sem conhecimento do animal ou do grupo.

As análises histológicas foram realizadas em colaboração com a equipe da profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam.

3.2.4 Investigação do efeito antimicrobiano pelo método de difusão em ágar

A investigação do efeito antimicrobiano (anti *Helicobacter pylori*) do EEtOH-Hs e FaHex-Hs foi realizada conforme descrito por Bauer et al. (1966) com

modificações. Discos impregnados com diferentes concentrações (12,5; 25, 50, 100, 200 e 400 µg/disco) de EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* e droga padrão (claritromicina 15 µg/disco) foram colocados em contato com um meio de cultura sólido (ágar sangue), que havia sido inoculado com a bactéria *Helicobacter pylori*. A suspensão bacteriana foi preparada em salina 0,9% estéril. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada a escala 2.0 de Mac Farland (1x10⁶ UFC/mL). Em seguida, a placa foi incubada por 36 horas em jarro de vela. Após o tempo de incubação, procedeu-se a leitura dos halos de inibição (zona clara onde não houve o crescimento bacteriano), considerando ativos os halos de inibição de crescimento bacteriano ≥ 10 mm, sendo o ensaio realizado em duplicata. Essas análises foram realizadas em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins, no laboratório de Farmacologia da UFMT.

3.2.5 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

3.2.5.1 Determinação da atividade antissecretória ácida por ligadura do piloro

A metodologia foi utilizada, conforme descrito no item 3.2.2.5. Após o procedimento da ligadura do piloro, o conteúdo gástrico foi pesado para indicar o volume de secreção. A acidez livre foi determinada em pHmetro e a acidez total por meio de titulação com NaOH 0,1N até pH $7,00 \pm 0,02$. Os resultados foram expressos em mEqH⁺/L/4h.

3.2.5.2 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas-SH na gastroproteção

A avaliação da participação dos compostos sulfidrilas na gastroproteção mediada pelo EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foi realizada de acordo com o modelo descrito por Matsuda et al. (1999). Ratos Wistar machos foram mantidos em jejum por 24 horas e divididos em grupos de 7 animais e tratados oralmente com veículo (Tween 80 a 8%- 10 mL/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) e carbenoxolona

100 mg/Kg. Trinta minutos antes dessa administração, 4 grupos receberam previamente N-etilmaleimida (NEM), um bloqueador de grupamentos sulfidríla e 4 grupos receberam veículo, todos por via intraperitoneal. Após 1 hora do tratamento, todos os animais receberam etanol absoluto (agente lesivo) por via oral. Decorridos mais 60 minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura. As lesões foram quantificadas de forma que a área da lesão gástrica foi determinada utilizando-se o programa Bioview 4 AvSoft.

3.2.5.3 Avaliação da participação do óxido nítrico na gastroproteção

A avaliação da participação do óxido nítrico na gastroproteção mediada pelo EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foi realizada de acordo com o modelo descrito por Sikiric et al. (1997). Ratos Wistar machos foram mantidos em jejum por 24 horas e divididos em grupos de 7 animais e tratados oralmente com veículo (Tween 80 a 8%-10 mL/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/Kg). Trinta minutos antes dessa administração, 4 grupos receberam previamente 70 mg/Kg de *N*-nitro-*L*-arginina-metil-éster (L-NAME), inibidor da NOS e 4 grupos receberam veículo, todos por via i.p. Após 1 hora do tratamento, todos os animais receberam por via oral o agente lesivo etanol absoluto. Decorridos mais 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos removidos e abertos ao longo da grande curvatura. As lesões foram quantificadas e a área da lesão gástrica foi determinada utilizando-se o programa Bioview 4 AvSoft.

3.2.5.4 Determinação da concentração do muco aderido à parede gástrica

A avaliação da participação do muco aderido à parede gástrica na gastroproteção mediada pelo EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foi realizada de acordo com o modelo, com modificações, proposto por Raffatullah et al., (1990). Foram utilizados ratos machos, pesando de 180-220g. Após 24 horas de jejum, os animais foram tratados (v.o) com Tween 80 a 8%-10 mL/kg), EEtOH-*Hs* e FaHex-

Hs (250 mg/kg) e em seguida procedeu-se a ligadura do piloro, conforme descrito no item 3.2.2.5.

Após 4 horas os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura. A porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa, por duas horas, em 10mL da solução de *Alcian blue*. O excesso de *Alcian blue* foi removido lavando-se os estômagos por duas vezes consecutivas, em 7 mL da solução de sacarose 0,25mol/L; sendo a primeira lavagem em 15 minutos e a segunda em 45 minutos após à imersão dos estômagos na solução. O corante complexado ao muco da parede estomacal foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, agitando intermitentemente por 1 minuto, a cada 30 minutos, durante 2 horas.

Desse material foi recolhido uma alíquota de 4 mL e adicionado 4 mL de éter etílico e a mistura foi agitada por 2 minutos. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 3.600 rpm e o sobrenadante descartado. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 598 nm e a concentração de *Alcian blue* foi determinada por intercalação em curva padrão com várias concentrações de *Alcian blue*. Os resultados foram expressos em mg de *Alcian blue*/g de tecido.

3.2.6 Avaliação da atividade antioxidante de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

3.2.6.1 Análise de parâmetros do sistema antioxidante endógeno

A partir do experimento de úlcera gástrica aguda induzida pelo processo de isquemia-reperfusão, os efeitos EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* na dose de 250 mg/kg foram analisados sobre os seguintes parâmetros do sistema antioxidante endógeno: níveis de lipoperoxidação (LPO) e atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Na perspectiva de obter a concentração de proteínas referentes a cada amostra estomacal, foi realizado o método de quantificação proteica por Bradford (1976).

Esses ensaios foram realizados em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Nair Honda Kawashita, no laboratório de Bioquímica da UFMT.

3.2.6.1.1 Determinação do índice de lipoperoxidação (LPO) na mucosa gástrica

Na determinação do índice de lipoperoxidação utilizou-se a metodologia proposta por Kohn e Liversedge (1944). Amostras da porção glandular do estômago com aproximadamente 500 mg foram trituradas e homogeneizadas em 2 mL de solução de KCl 1,15% e centrifugadas a 1.200 rpm sob temperatura de 4°C por 15 minutos. O sobrenadante (500 µL) foi homogeneizado numa solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) em solução tampão fosfato (pH 2,5). Todas as amostras foram agitadas por 1 minuto e submetidas à temperatura de 95°C em banho-maria por 1 hora. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e acrescentados 2 mL de n-butanol. Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação contínua por 1 minuto e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Neste modelo, o malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico emitindo uma coloração rosa (sobrenadante) que foi lida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm, utilizando-se como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetraetoxipropano. Os resultados foram expressos em µM de MDA/g de tecido.

3.2.6.1.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) na mucosa gástrica

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Winterbourn et al. (1975). Amostras da porção glandular do estômago com aproximadamente 250 mg foram trituradas e homogeneizadas em 1mL de solução tampão fosfato sódico 0,1M (pH= 7,4), centrifugadas a 1200 rpm sob temperatura de 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi diluído na solução tampão na proporção 1:15. Alíquotas de 15 µL da amostra foram pipetadas em duplicata para uma microplaca e em seguida, foram adicionados 500 µL do cocktail composto de xantina e xantina oxidase e INT (2,4-iodofenil 3-4nitrofenol5-feniltetrazolium). A absorbância foi determinada a 505 nm, depois de 30 segundos da adição da xantina oxidase (A1). A absorbância final (A2) foi determinada após 3 minutos.

3.3 Análises estatísticas

Os resultados dos testes paramétricos envolvendo variáveis contínuas foram expressos em termos de média \pm desvio padrão ($\bar{X} \pm dp$). Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett's ou Tukey. Para os resultados obtidos a partir dos ensaios de toxicidade aguda (comparação de dois grupos), foi utilizado o teste "t" de Student.

Em todas as análises estatísticas, foi considerado o nível crítico para rejeição de hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância estatística.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

No ensaio de toxicidade aguda, pode-se observar que o EEtOH-*Hs* na dose de 2.000 mg/kg (v.o), provocou hiperatividade nos camundongos, sendo este efeito mais pronunciado nas fêmeas. O extrato não promoveu alterações nos outros parâmetros avaliados. Não ocorreu presença de morte nos animais observados, não sendo possível estabelecer a DL₅₀. Estes resultados estão sistematizados na Tabela 2A.

Na avaliação da toxicidade aguda da FaHex-*Hs*, nas mesmas condições de ensaio, não foram observadas alterações comportamentais, presença de morte ou alterações no consumo de água e ração e peso ponderal dos animais tratados, conforme pode ser evidenciado na Tabela 2B.

Tabela 2A Efeito do EEtOH-*Hs* e no ganho de peso corporal, consumo de ração e consumo de água em camundongos depois de 14 dias de observação

Parâmetros	Sexo	Tratamentos	
		Controle Tween 80 (8%)	EEtOH- <i>Hs</i> (2.000 mg/kg)
Evolução Ponderal (g) (1-14 dias)			
Inicial	F	25 ± 2,0	24 ± 3,0
Final	F	29 ± 2,0	27 ± 2,0
Inicial	M	35 ± 2,0	32 ± 3,0
Final	M	39 ± 1,0	35 ± 4,0
Consumo de água (mL) (14 dias)			
	F	69 ± 12	61 ± 8,0
	M	69 ± 11	68 ± 13
Consumo de ração (g) (14 dias)			
	F	43 ± 5,0	36 ± 3,0
	M	45 ± 3,0	42 ± 2,0
Peso dos órgãos (g)			
Rins	F	1,30 ± 0,10	1,20 ± 0,10
	M	1,60 ± 0,60	1,50 ± 0,40
Fígado	F	6,20 ± 0,90	5,70 ± 0,50
	M	5,90 ± 1,10	6,60 ± 1,50
Pulmão	F	0,70 ± 0,07	0,66 ± 0,02
	M	0,54 ± 0,04	0,62 ± 0,08
Baço	F	0,75 ± 0,30	0,60 ± 0,09
	M	0,42 ± 0,10	0,55 ± 0,18
Coração	F	0,46 ± 0,06	0,45 ± 0,07
	M	0,42 ± 0,06	0,46 ± 0,08

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (n=6), utilizando o Teste t- Student. Os dados referentes ao peso relativo dos órgãos representam a razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo.

Tabela 2B Efeito da FaHex-*Hs* no ganho de peso corporal, consumo de ração e consumo de água em camundongos depois de 14 dias de observação

Parâmetros	Sexo	Tratamentos	
Evolução Ponderal (g)		Controle Tween 80 (8%)	FaHex- <i>Hs</i> (2.000 mg/kg)
Inicial	F	31 ± 1,0	33 ± 2,0
Final	F	34 ± 3,0	34 ± 3,3
Inicial	M	32 ± 2,9	36 ± 5,0
Final	M	32 ± 3,4	38 ± 4,2
Consumo de água (mL) (14 dias)	F	70 ± 6,0	79 ± 8,0
	M	71 ± 12	81 ± 13
Consumo de ração (g) (14 dias)	F	45 ± 7,0	49 ± 10,0
	M	48 ± 9,0	46 ± 11,0
Peso dos órgãos (g)			
Rins	F	1,33 ± 0,06	1,24 ± 0,22
	M	1,39 ± 0,20	1,32 ± 0,16
Fígado	F	6,33 ± 0,62	6,01 ± 0,79
	M	5,90 ± 1,0	5,70 ± 0,16
Pulmão	F	0,72 ± 0,11	0,89 ± 0,19
	M	0,68 ± 0,20	0,70 ± 0,06
Baço	F	0,65 ± 0,14	0,69 ± 0,10
	M	0,59 ± 0,12	0,56 ± 0,10
Coração	F	0,47 ± 0,07	0,43 ± 0,05
	M	0,46 ± 0,05	0,42 ± 0,05

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (n=6), utilizando o Teste t- Student. Os dados referentes ao peso relativo dos órgãos representam a razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo.

4.2 Avaliação da atividade gastroprotetora de *Hyptis suaveolens*

4.2.1 Indução de úlcera gástrica por etanol acidificado

Para avaliar se o EEtOH-*Hs* e as fases (FaHex-*Hs*, Fa DCM-*Hs*, FaAE-*Hs*) apresentavam atividade gastroprotetora, foi realizada uma triagem farmacológica preliminar frente ao modelo de indução aguda de úlcera, utilizando-se como agente lesivo da mucosa gástrica o etanol acidificado (v.o) em camundongos. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 3.

Os resultados obtidos, nesse modelo, demonstraram que o EEtOH-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e lansoprazol 30 mg/kg reduziram significativamente o índice de lesão ulcerativa (ILU) em 45, 58, 72, 73 e 57%, respectivamente, quando comparados ao controle negativo (Tabela 3A). Dentre as fases testadas, a FaHex-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e lansoprazol 30 mg/kg reduziram significativamente o ILU em 58, 68, 82, 74 e 55%, respectivamente, quando comparados ao controle negativo (Tabela 3B). A FaDCM-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e lansoprazol 30 mg/kg reduziram significativamente o ILU em 57, 51, 51, 47 e 87% respectivamente, quando comparado ao controle negativo (Tabela 3C). A FaAE-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e lansoprazol 30 mg/kg reduziram significativamente o ILU em 64, 74, 67, 50 e 58%, respectivamente, quando comparados ao controle negativo (Tabela 3D). A FaHex-*Hs* foi selecionada para os ensaios subsequentes por apresentar o melhor efeito na redução do Índice ulcerativo e apresentar o melhor rendimento extrativo.

Tabela 3 Efeito da administração oral de lansoprazol, EetOH-*Hs*, FaHex- *Hs*, FaDCM-*Hs* e FaAE-*Hs* nas úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
(A)Tween 80 (8%)	-	95 ± 16	-
Lansoprazol	30	41 ± 18 ***	57
EEtOH-<i>Hs</i>	62,5	52 ± 14 ***	45
	125	40 ± 16 ***	58
	250	27 ± 6 ***	72
	500	26 ± 10 ***	73
(B)Tween 80 (8%)		170 ± 27	-
Lansoprazol	30	76 ± 20 ***	55
FaHex-<i>Hs</i>	62,5	72 ± 31 ***	58
	125	55 ± 22 ***	68
	250	31 ± 11 ***	82
	500	44 ± 14 ***	74
(C)Tween 80 (8%)		113 ± 24	-
Lansoprazol	30	15 ± 4 ***	87
FaDCM-<i>Hs</i>	62,5	49 ± 15 ***	57
	125	56 ± 18 ***	51
	250	56 ± 8 ***	51
	500	60 ± 17 ***	47
(D)Tween 80 (8%)		87 ± 17	-
Lansoprazol	30	37 ± 12 ***	58
FaAE-<i>Hs</i>	62,5	31 ± 8 ***	64
	125	23 ± 5 ***	74
	250	29 ± 12 ***	67
	500	44 ± 16 ***	50

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Foi utilizada Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,31)} = 20$ (n= 6-7) para EEtOH-*Hs* e $F_{(5,28)} = 31$ (n= 5-6) para FaHex-*Hs*; $F_{(5,28)} = 23$ (n=5-6) para FaDCM-*Hs* and $F_{(5,28)} = 20$ (n=5-6) para FaAE-*Hs*; seguido pelo pós teste de Dunett *** $p < 0,001$ comparado ao controle negativo (Tween 80 8%). ILU= Índice de Lesão ulcerativa.

4.2.2 Indução de úlcera gástrica por etanol

Os resultados obtidos no modelo de indução de úlcera por etanol (v.o) em ratos demonstraram que o EEtOH-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg), controle positivo, inibiram significativamente as lesões ulcerativas em 18, 64, 73, 87 e 46%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (solução Tween 80 a 8%). Resultados semelhantes foram observados quando foi avaliada a FaHex-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg) , demonstrando inibição significativa das lesões ulcerativas em 37, 54, 74, 73 e 67%, respectivamente, quando comparados ao controle negativo. Esses resultados estão representados na tabela 4A; 4B e ilustrados na Figura 10 e Figura 11.

De acordo com os resultados obtidos, nesse modelo, foi realizada uma comparação entre as diferentes doses dos grupos tratados com EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, utilizando-se o teste de Tukey, o que permitiu escolher a dose mais efetiva para EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* em inibir as ulcerações gástricas (250 mg/kg).

Tabela 4. Efeito da administração de veículo (Tween 80 8%), controle positivo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e controle positivo nas úlceras agudas induzidas por etanol em roedores

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
(A)Tween 80 8%	-	230 ± 41	-
Carbenoxolona	100	124 ± 19 ***	46
EEtOH-<i>Hs</i>	62,5	189 ± 26 *	18
	125	83 ± 31 ***	64
	250	62 ± 13 ***	73
	500	29 ± 8 ***	87
(B)Tween 80 8%	-	414 ± 100	-
Carbenoxolona	100	137 ± 46***	67
FaHex-<i>Hs</i>	62,5	260 ± 78**	37
	125	189 ± 34***	54
	250	110 ± 19***	74
	500	111 ± 20***	73

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,33)} = 56$ (n=6-7) para EEtOH-*Hs* and $F_{(5,24)} = 20$ (n=5) para FaHex-*Hs*, seguido pelo Pós-teste de Dunett * $p < 0,05$ ** $P < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 8%). ILU= Índice de Lesão ulcerativa.

Figura 10 Fotos dos estômagos de ratos pré-tratados com veículo (A), carbenoxolona(B) e EEtOH-*Hs* (62,5 (C), 125 (D) 250 (E) e 500 mg/kg (F) e submetidos à indução de úlcera por etanol

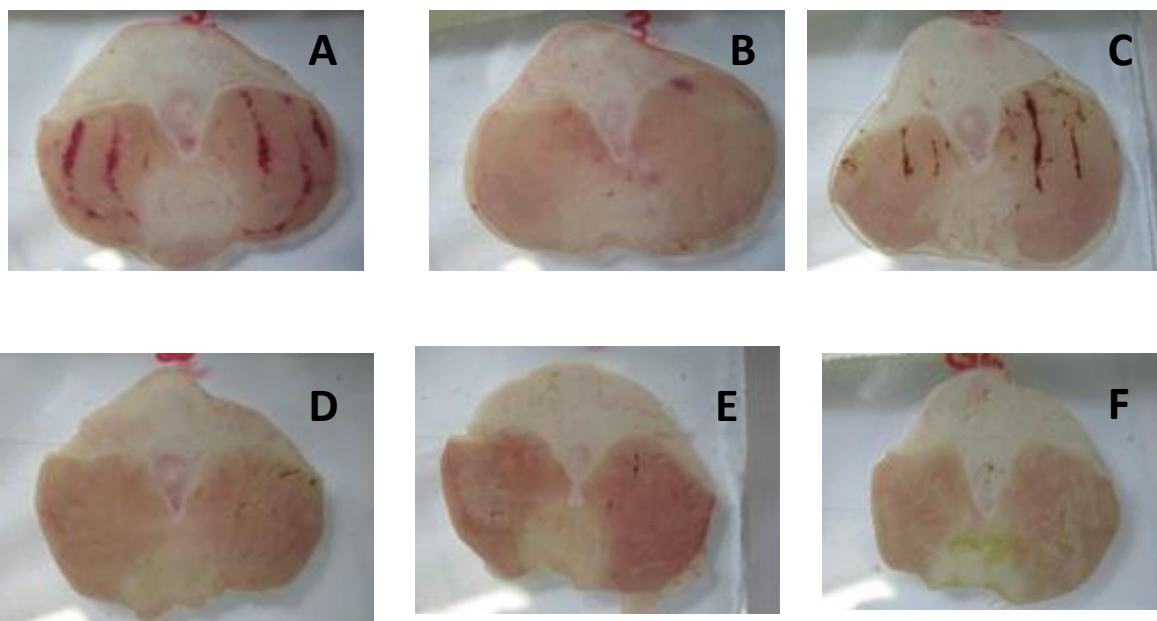
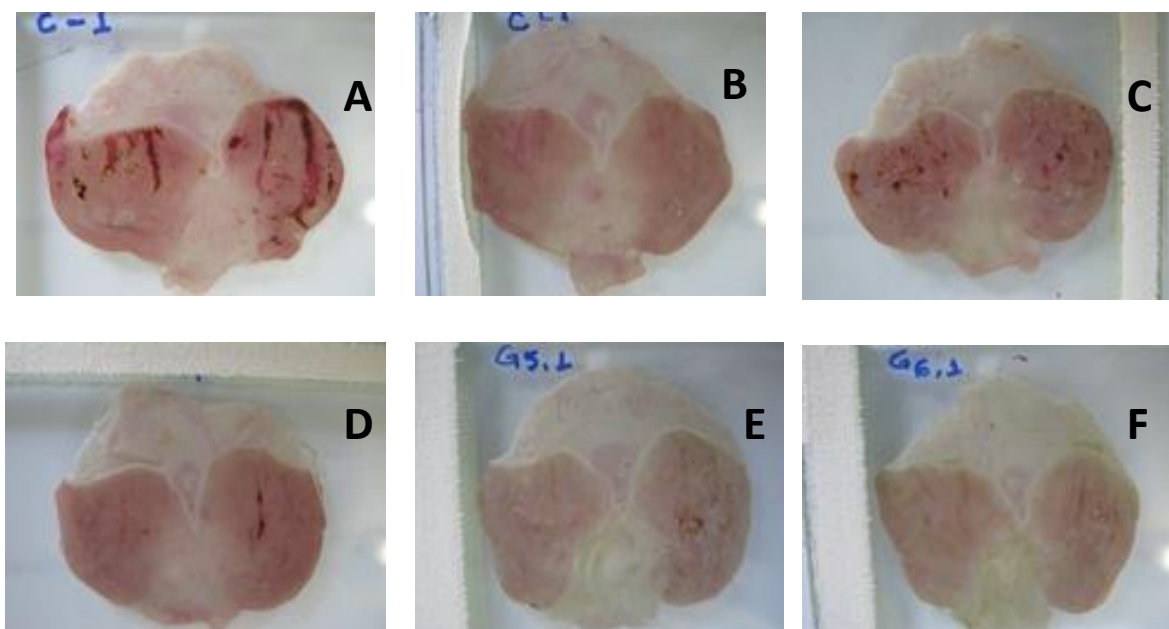


Figura 11 Fotos dos estômagos de ratos pré-tratados com veículo (A), carbenoxolona(B) e FaHex-*Hs* (62,5 (C), 125 (D) 250 (E) e 500 mg/kg (F) e submetidos à indução de úlcera por etanol



4.2.3 Indução de úlcera gástrica por anti-inflamatórios não esteroidais

Conforme os resultados obtidos, nesse modelo, foi possível observar que o EEtOH-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e a cimetidina 100 mg/kg reduziram significativamente o ILU em 82, 85, 87, 83 e 40%, respectivamente, quando comparadas ao seu controle negativo, conforme pode ser visto na Tabela 5A. Esse comportamento também foi observado para a FaHex-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e a cimetidina 100 mg/kg reduziram significativamente as lesões gástricas em 81, 82, 83, 84 e 46%, respectivamente, quando comparado ao seu respectivo controle negativo, conforme pode ser visto na Tabela 5B.

Tabela 5 Efeito da administração de veículo (Tween 80 8%), controle positivo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e controle positivo nas úlceras agudas induzidas por AINES (Piroxicam) em roedores

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
(A)Tween 80 8%			
	-	148 ± 43	-
Cimetidina	100	89 ± 38***	40
EEtOH-<i>Hs</i>	62,5	27 ± 11***	82
	125	22 ± 9***	85
	250	19 ± 6***	87
	500	25 ± 9***	83
(B)Tween 80 8%			
	-	153 ± 32	-
Cimetidina	100	82 ± 34***	46
FaHex-<i>Hs</i>	62,5	29 ± 3***	81
	125	28 ± 10***	82
	250	26 ± 5***	83
	500	24 ± 6***	84

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,34)} = 30$ (n=6-7) para EEtOH-*Hs* e $F_{(5,27)} = 39$ (n=5-6) para FaHex-*Hs* seguido, pelo Pós-teste de Dunett *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 8%). ILU= Índice de Lesão ulcerativa.

4.2.4 Indução de úlcera gástrica por estresse por imobilização e frio

No modelo de úlcera gástrica induzida por estresse por imobilização e frio, os resultados obtidos demonstraram que o EEtOH-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e a cimetidina 100 mg/kg inibiram significativamente o ILU em 51, 84, 86, 91 e 89%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle negativo (Tabela 6A). A FaHex-*Hs* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e a cimetidina 100 mg/kg também inibiram significativamente o ILU em 83, 76, 81, 82 e 71%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo, conforme pode ser visto na Tabela 6B.

Tabela 6 Efeito da administração de veículo (Tween 80 8%), controle positivo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e controle positivo nas úlceras agudas induzidas por estresse por imobilização e frio em roedores

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
(A)Tween 80 8%			
	-	179 ± 59	-
Cimetidina	100	19 ± 4 ***	89
EEtOH-<i>Hs</i>	62,5	87 ± 24 ***	51
	125	29 ± 13 ***	84
	250	26 ± 4 ***	86
	500	17 ± 3 ***	91
(B)Tween 80 8%			
	-	119 ± 33	-
Cimetidina	100	35 ± 13 ***	71
FaHex-<i>Hs</i>	62,5	20 ± 6 ***	83
	125	29 ± 8 ***	76
	250	23 ± 9 ***	81
	500	21 ± 6 ***	82

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,29)} = 33$ (n=5-6) para EEtOH-*Hs* e $F_{(5,33)} = 38$ (n=6-7) para FaHex-*Hs*, seguido pelo Pós-teste de Dunett *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 8%). ILU= Índice de Lesão ulcerativa.

4.2.5 Indução de úlcera gástrica por ligadura do piloro

Os resultados obtidos para as amostras vegetais de *H. suaveolens* frente à contensão do suco gástrico utilizando o modelo de ligadura do piloro em ratos demonstraram que o EEtOH-*Hs* (250 mg/kg), FaHex-*Hs* (250 mg/kg) e cimetidina 100 mg/kg, via intraduodenal, inibiram significativamente o ILU em 53, 66 e 37%, respectivamente, como pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7 Efeito da administração de veículo (Tween 80 8%), controle positivo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e controle positivo nas úlceras agudas induzidas por contensão da secreção gástrica por ligadura do piloro em roedores

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
Tween 80 8%	-	405 ± 122	-
Cimetidina	100	255 ± 50*	37
EEtOH- <i>Hs</i>	250	192 ± 78***	53
FaHex- <i>Hs</i>	250	139 ± 67***	66

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F(3,20) = 11$ ($n=6$) para EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, seguido pelo Pós-teste de Dunett * $p < 0,05$ ** e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 8%). ILU= Índice de Lesão Ulcerativa

4.2.6 Indução de úlcera por isquemia-reperfusão

No modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia-reperfusão, o EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) ou rutina (200mg/kg) inibiram significativamente a ALU em 79, 85 e 76%, respectivamente, conforme pode ser evidenciado no Gráfico 1 e na Figura 12.

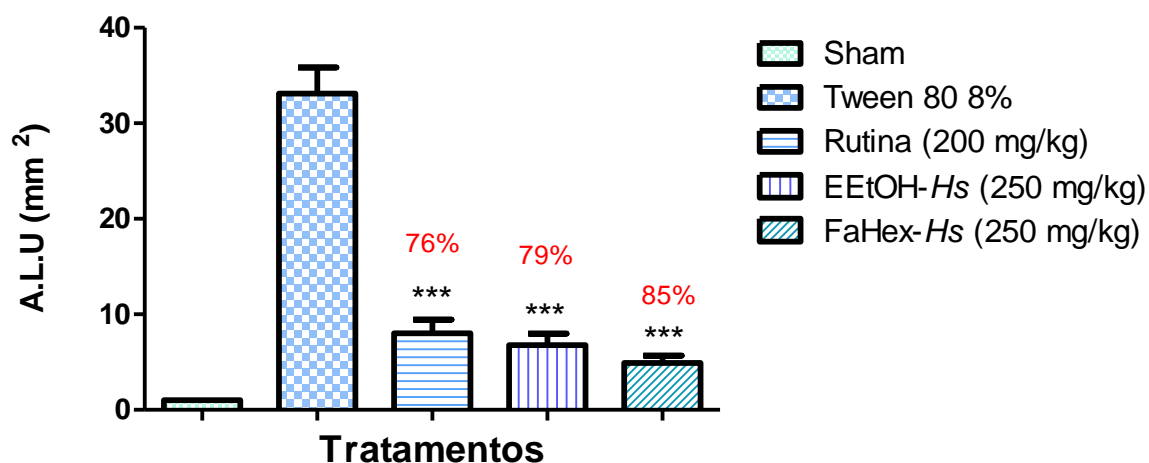
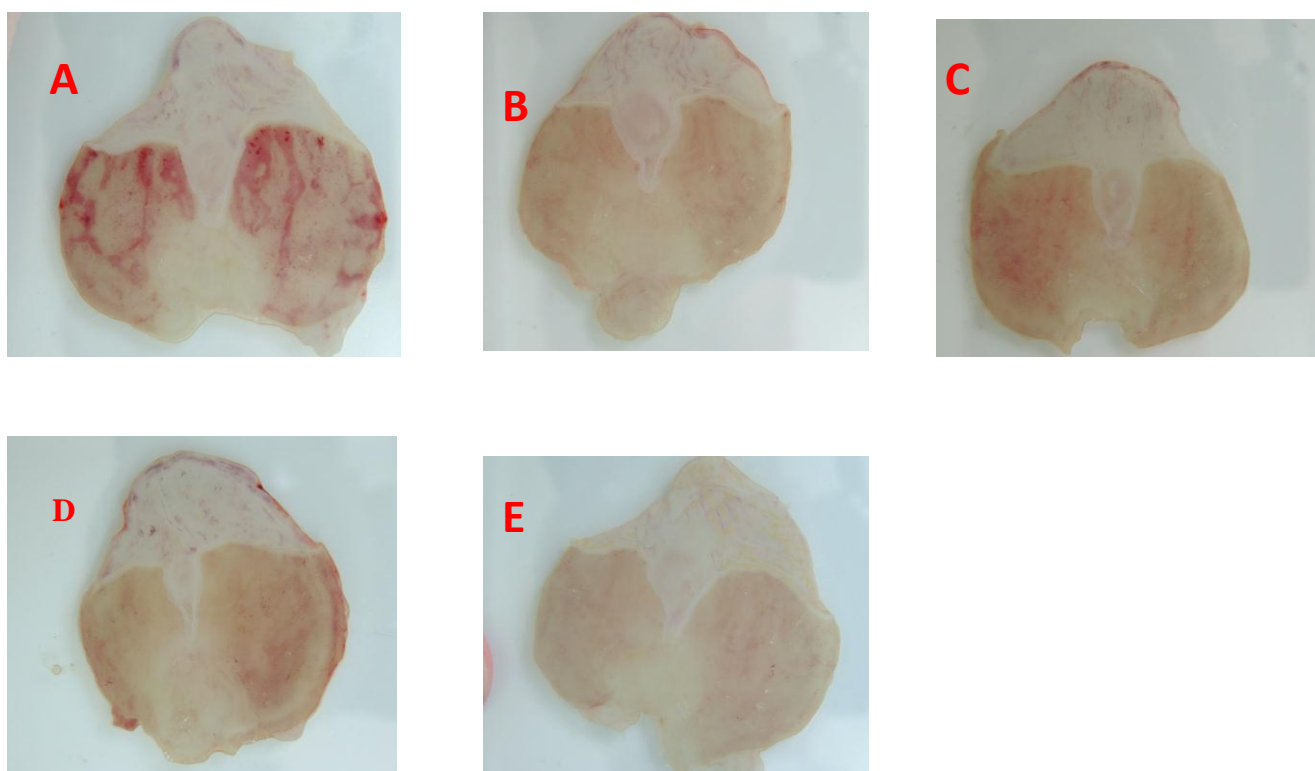


Gráfico 1 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* nas úlceras agudas induzidas por isquemia- reperusão em ratos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n=5-7$). *** $p < 0,001$. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(4, 31)} = 31$, seguido do pós- teste de Dunnett, comparando ao grupo controle negativo (Tween 80 8%).

Figura 12 Fotos dos estômagos dos ratos pré-tratados (v.o) com Tween 80 8% (A), rutina (B), EEtOH-*Hs* (C), FaHex-*Hs* (D) e grupo *sham* (E) no modelo de úlcera por isquemia- reperusão



4.3 Avaliação da atividade cicatrizante de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

Com a finalidade de avaliar o processo de cicatrização produzido pelo EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, foi determinada a área de lesão ulcerativa (ALU) e como parâmetros adicionais foi avaliada a toxicidade por doses repetidas durante 14 dias no modelo do ácido acético.

4.3.1 Indução de úlcera gástrica por ácido acético

No modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético, foi observado redução na área de lesão ulcerativa em 50, 53 e 47%. Após tratamento de 14 dias com EEtOH-*Hs* (250 mg/kg), FaHex-*Hs* (250 mg/kg) e lansoprazol (30 mg/kg), respectivamente. O grupo *sham*, constituído por animais em que a úlcera não foi induzida, não apresentou lesão, conforme o esperado. De acordo com esses resultados, ficou evidenciado que tanto o EEtOH-*Hs* quanto a FaHex-*Hs* apresentaram atividade cicatrizante da úlcera gástrica induzida por ácido acético. Esses resultados podem ser vistos no Gráfico 2.

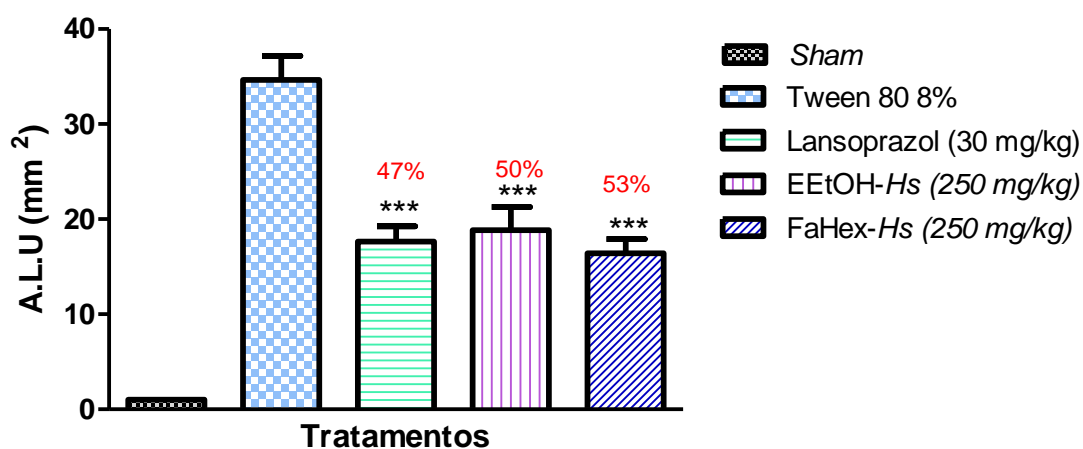


Gráfico 2 Efeito da administração oral do veículo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e lansoprazol nas úlceras agudas induzidas por ácido acético em ratos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n= 9-10).***p< 0,001. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(3, 31)} = 26$, seguido do pós- teste de Dunnett, comparando ao grupo controle negativo (Tween 80 8%).

4.3.2 Avaliação da toxicidade do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* por doses repetidas durante 14 dias no modelo do ácido acético

4.3.2.1 Avaliação do consumo de água e ração

Na avaliação do consumo de água e ração nos animais tratados com doses repetidas de EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg), foi observado que no grupo tratado com EEtOH-*Hs* houve um aumento significativo no consumo de água nos animais. No entanto, não foi observada qualquer alteração no consumo de ração nos animais tratados com as amostras vegetais. Entretanto, nos animais tratados com lansoprazol (30 mg/kg) houve redução significativa no consumo de ração, quando comparado com o controle negativo, conforme pode ser evidenciado na Tabela 8.

4.3.2.2 Avaliação ponderal

Na avaliação da toxicidade produzida por doses repetidas do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) durante 14 dias, observou-se que as amostras vegetais não promoveram alterações no peso ponderal dos ratos, quando comparados ao controle negativo (Tween 80 a 8%), conforme pode ser evidenciado na Tabela 9.

Tabela 8 Efeito da administração oral do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Tratamento	Dose	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
Sham	-	39 ± 4,3	29 ± 4,6
Tween 80 8%	10 mL/kg	35 ± 2,1	27 ± 1,2
Lansoprazol	30 mg/kg	34 ± 4,6	23 ± 0,7***
EEtOH- <i>Hs</i>	250 mg/kg	40 ± 4,1*	28 ± 2,5
FaHex- <i>Hs</i>	250 mg/kg	33 ± 5,3	25 ± 2,4

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=9-10). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett. ***p< 0,001, comparados ao grupo controle negativo (Tween 80 8%).

Tabela 9 Efeito da administração oral do EEtOH-*Hs* e da FaHex-*Hs*, durante 14 dias sobre o peso dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Tratamentos	Dose	Peso inicial (g)	Peso Final (g)	Aumento (g)
Sham	-	255 ± 5	308 ± 23	55 ± 19
Tween 80 8%	10 mL/kg	235 ± 13	297 ± 23	67 ± 9
Lansoprazol	30 mg/kg	186 ± 18	248 ± 11	65 ± 8
EEtOH- <i>Hs</i>	250 mg/kg	215 ± 26	290 ± 16	79 ± 16
FaHex- <i>Hs</i>	250 mg/kg	198 ± 19	263 ± 13	67 ± 12

Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n= 9-10). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, $p < 0,05$ comparados ao grupo controle negativo (Tween 80 8%).

4.3.2.3 Avaliação do peso relativo dos órgãos

O tratamento durante 14 dias com EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) não produziu alterações significativas no peso relativo dos órgãos dos ratos ulcerados com ácido acético quando comparados com o controle negativo (Tween 80 8%), conforme pode ser visto na Tabela 10.

Tabela 10 Efeito da administração oral do EEtOH -*Hs* e FaHex-*Hs* durante 14 dias sobre o peso relativo dos órgãos dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Órgãos	Tratamentos				
	Tween 80 8%	Lansoprazol (30 mg/kg)	EEtOH (250 mg/kg)	FaHex (250mg/kg)	Sham
Rins	0,89 ± 0,10	0,83 ± 0,05	0,81 ± 0,10	0,83 ± 0,08	0,89 ± 0,07
Fígado	3,72 ± 0,54	3,63 ± 0,27	3,57 ± 0,31	3,95 ± 0,24	4,02 ± 0,33
Pulmão	0,53 ± 0,06	0,54 ± 0,09	0,56 ± 0,10	0,60 ± 0,09	0,63 ± 0,08
Baço	0,28 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,24 ± 0,04
Coração	0,36 ± 0,04	0,40 ± 0,03	0,39 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,41 ± 0,05

Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n= 9-10). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, $p < 0,05$ comparados ao grupo controle negativo (Tween 80 8%).

4.3.2.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Em relação à análise dos parâmetros bioquímicos avaliados, conforme Tabela 11, nenhuma alteração foi observada quando o EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* foram comparados ao controle negativo (Tween 80 8%).

4.3.2.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Em relação à análise dos parâmetros hematológicos avaliados de acordo com a Tabela 12, nenhuma alteração foi observada quando o EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* foram comparados ao controle negativo (Tween 80 8%).

Tabela 11 Efeito da administração oral do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos em ratos no modelo de úlceras induzidas por ácido acético

Parâmetros	Tratamentos				
Bioquímicos	Sham	Tween 80 8%	Lansoprazol (30 mg/kg)	EEtOH-<i>Hs</i> (250 mg/kg)	FaHex-<i>Hs</i> (250 mg/kg)
Glicose (mg/dL)	152 ± 16	145 ± 33	127 ± 33	157 ± 38	137 ± 17
Triglicerídeos (mg/dL)	98 ± 43	85 ± 36	55 ± 19	115 ± 35	81 ± 39
Colesterol (mg/dL)	66 ± 19	69 ± 19	74 ± 19	68 ± 19	68 ± 13
Ureia (mg/dL)	44 ± 6	40 ± 6	39 ± 5	43 ± 9	38 ± 11
Creatinina (mg/dL)	0,71 ± 0,12	0,76 ± 0,14	0,82 ± 0,25	0,68 ± 0,12	0,62 ± 0,14
Ácido úrico (mg/dL)	0,83 ± 0,40	1,36 ± 0,54	1,5 ± 0,64	0,80 ± 0,40	0,65 ± 0,30
AST (U/l)	101 ± 28	132 ± 30	180 ± 68	122 ± 33	131 ± 29
ALT (U/l)	39 ± 11	43 ± 7,0	46 ± 9,0	43 ± 9,0	42 ± 7,0

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n= 5-10). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, $p < 0,05$ comparados ao grupo controle negativo (Tween 80 8%).

Tabela 12 Efeito da administração oral do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlceras induzidas por ácido acético

Parâmetros	Tratamentos				
Hematológicos	Sham	Tween 80 8%	Lansoprazol (30 mg/kg)	EEtOH- <i>Hs</i> (250 mg/kg)	FaHex- <i>Hs</i> (250 mg/kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,4 ± 0,2	7,2 ± 0,3	7,3 ± 0,4	7,1 ± 0,4	7,2 ± 0,4
Hemoglobina (g/dL)	43 ± 2,0	40 ± 1,6	43 ± 2,3	41 ± 1,8	42 ± 3,0
Hematócrito (%)	15 ± 0,6	15 ± 0,5	15 ± 0,8	14 ± 0,7	15 ± 0,8
VCM (μ^3)	58 ± 1,7	56 ± 2,7	59 ± 1,8	58 ± 1,5	57 ± 2,2
HCM (μg)	21 ± 0,4	21 ± 0,7	21 ± 0,8	21 ± 0,4	21 ± 0,5
CHCM (%)	36 ± 0,8	37 ± 0,7	35 ± 0,7	36 ± 0,5	36 ± 1,0
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,8 ± 1,5	7,1 ± 1,9	7,9 ± 1,9	6,2 ± 1,8	8,1 ± 1,0
Neutrófilos (%)	27 ± 3,8	26 ± 8,0	28 ± 10	27 ± 7,0	24 ± 8,7
Linfócitos(%)	68 ± 8,5	70 ± 8,2	69 ± 12,4	70 ± 7,4	73 ± 10,4
Monócitos (%)	6,0 ± 3,0	5,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	3,0 ± 1,0	3,0 ± 1,0

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n= 5-10). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett, $p < 0,05$ comparados ao grupo controle negativo (Tween 80 8%).

4.3.2.6 Análises histológicas dos estômagos

O EEtOH-*Hs* (250 mg/kg) e FaHex-*Hs* (250 mg/kg), quando submetidos às análises histológicas, não apresentaram diferenças significativas na contagem de mastócitos quando comparados ao grupo controle negativo, entretanto, nos animais tratados com lansoprazol esse parâmetro aumentou significativamente, conforme pode ser observado no Gráfico 3 e ilustrado na Figura 13.

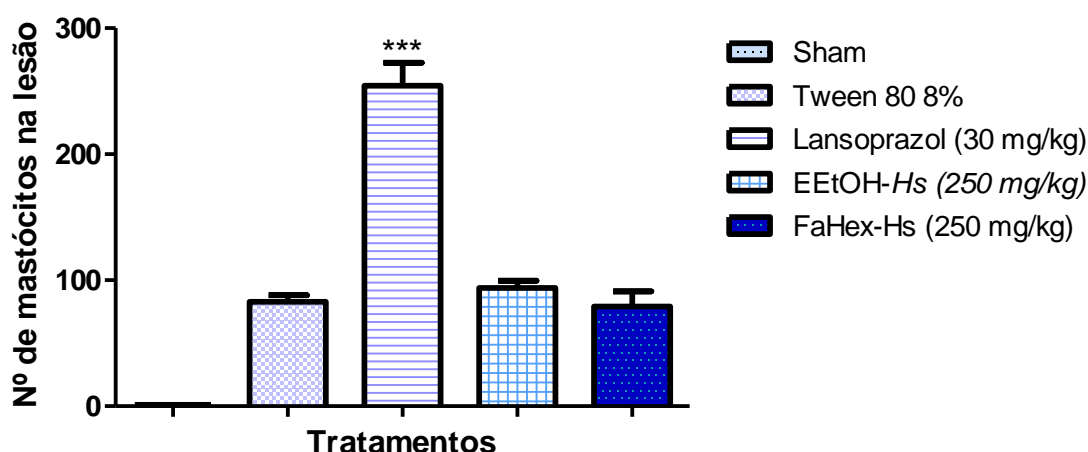
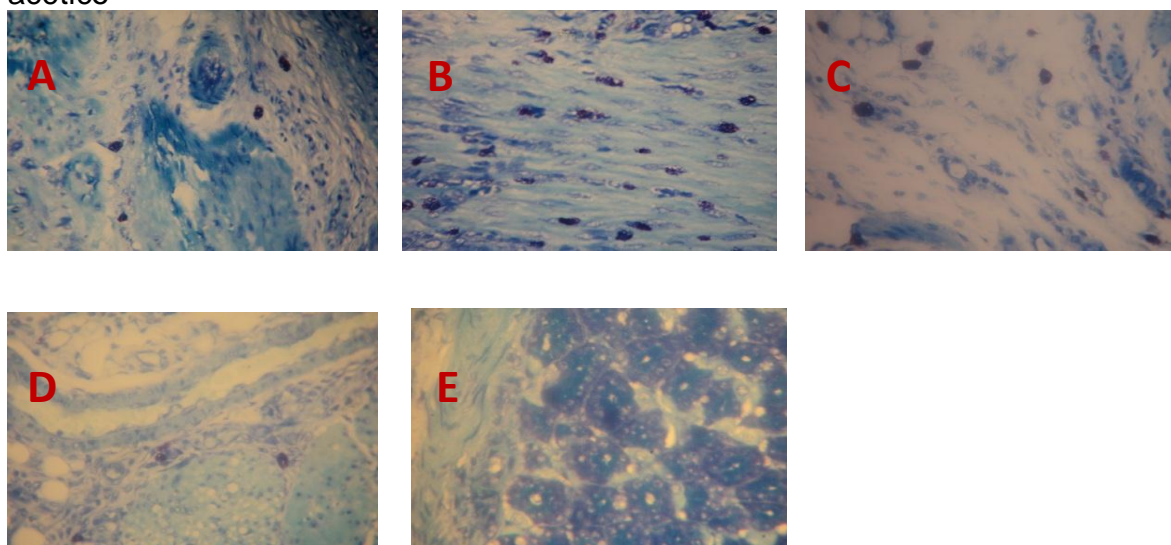


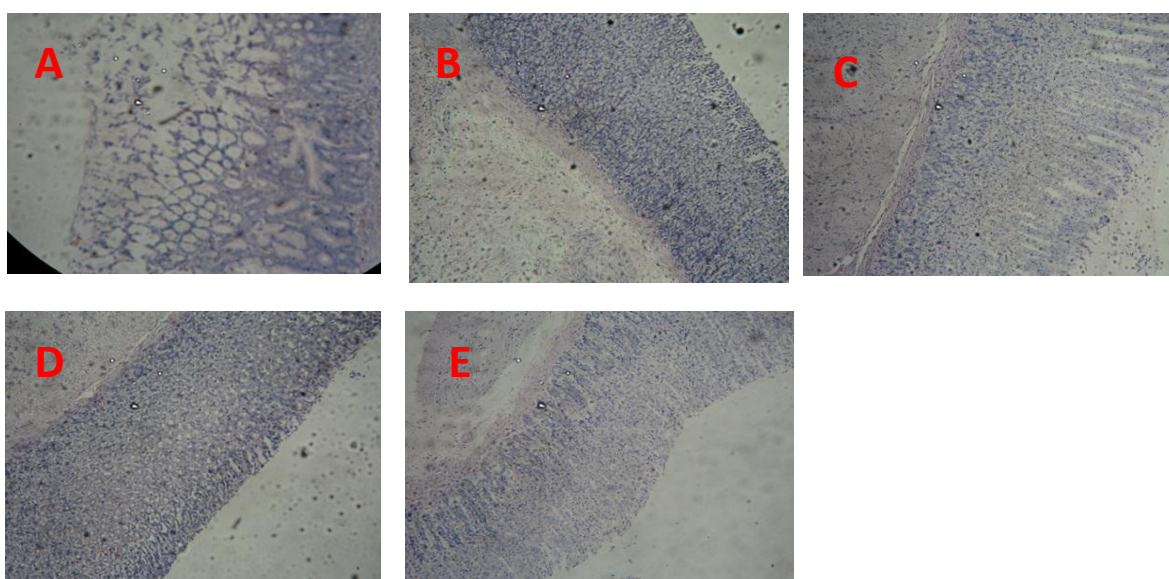
Gráfico 3 Efeito da administração oral do veículo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e lansoprazol no número de mastócitos nas úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n= 9-10). **p< 0,01. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(3, 31)} = 26$, seguido do pós- teste de Dunnett, comparando ao grupo controle negativo (Tween 80 8%)

Figura 13 Fotos dos cortes histológicos dos estômagos dos ratos corados com azul de toluidina, pré-tratados (v.o) com Tween 80 8% (A), Lansoprazol (B), EEtOH-*Hs* (C), FaHex-*Hs* (D) e grupo sham (E) no modelo de úlcera por ácido acético



Na identificação dos padrões inflamatórios nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina, verificou-se intensa necrose, vasodilatação, hemorragia, edema e presença de infiltrado leucocitário no grupo controle negativo. Essas características foram atenuadas no grupo controle positivo, EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, conforme pode ser evidenciado na Figura 14.

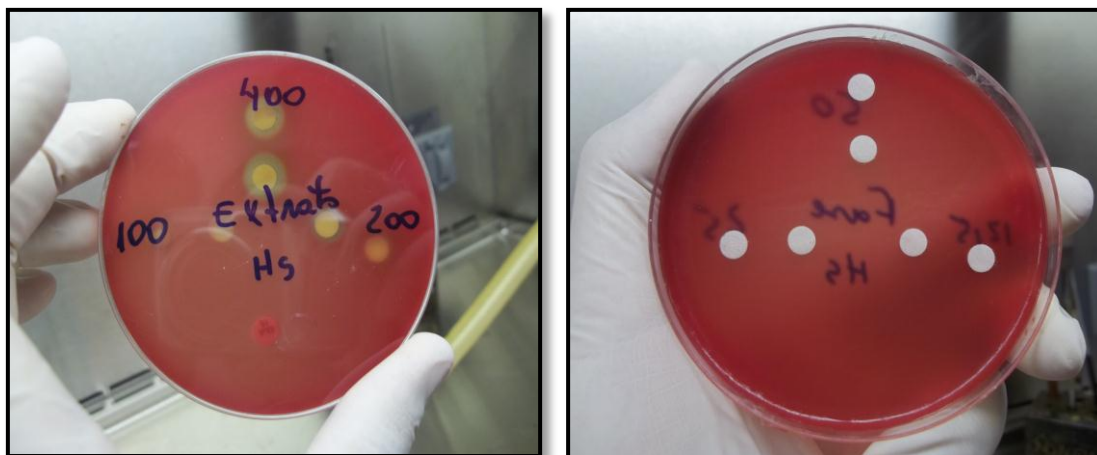
Figura 14 Fotos dos cortes histológicos dos estômagos dos ratos corados com hematoxilina eosina, pré-tratados (v.o) com Tween 80 8% (A), Lansoprazol (B), EEtOH-*Hs* (C), FaHex-*Hs* (D) e grupo sham (E) no modelo de úlcera por ácido acético



4.4 Investigação do efeito antimicrobiano pelo método de difusão em ágar

No ensaio que investigou a participação do EEtOH-*Hs* (12,5; 25, 50, 100, 200 e 400 µg/disco) e FaHex-*Hs* (12,5; 25, 50, 100, 200 e 400 µg/disco) na atividade antimicrobiana contra a bactéria *Helicobacter pylori*, não foi observado inibição do crescimento da bactéria no meio de cultura. Observou-se apenas a formação de um halo de hemólise quando o disco foi impregnado com o EEtOH-*Hs* na concentração de 400 µg/mL, que não deve ser confundido com a inibição do crescimento bacteriano. Esses resultados podem ser observados na Figura 15.

Figura 15 Efeito do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* no crescimento da bactéria *H. pylori* em meio de cultura (ágar sangue)



A- EEtOH-*Hs*

B- FaHex-*Hs*

4.5 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

Na perspectiva de elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* foram avaliadas a atividade antissecretória ácida, participação dos grupamentos sulfidrilas, do óxido nítrico e do muco aderido à parede gástrica.

4.5.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico, após contensão da secreção gástrica

No modelo de ligadura do piloro, foram avaliados os parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal dos ratos como: pH, concentração dos íons H^+ e volume do suco gástrico após a administração do Tween 80 8%, cimetidina (100 mg/ kg), EEtOH-*Hs* (250 mg/kg) e a FaHex-*Hs* (250 mg/kg).

Os dados obtidos demonstraram que tanto o EEtOH-*Hs* quanto a FaHex-*Hs* não promoveram alterações no volume do suco gástrico, pH e na acidez total quando comparados ao grupo controle negativo (Tween 80 8%). Esses parâmetros bioquímicos podem ser observados no Gráfico 4.

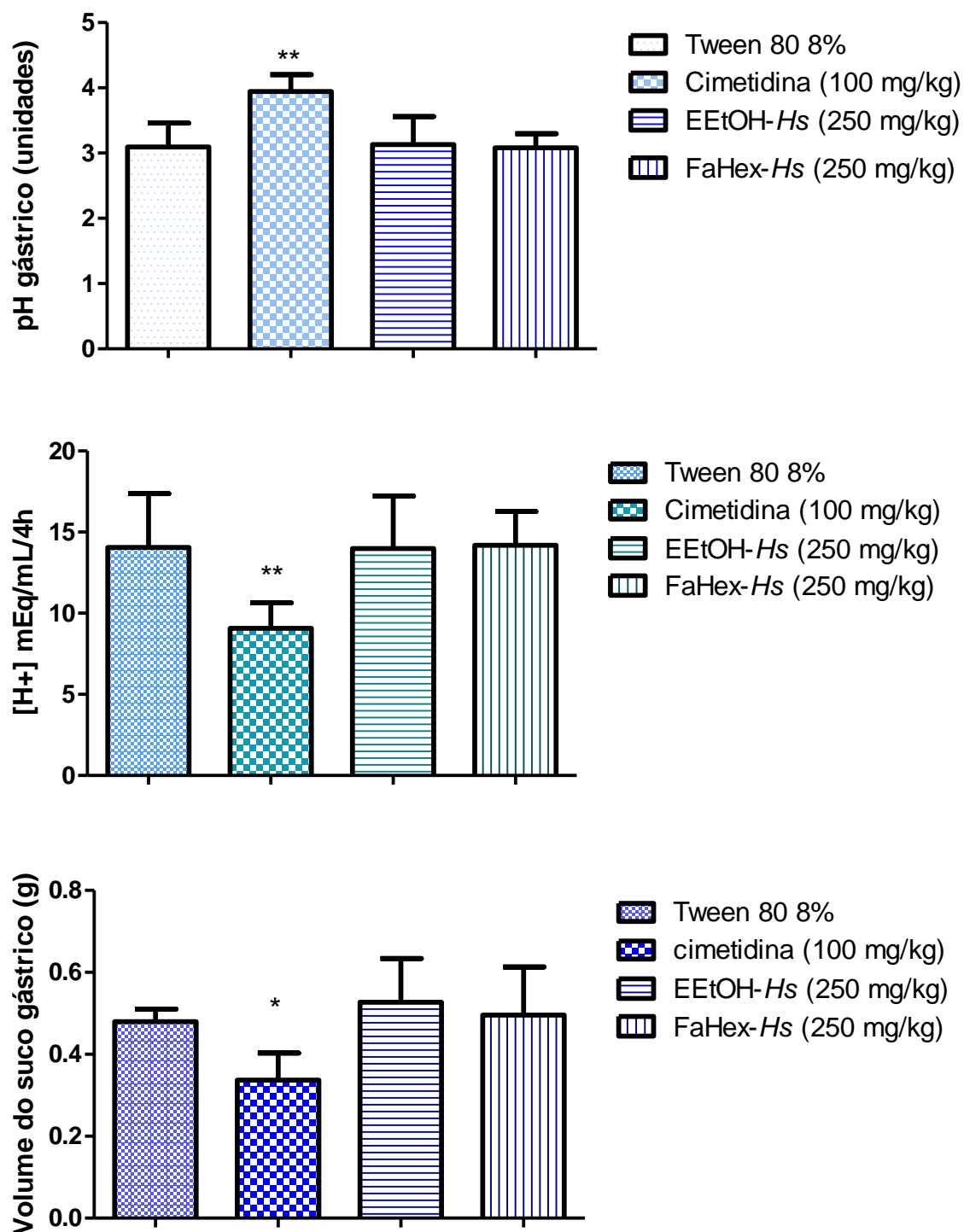


Gráfico 4 Efeito da administração intraduodenal do veículo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e cimetidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico, após ligadura do piloro. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 7-8$ animais). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Análise de Variância de uma via (ANOVA): pH $F_{(3,28)} = 8,5$; acidez total $F_{(3,24)} = 6,2$; Volume $F_{(3,24)} = 5,5$ comparando-se ao grupo controle negativo (Tween 80 8%)

4.5.2 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas-SH na gastroproteção

No modelo que avaliou a participação dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção mediada por *Hyptis suaveolens*, foi observado que no grupo de animais previamente tratados com solução tween 80 8% e depois tratados com EEtOH-*Hs* (250 mg/kg), FaHex-*Hs* (250 mg/kg) ou carbenoxolona (100mg/kg) ocorreu uma inibição significativa do ALU, em 76, 88 e 92%, respectivamente. Entretanto, quando foram avaliados os grupos pré-tratados com NEM (bloqueador de grupamentos sulfidrilas) e tratados com EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e carbenoxolona, observou-se uma exacerbação da ALU, respectivamente, com 33, 51 e 47% de inibição, quando comparados com o controle negativo, conforme pode ser evidenciado no Gráfico 5 e ilustrado na Figura 16.

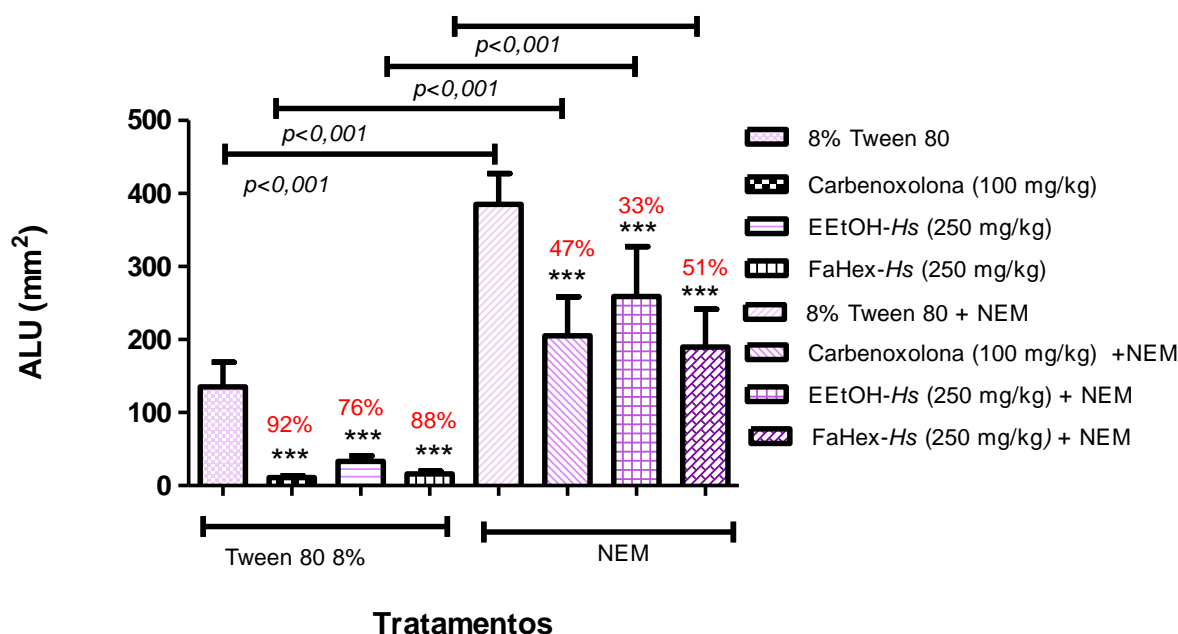
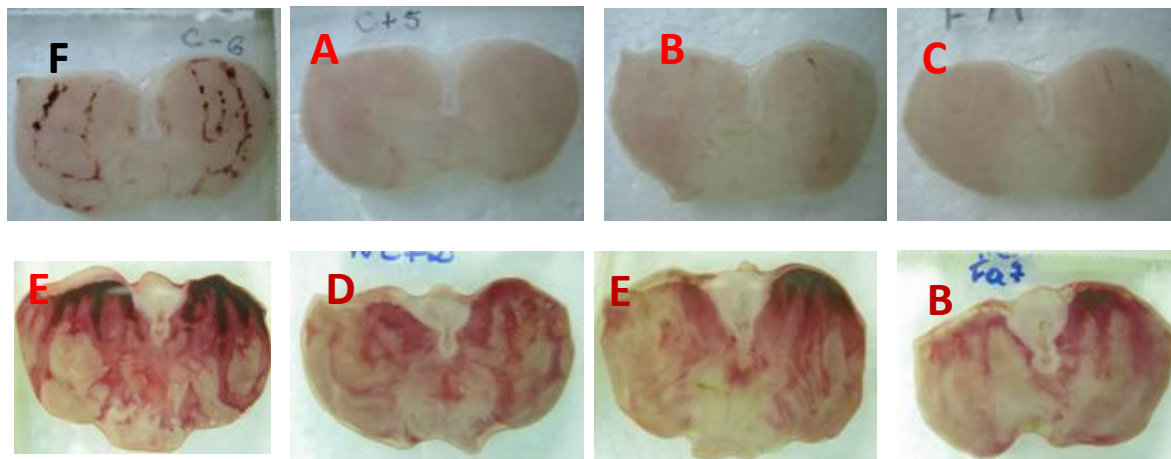


Gráfico 5 Efeito da administração oral do veículo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e carbenoxolona nas úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos pré-tratados com NEM. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n= 6-7). ** p<0,01 *** p<0,001. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(7,40)} = 64$, seguido do pós-teste de Tukey, comparando-se todos os grupos. ALU= Área de Lesão Ulcerativa.

Figura 16 Fotos de estômagos dos ratos ulcerados pelo etanol, tendo sido pré-tratados com solução Tween 80 8% (A), Tween/carbenoxolona (B), Tween/EEtOH-*Hs* (250mg/kg) (C), Tween/FaHex-*Hs* (250 mg/kg) (D), e NEM/Tween (E), NEM/carbenoxolona (F), NEM/EEtOH-*Hs* (250mg/kg) (G), NEM/FaHex-*Hs* (250 mg/kg) (H)



4.5.3 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção

No modelo que avaliou a participação do óxido nítrico na gastroproteção mediada por *H. suaveolens*, foi observada a inibição significativa da ALU nos animais tratados com EEtOH-*Hs* (250 mg/kg), FaHex-*Hs* (250 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg), respectivamente, em 76, 88 e 92%, quando comparados com o controle negativo. Entretanto, quando foram avaliados os grupos pré-tratados com L-NAME (Inibidor da NO sintase) e tratados com EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e carbenoxolona, observou-se uma exacerbação da ALU respectivamente nos grupos veículo e carbenoxolona, em comparação com os grupos não tratados com L-NAME, mas não houveram diferenças significativas na exacerbação das lesões nos grupos tratados com EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, de forma que os mesmo inibiram respectivamente as lesões em 88 e 93%, quando comparados com o controle negativo bloqueado, conforme pode ser evidenciado no Gráfico 6 e Figura 17.

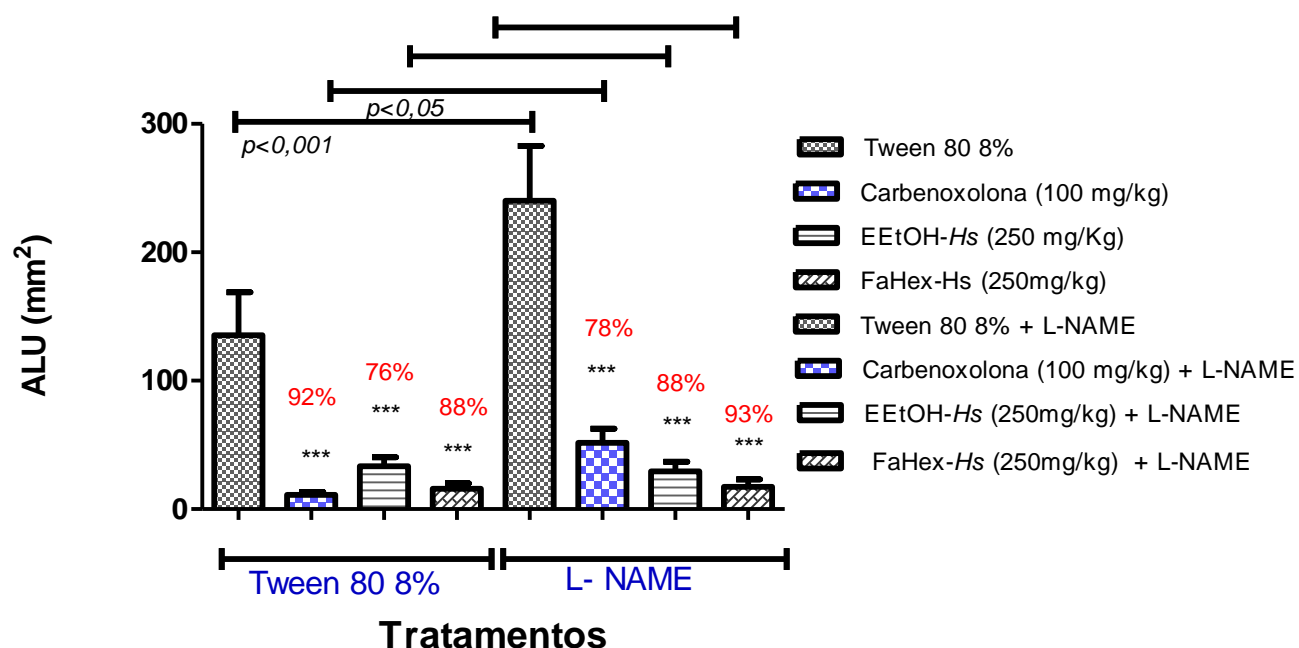
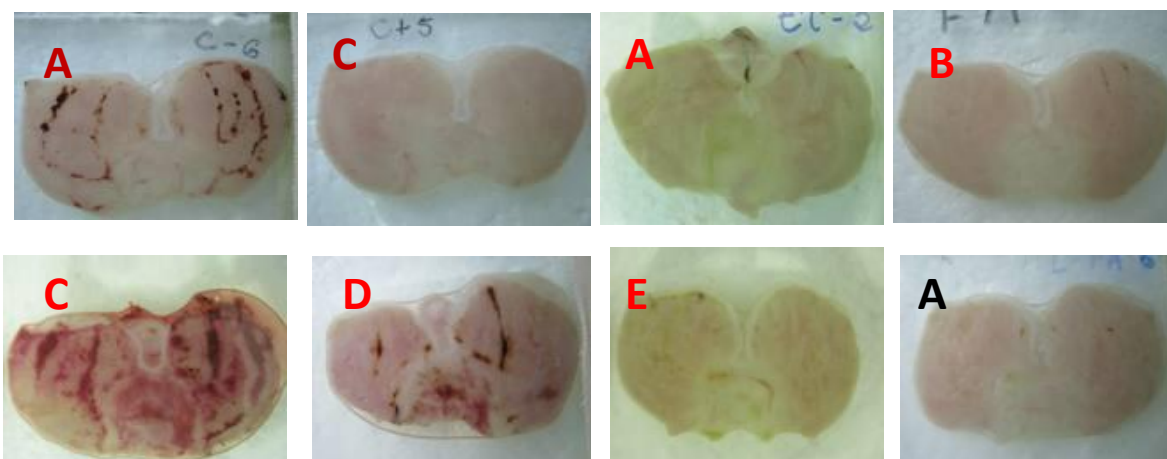


Gráfico 6 Efeito da administração oral do veículo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e carbenoxolona nas úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos pré tratados com L-NAME. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6-7$). *** $p < 0,001$. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(7,40)} = 96$, seguido do pós-teste de Tukey, comparando-se todos os grupos. ALU= Área de lesão Ulcerativa

Figura 17 Fotos de estômagos dos ratos ulcerados e pré-tratados (v.o) com solução Tween 80 8% (A), Tween/carbenoxolona (B), Tween/EEtOH-*Hs* (250mg/kg) (C), Tween/FaHex-*Hs* (250 mg/kg) (D), e NEM/Tween (E), L-NAME/carbenoxolona (F), L-NAME/EEtOH-*Hs* (250mg/kg) (G), L-NAME/FaHex-*Hs* (250mg/kg) (H)



4.5.4 Determinação da concentração do muco aderido à parede gástrica

Os resultados obtidos no modelo que investiga a participação do muco na gastroproteção induzida pelo EEtOH-*Hs* (250 mg/kg) e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) demonstraram que não houveram alterações significativas na concentração do muco aderido à parede gástrica induzidas pelas amostras vegetais, quando comparada com o controle negativo, entretanto, conforme o esperado, a carbenoxolona (200mg/kg) aumentou significativamente os níveis do muco gástrico em 34% quando comparado ao controle negativo, conforme pode ser evidenciado no Gráfico 7.

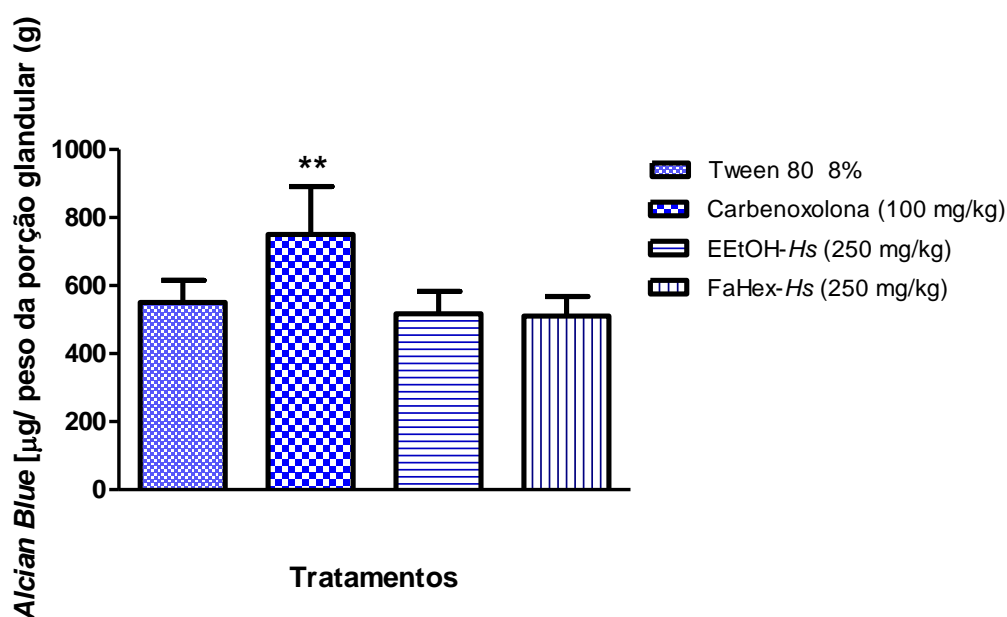


Gráfico 7 Efeito da administração oral do veículo, EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* e carbenoxolona na produção de muco da parede gástrica. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n= 6-8). **p< 0,01. Análise de Variância de uma via (ANOVA): $F_{(3,23)} = 11$, seguido do pós - teste de Dunnett's, comparando-se ao grupo controle negativo (Tween 80 8%).

4.5.5 Avaliação da atividade antioxidante

4.5.5.1 Determinação do índice de lipoperoxidação (LPO) na mucosa gástrica

O índice de Lipoperoxidação (LPO) da mucosa gástrica foi avaliado por meio da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) nas úlceras induzidas por isquemia-reperfusão. A concentração de MDA significativamente aumentou ($p < 0,001$) com a isquemia-reperfusão no grupo veículo quando comparado ao grupo sham. O pré-tratamento com EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* ou rutina significativamente atenuou a elevação do MDA em 43%, 40% e 52%, respectivamente, conforme pode ser observado no Gráfico 8.

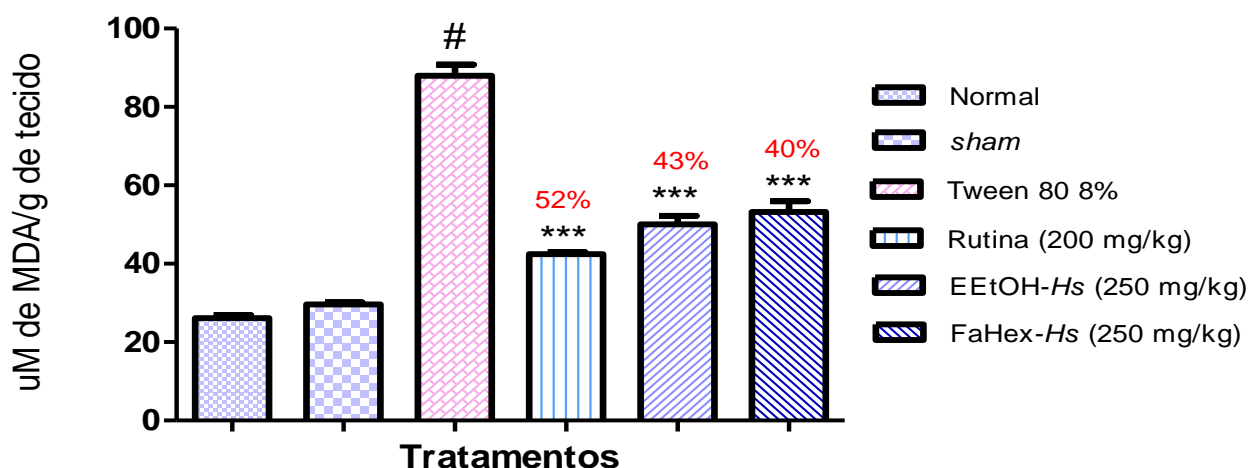


Gráfico 8 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* nas níveis de MDA em ratos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n=5-7$). *** $p < 0,001$. Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do pós- teste de Tukey, comparando-se todos os grupos.

4.5.5.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) na mucosa gástrica

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) na mucosa gástrica nas úlceras induzidas por isquemia-reperfusão foi realizada e verificou-se redução da atividade da enzima nos animais tratados com o veículo. A redução da atividade da enzima foi atenuada nos animais tratados com EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs* ou rutina, conforme pode ser observado no Gráfico 9.

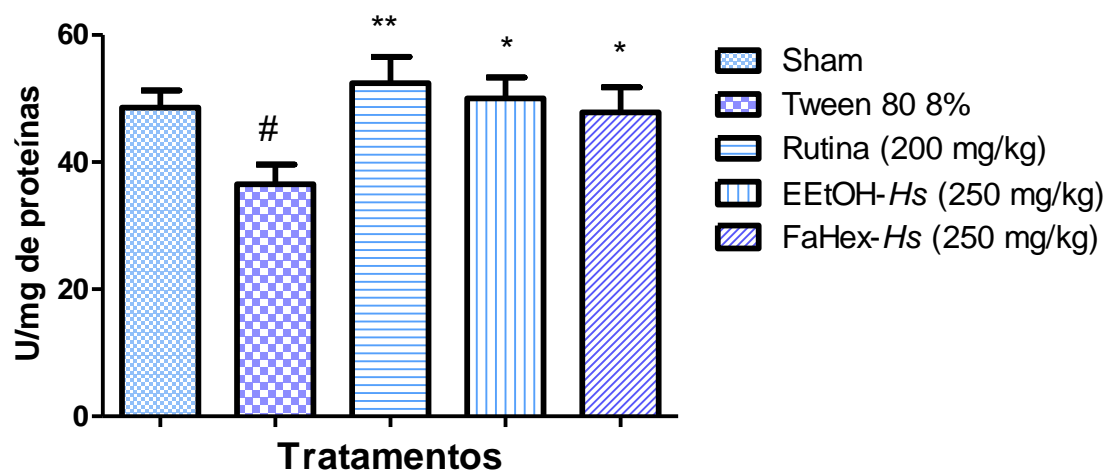


Gráfico 9 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-*Hs* e FaHex -*Hs* na atividade da SOD da mucosa gástrica em ratos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=5-7). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do pós- teste de Tukey, comparando-se todos os grupos.

5 DISCUSSÃO

O tratamento convencional das úlceras gástricas é atualmente baseado na utilização de medicamentos que apresentam efeitos adversos, além do alto custo e ocorrência de recidivas. Ao mesmo tempo, constata-se que o tratamento de sintomatologias relacionadas às úlceras gástricas, utilizando plantas medicinais, é prática comum na medicina tradicional do mundo inteiro. Por essas razões, a pesquisa por novas drogas torna-se relevante e plantas medicinais e produtos naturais desempenham um papel chave nesses estudos, visto que muitos extratos e compostos isolados têm demonstrado resultados promissores no tratamento e prevenção das úlceras gástricas (LEMOS et al., 2011).

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para a investigação de novos agentes terapêuticos e tratamento das úlceras gástricas. Estes métodos têm auxiliado a elucidar sua patogenia e a buscar novas substâncias ativas mais eficazes e seguras.

O presente trabalho visou investigar a atividade gastroprotetora, cicatrizante e anti-*H.pylori* do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* das partes aéreas de *Hyptis suaveolens*, em modelos animais que mimetizam a úlcera gástrica no homem, elucidar os mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção e realizar ensaios que apontem para a segurança da sua utilização.

No estudo, observamos que o EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* apresentaram atividade gastroprotetora que foi evidenciada pela inibição na formação de úlceras gástricas por diversos agentes necrotizantes como etanol acidificado, etanol, AINES e agentes físicos como o estresse por imobilização e frio, além da contensão ácida por ligadura do piloro e geração de radicais livres por processo de isquemia-reperusão.

Para iniciar essa investigação, foi realizada uma triagem fitoquímica preliminar, visando identificar os constituintes químicos majoritários presentes nas amostras vegetais, de forma a relacionar sua presença às propriedades farmacológicas observadas. A análise fitoquímica do EEtOH-*Hs* revelou a presença de terpenos, compostos fenólicos, taninos, alcaloides, cumarinas e saponinas.

Diversos estudos têm sido realizados com a finalidade de investigar os constituintes químicos presentes nessa espécie, demonstrando que *Hyptis*

suaveolens é rica em óleos essenciais constituídos principalmente de terpenos, em sua maioria por monoterpenos e sesquiterpenos (MANCHAND, 1974; MARTINS et al. 2006). Também foram isolados os esteroides β -sitosterol e ácido oleanólico (MISRA, 1981). Existem estudos que apontam altos teores em alcaloides, flavonoides e taninos nesta espécie (EDEOGA et al., 2006).

De acordo com estudos farmacológicos, três espécies do gênero *Hyptis*, *Hyptis mutabilis*, *Hyptis spicigera* e *Hyptis martiusi*, apresentaram atividade gastroprotetora relacionada à presença de terpenos (CALDAS et al., 2011). Vera-Arzave et al., (2012), verificaram inibição das úlceras gástricas induzidas por etanol pelo diterpeno suaveolol isolado de *H. suaveolens*.

Entretanto, para o EEtOH-*Hs* esta atividade farmacológica pode não estar limitada apenas a esta classe de compostos, visto que outros compostos não voláteis estão presentes e podem estar envolvidos na gastroproteção mediada pela espécie, tais como alcaloides, flavonoides e taninos. Esta afirmação é reforçada pela redução das ulcerações gástricas evidenciadas nas fases menos apolares, tais como FaDCM-*Hs* e FaAE-*Hs*, no modelo de indução por etanol acidificado.

Visando respaldar o uso popular de *H. suaveolens* frente à atividade gastroprotetora e cicatrizante, realizou-se o ensaio de toxicidade aguda utilizando o EEtOH-*Hs* na dose de 2.000 mg/kg (OECD, 2001).

Os estudos toxicológicos têm, dentre outras finalidades, contestar a ideia equivocada de que produtos fitoterápicos são desprovidos de efeitos tóxicos ou adversos e que o uso popular das plantas basta para validar sua eficácia (LAPA, 1999; LAPA, 2001; CRAVEIRO et al., 2008; MARLIÉRE et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008).

Foi observado que o EEtOH-*Hs* provocou hiperatividade nos animais, efeito este mais pronunciados nas fêmeas. Este efeito pode ser decorrente de uma atividade estimulante do Sistema Nervoso Central, que poderá ser posteriormente investigada.

O uso do extrato etanólico na dose testada não produziu mortes nos animais e nem alterações no peso relativo dos órgãos. Corroboram com esses resultados, os estudos realizados por Santos et al. (2007), Rajput et al. (2010), assim como estão de acordo com resultados encontrados por Attawish et al.

(2005), que não encontraram indícios de toxicidade para a espécie. Assim, pode-se concluir que o EEtOH-*Hs* apresentou baixa toxicidade na dose avaliada.

Para uma avaliação inicial da atividade do EEtOH-*Hs* quanto ao seu efeito gastroprotetor, foi realizada uma triagem farmacológica utilizando o etanol acidificado. A escolha das doses utilizadas nesse estudo, seguiu os critérios estabelecidos por Souza-Brito (1994), que afirma que a dose utilizada para extratos brutos e seus derivados em triagens farmacológicas não devem ultrapassar 1.000 mg/kg.

A patogênese das lesões gástricas agudas provocadas pelo etanol acidificado não está bem estabelecida. Segundo Andreo et al.,(2006), o mecanismo da úlcera gástrica induzida por esse agente lesivo envolve mecanismos defensivos da mucosa gástrica, assim como, o envolvimento de espécies reativas de oxigênio. De acordo com Szabo et al., (1987) a elevação do fluxo de Na⁺, K⁺ para o lúmen neste modelo de indução, pode acarretar aumento na secreção de pepsina. Além disso, reforça a importância do estresse oxidativo com a consequente peroxidação lipídica e fragmentação do DNA.

Os resultados obtidos nesse protocolo mostram que o EEtOH-*Hs* e as fases (FaHex-*Hs*, FaDCM-*Hs* e FaAE-*Hs*) inibiram significativamente as lesões gástricas induzidas por esse agente lesivo. Dentre as fases testadas na triagem, a fase hexânica foi selecionada por apresentar o melhor efeito na redução das lesões gástricas e o melhor rendimento extrativo.

Frente a esses resultados é sugerido que os mecanismos gastroprotetores envolvidos neste modelo, envolve atividade antissecretória de ácido clorídrico e pepsina, proteção da mucosa pelo aumento da síntese de muco, dos níveis de prostaglandinas e varredura de radicais livres (NERGARD et al., 2005).

O etanol em altas concentrações, danifica diretamente a mucosa gástrica provocando gastrite aguda, levando a hiperemia, edema, hemorragia e úlcera entre outros danos (PAN et al., 2008).

O dano gástrico no modelo de úlcera por etanol em animais de laboratório simula o que ocorre em humanos, em virtude do consumo de bebidas alcoólicas, podendo ocorrer em função da desidratação da superfície da célula, desarranjo estrutural das membranas lipídicas e precipitação de proteínas celulares. O etanol evoca constrição de vênulas e veias da mucosa com estase sanguínea e

produção de necrose (BOU-ABBOUD et al., 1988), seguida de vigorosa dilatação arteriolar (OATES et al., 1988).

Os radicais livres são gerados durante os episódios de isquemia-reperfusão, aumento da permeabilidade vascular com infiltração de leucócitos polimorfonucleares. A ativação dos fagócitos leva ao aumento de radicais livres e da peroxidação lipídica, aumento da conversão da enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase, com elevação da produção de íon hidroxila (WADA et al., 1996).

Nessa situação, caracteriza-se o estresse oxidativo na mucosa gástrica (*Burst* respiratório), que consiste em aumento de consumo de oxigênio principalmente pelos fagócitos, com grande produção de peróxido de hidrogênio e íons hidroxila, capazes de provocar dano mitocondrial e acarretar morte das células da mucosa gástrica (REPETTO; LLESUY, 2002).

O modelo de úlcera por etanol está relacionado com depleção de muco e compostos sulfidrilas, modulação do sistema de óxido nítrico e outros fatores como a participação de nervos aferentes sensíveis a capsaicina (SOBUE et al., 2003; KONTUREK et al., 2003.). Tem-se postulado a gastroproteção exercida pelo peptídeo grelina nesse modelo de ulceração pela liberação endógena de óxido nítrico (SIBILIA et al., 2003; BRZOZOWSKI et al., 2004).

Nesta perspectiva foi avaliado se o EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* protegem a mucosa de lesões induzidas pela administração oral de etanol absoluto. Com base nos resultados foi observado que o EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs*, reduziram significativamente as lesões gástricas no modelo de úlcera por etanol.

Esses resultados corroboram com os encontrados por Vera-Arzave et al., (2012), que utilizando o diterpeno suaveolol obtido do extrato hexânico de *Hyptis suaveolens*, verificaram sua gastroproteção no modelo de úlceras induzidas por etanol absoluto.

Portanto, o efeito farmacológico do EEtOH-*Hs* e da FaHex-*Hs* pode estar relacionado aos fatores como estimulação dos sistemas antioxidantes e a consequente diminuição da peroxidação lipídica, proteção contra os danos ao DNA, aumento da produção de óxido nítrico com restabelecimento do fluxo sanguíneo local, aumento da produção de prostaglandinas, assim como elevação do muco e bicarbonato (TAKAYAMA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010).

A etapa seguinte deste trabalho foi investigar se as amostras vegetais promoviam proteção gástrica frente às lesões ulcerativas induzidas por anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e pelo estresse.

A úlcera gástrica induzida por anti-inflamatórios não esteroidais/AINES é um processo multifatorial que ocorre tanto em função de efeitos locais quanto sistêmicos. A ação local na mucosa gástrica inicia-se pelo rompimento da barreira celular epitelial gástrica (TOMISATO et al., 2004). Os AINES ao se associarem quimicamente aos fosfolipídeos presentes na superfície da mucosa gastrintestinal acarretam diminuição da sua hidrofobicidade, danificando suas propriedades hidrofóbicas (DARLING et al., 2004; LICHTENBERGER et al., 2006), ocasionam a ruptura da membrana de fosfolipídeos, promovendo modificações na sua permeabilidade, fluidez, espessura e formação de poros. Isto leva ao aumento da exposição ao ácido, em decorrência da retrodifusão dos íons H^+ , ocasionando morte celular por apoptose e necrose com o desenvolvimento das úlceras gástricas (LICHTENBERGER et al., 2006).

Os AINES, em nível sistêmico, promovem depleção das prostaglandinas da mucosa gástrica pela inibição da enzima ciclooxigenase, distúrbios microcirculatórios com redução do fluxo sanguíneo, hipermotilidade gástrica, irritação tópica e interferência no reparo tecidual (FILARETOVA et al., 2002).

Neste modelo ocorre aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos com participação das espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento da patogenia (JAINU; DEVI, 2006), aumento na peroxidação lipídica, depleção nos níveis de glutathione e inativação da peroxidase gástrica. As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) geradas na mucosa, dentre elas o H_2O_2 podem agir como segundos mensageiros intracelulares promovendo ativação do Fator Nuclear κB (NF κB) com consequente produção do Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e com aumento da infiltração de leucócitos polimorfonucleares (CHATTOPADHYAY et al., 2006).

As ulcerações gástricas produzidas pela utilização de anti-inflamatórios não esteroidais assumem grande relevância epidemiológica sendo os AINES atualmente considerados um dos principais agentes etiológicos da úlcera péptica (SUNG et al., 2009).

Para isso, avaliou-se o EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* por meio do modelo de úlceras induzidas por anti-inflamatórios não esteroidais e observou-se que as

amostras vegetais reduziram significativamente as lesões gástricas, sugerindo a atividade farmacológica relacionada aos mecanismos citoprotetores.

Constituintes químicos de *H. suaveolens* têm sido reportados na literatura como detentores de propriedades anti-inflamatórias, como a exemplo dos diterpenos suaveolol e metil suaveolato (GRASSI et al., 2006; VERA-ARZAVE et al., 2012) e efeito antinociceptivo do seu extrato aquoso (SANTOS et al., 2007).

Substâncias com propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas são, em geral, ulcerogênicas (MEJIA; KRAFT, 2009; SIMMONS et al., 2004), entretanto, esses efeitos deletérios não foram observados quando se utilizou *Hyptis suaveolens*. Os resultados obtidos, neste trabalho, indicam, que a apesar de exercer efeito anti-inflamatório, já descrito na literatura, *H. suaveolens* apresentou efeito gastroprotetor no modelo de indução por piroxicam. Resultados semelhantes foram encontrados por Gomes et al., (2009) em seus estudos utilizando a fração butanólica de *Vochysia tucanorum* na gastroproteção.

No modelo de indução de úlceras por estresse por imobilização e frio, o EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* reduziram significativamente as lesões gástricas. Ulcerações provocadas pelo estresse são geralmente difusas na mucosa gástrica e podem também acometer o esôfago e o intestino. São geralmente ocasionadas por eventos estressantes como choque, sepse, traumas e queimaduras (JIA et al., 2007).

Nesse modelo, a diminuição da temperatura corporal ativa o sistema termogênico do cérebro, resultando na liberação do hormônio liberador de tireotrofina (TRH), que libera o hormônio estimulante da tireoide (TSH), via nervo vago, aumentando a secreção ácida gástrica (TANAKA et al., 2007).

A ulcerogênese desencadeada pelo estresse hipotérmico, envolve o aumento da secreção ácida gástrica e redução da produção de muco mediada pela liberação de histamina (HIRUMA-LIMA et al., 2006), além de promover o decréscimo do fluxo sanguíneo mucosal, na síntese de prostaglandinas, bem como o aumento da motilidade gástrica e da degranulação de mastócitos (RAO et al., 2004), com destaque para a participação das espécies reativas do oxigênio (KWIECIEN et al., 2002).

Sob condições isquêmicas, além da intensa geração de EROs, ocorre uma resposta inflamatória aguda da mucosa gástrica caracterizada pelo acúmulo de células e de vários mediadores inflamatórios, especialmente citocinas pró-

inflamatórias como o TNF- α , IL 1 β , e IL $_8$, que são importantes determinantes da lesão gástrica neste modelo (NISHIDA et al., 1997; LIU et al., 1998; HAMAGUCHI et al., 2001).

Nessa perspectiva, passou-se a investigar outros modelos cujos resultados corroborassem para aos resultados já obtidos.

Para isso, foi avaliado o Índice de Lesão Ulcerativo (ILU) e os parâmetros bioquímicos em animais tratados com o EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* na dose mais efetivas, (250 mg/kg), por meio do modelo de indução de úlceras por contensão do suco gástrico por ligadura do piloro.

A ulceração gástrica, neste modelo, é consequência da autodigestão da mucosa gástrica e quebra da barreira mucosal gástrica (SAIRAM et al., 2003; JAISWAL et al., 2011). Segundo Andreo et al. (2006), a contensão do suco gástrico induz o aparecimento das lesões em razão da hipersecreção gástrica, que pode ser decorrente da ativação do reflexo vago-vagal durante a cirurgia. Além disso, também ocorre migração neutrofílica, sugerindo a participação dessas células na ulcerogênese, provavelmente em decorrência da liberação de radicais livres.

O EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, inibiram o ILU por contensão do suco gástrico, resultando em atividade gastroprotetora.

Em razão da administração das amostras vegetais terem sido realizadas por via intraduodenal, pode-se afirmar que o efeito observado foi devido à ação sistêmica, visto que não houve contato do extrato ou fase com a mucosa gástrica, o que poderia sustentar a possibilidade de ocorrência de um efeito local, além de oferecer a vantagem de não haver interferências na farmacocinética da absorção. Buscando avaliar mais especificamente a atividade gastroprotetora das amostras vegetais em modelos de ulcerogênese que envolve a participação de radicais livres, realizou-se o ensaio de indução de úlceras gástricas por isquemia-reperfusão.

No modelo de úlcera por isquemia-reperfusão, as lesões gástricas ocorrem pela ação deletéria dos radicais livres gerados pela ativação de leucócitos polimorfonucleares (WADA et al., 1996), ocorrendo decréscimo na produção de NO nas células endoteliais na mucosa gástrica (PAWLIK et al., 2001).

Com base na relevância da atividade gastroprotetora do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, passou-se a investigar se as amostras vegetais estimulavam o processo de cicatrização da úlcera no modelo de indução por ácido acético.

A úlcera por ácido acético é um importante método para o estudo de drogas antiúlceras, por assemelhar-se macro e microscopicamente a úlcera péptica humana. O processo de recuperação, nesse modelo, consiste de proliferação do tecido conectivo da base da úlcera e regeneração do epitélio mucosal da borda da lesão. Portanto, a inibição da lesão é promovida por agentes terapêuticos que estimulam a epitelização ou granulação do tecido estomacal, acelerando o processo de reparo (OKABE; AGAMASE, 2005).

Segundo Tarnawski (2005), a cicatrização da úlcera é um processo geneticamente programado que inclui inflamação, proliferação celular, reepitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese e remodelação tecidual.

Tanto o EEtOH-*Hs* quanto a FaHex-*Hs* demonstraram ser capazes de acelerar o processo de cicatrização da úlcera em ratos, uma vez que reduziram significativamente a ALU.

O EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* não promoveram alterações na contagem de mastócitos entre os grupos durante a realização das análises histológicas nesse modelo, sugerindo que estas células não estão envolvidas na atividade cicatrizante das amostras vegetais. Vasconcelos et al., (2008) relataram o importante papel dos mastócitos na cicatrização das ulcerações gástricas pelo ácido acético e embora o exato mecanismo de atuação destas células não esteja completamente elucidado, existem indícios de sua participação na proteção contra as infecções na submucosa. De acordo com Hampton e Hale (2011), a histamina pode ser necessária para a apropriada cicatrização da úlcera, agindo via receptor H_1 , visto que bloqueadores de receptores H_2 são largamente prescritos e reconhecidamente úteis na redução da acidez gástrica.

Nos animais do grupo controle, que receberam lansoprazol, foi verificado um incremento da cicatrização na úlcera induzida por ácido acético e considerando que a bomba de prótons está irreversivelmente bloqueada, a ação da histamina liberada pelos mastócitos estaria atuando preferencialmente nos receptores do subtipo H_1 .

Shenoy, et al., (2009) demonstraram que o extrato éter de petróleo obtido das folhas de *H. suaveolens* na dose de 500 mg/kg (v.o), após o tratamento de 10 dias, promoveu a cura de feridas em ratos. Os estudos histológicos obtidos demonstraram aumento significativo na deposição de colágeno, poucos macrófagos e edema tecidual e aumento de fibroblastos.

Assim, sugere-se que *Hyptis suaveolens* possa atuar em nível da estimulação da resposta inflamatória benéfica ao processo de reparo celular, recrutando células para o local da úlcera, tais como os neutrófilos, os quais promovem proteção local contra agentes bacterianos (VASCONCELOS et al., 2008).

Existem evidências na literatura de que os antioxidantes endógenos de baixo peso molecular como a glutathione, desempenham um importante papel no processo de cicatrização de feridas (SHAFER ; WERNER, 2008). Segundo Roy et al., (2006), pequenas quantidades de EROs como o peróxido de hidrogênio, são benéficas ao organismo e importantes para o processo de angiogênese.

Na sequência, foram avaliados o consumo de água e ração, peso ponderal, peso relativo dos órgãos e avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, servindo como indicadores de possíveis sinais de toxicidade após 14 dias de tratamento com as amostras vegetais (CALVO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2008).

Foi observada redução significativa no consumo de ração no grupo de animais que recebeu lansoprazol durante 14 dias. Este resultado encontra respaldo na literatura, conforme descrito por Hongo et al., (1992) e Kovacs et al., (2009) que verificaram o aparecimento de anorexia em seus estudos utilizando este agente terapêutico.

Com relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados, não foi constatada nenhuma alteração significativa, o que se pode inferir que a espécie *Hyptis suaveolens* apresenta baixa toxicidade.

A bactéria *Helicobacter pylori* assume grande importância epidemiológica no desenvolvimento das doenças gastrintestinais como as gastrites crônicas e úlceras pépticas, sendo considerado o principal fator etiológico para a ocorrência do câncer gástrico (FUNATOGAWA et al., 2004).

Segundo Ruggiero et al. (2006), a antibioticoterapia atual para erradicar o *H. pylori* são efetivas, mas podem falhar em decorrência da resistência bacteriana ou

complicações nos pacientes. Desta forma, existe um esforço contínuo para desenvolver novas drogas no combate deste patógeno, sendo que muitos extratos e/ou substâncias derivadas de plantas tem sido investigadas para essa finalidade, conforme pode ser constatado nos trabalhos de Funatogawa et al. (2004) e Jesus et al. (2012).

Para avaliar o potencial antimicrobiano do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* frente à bactéria *H. pylori*, foi realizado o ensaio de difusão em ágar e verificou-se que o EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, nas concentrações utilizadas, não inibiram o crescimento bacteriano do *Helicobacter pylori* no meio de cultura, portanto, a atividade gastroprotetora de *H. suaveolens* parece não estar relacionada com suas propriedades antimicrobianas, nas condições avaliadas.

Diante desses resultados, tornou-se necessário compreender os mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* e para isso foram realizados protocolos experimentais que avaliassem a atividade antissecretória ácida, participação do muco, grupamentos sulfidrilas, NO e prostaglandinas.

Verificou-se que no modelo de contensão do suco gástrico por ligadura do piloro, o tratamento dos animais com EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) não alterou os parâmetros do suco gástrico, tais como volume, pH e concentração de H^+ , sugerindo assim, que o efeito gastroprotetor observado não é decorrente de mecanismos antissecretórios.

Foi investigado se o EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) de *H. suaveolens* promoviam a gastroproteção por interferir nos níveis de muco gástrico. O muco constitui a primeira linha de defesa contra o ácido e serve como uma barreira para a autodigestão do estômago (ALLEN; FLEMSTRÖN, 2005). O muco, juntamente com o bicarbonato secretado pelas células epiteliais da mucosa gástrica formam uma película protetora contra a ação deletéria dos íons H^+ que podem se retrodifundir para a mucosa a partir do lúmen gástrico (SIMMONS et al., 2004).

A secreção de muco é estimulada pelas prostaglandinas, agentes colinérgicos e por hormônios gastrintestinais tais como a gastrina e secretina (MONTROSE et al., 2006). Também atua como antioxidante, sequestrando os

radicais livres formados na superfície da célula epitelial estomacal (PENISSE; PIEZZI, 1999). Agentes ulcerogênicos como os AINES e sais biliares são capazes de dissipar o muco e a parede de fosfolípidos da superfície das células na mucosa gástrica, ocasionando a retrodifusão de íons H^+ e lesão gástrica (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005; DARLING; ROMERO; DIAL, 2004).

Os resultados demonstraram que o EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* não promoveram alterações significativas nos níveis do muco aderido à parede gástrica, indicando que a gastroproteção promovida por *H. suaveolens*, aparentemente não está relacionada ao aumento nos níveis de muco gástrico.

Os compostos sulfidrilas não proteicos (CSNP), são constituídos principalmente pela glutathione reduzida (GSH), além de cisteína e coenzima A (SZABO, et al., 2007) e representam os principais neutralizadores de radicais livres do organismo (HUBER; ALMEIDA, 2008). São importantes componentes do muco gástrico e exercem gastroproteção por manter a integridade da barreira mucosal, ligando-se aos radicais livres formados em decorrência da ação de agentes nocivos como o etanol (GOMES et al., 2009).

O aumento nos danos à mucosa gástrica ocasionado pelo agente lesivo etanol é acompanhado pela redução dos CSNP, em decorrência da ligação destes aos radicais livres potencialmente lesivos, além de estar envolvidos na estabilização do muco, visto que os CSNP formam pontes de dissulfeto com as glicoproteínas do muco (FERREIRA et al., 2008).

Para avaliar a participação dos compostos sulfidrilas na gastroproteção mediada por *H. suaveolens*, utilizou-se a indução de úlcera por etanol e foi observado a inibição significativa da ALU nos animais tratados com EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs*. Entretanto, quando foram avaliados os grupos pré-tratados com NEM (bloqueador de grupamentos sulfidrilas) e tratados com EEtOH-*Hs*, FaHex-*Hs*, observou-se uma exacerbação significativa da ALU.

Assim sugere-se que existe participação dos compostos sulfidrilas na gastroproteção mediada pelos EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*. Esse resultado aponta para a hipótese de que o EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* promovem gastroproteção em decorrência de sua ação antioxidante.

Em recente estudo conduzido por Vera-Arzave et al., (2012), utilizando o modelo de indução de úlceras por etanol e grupos pré-tratados com NEM e posteriormente tratados com o diterpeno suaveolol obtido de *H. suaveolens*, mostraram a participação dos compostos sulfidrilas na gastroproteção mediada por essa substância, o que corrobora com os dados obtidos neste estudo.

A seguinte, desta pesquisa, foi avaliar a participação do óxido nítrico na citoproteção produzida pela espécie vegetal.

O NO é sintetizado por uma família de enzimas denominadas sintases de óxido nítrico (NOS), que catalisam a oxidação de um nitrogênio guanidínico da L-arginina para formar óxido nítrico e citrulina. As NOS constitutivas estão presentes nas células endoteliais (NOS₃) e células do tecido nervoso (NOS₁) e a NOS induzível (NOS₂), está presente nos leucócitos polimorfonucleares e produz grandes quantidades de óxido nítrico (PACHER, BECKMAN; LIAUDET, 2007; NAGESWARARAO et al., 2011).

Tanto células nervosas, quanto endoteliais vasculares da mucosa gástrica expressam NOS constitutiva e promovem a síntese de NO, cujas principais funções estão relacionadas à inibição da secreção ácida gástrica, vasodilatação, estimulação da secreção de bicarbonato, hiperemia, citoproteção adaptativa, proteção gástrica e crescimento mucosal, exercendo assim uma ação gastroprotetora (SATYANARAYANA, 2006; TANAKA et al., 2001; WEST et al., 2003).

Para avaliar a participação do óxido nítrico no mecanismo de gastroproteção mediada pelo EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) foi realizado o modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), uma droga que bloqueia a síntese do NO. Dessa forma, foi observado que o EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* (250 mg/kg) não promoveram diferenças na redução da lesão nos grupos pré-tratados com L-NAME, indicando que o óxido nítrico parece não estar envolvido na gastroproteção mediada pelo EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* nas condições desse ensaio.

Para corroborar com os resultados encontrados, foram analisados alguns parâmetros do sistema antioxidante endógenos: Lipoperoxidação (LPO) e determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) e foi constatado que

tanto o EEtOH-*Hs*, quanto a FaHex-*Hs* promoveram inibição da lipoperoxidação e aumento da atividade da SOD na mucosa gástrica, reforçando os achados de que o mecanismo de ação antioxidante seja determinante para o efeito gastroprotetor ora evidenciado para as amostras vegetais.

Resultados semelhantes foram obtidos por Faria et al., (2012) quando investigaram as propriedades antioxidantes de *Rizophora mangle* utilizando o modelo de isquemia–reperfusão e verificando os níveis de peroxidação lipídica e determinação da atividade de enzimas antioxidantes na mucosa gástrica.

Diante de todos os resultados obtidos, sugere-se a validação do uso popular de *Hyptis suaveolens* no tratamento das úlceras pépticas, pois tanto o EEtOH-*Hs*, quanto a FaHex-*Hs* apresentaram atividade antiulcerogênica promissora e ausência de sinais de toxicidade aguda ou após o tratamento por 14 dias consecutivos, nas condições deste estudo.

6 CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos, neste trabalho de avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico e fase hexânica de *Hyptis suaveolens*, foi possível concluir que:

- FaHex-*Hs*, FaDCM-*Hs* e FaAE-*Hs* apresentaram atividade gastroprotetora frente às lesões gástricas induzidas pelo agente lesivo HCl/etanol; sendo que a FaHex-*Hs* foi a mais efetiva das fases testadas;
- O EEtOH-*Hs* e a FaHex-*Hs* não apresentaram toxicidade aguda nas doses avaliadas;
- O EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, nas doses avaliadas, apresentaram atividade gastroprotetora frente aos agentes clássicos de indução de úlceras gástricas;
- O EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* apresentaram efeito cicatrizante;
- EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* apresentam baixa toxicidade em animais tratados por 14 dias;
- A atividade gastroprotetora do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* não está relacionada a mecanismos antissecretores de HCl;
- A atividade gastroprotetora do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* não envolve a participação de muco;
- A atividade citoprotetora do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* envolve a participação dos compostos sulfidríla;
- O EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs*, não inibiram o crescimento da bactéria *Helicobacter pylori* por meio do método de difusão em disco;
- A gastroproteção do EEtOH-*Hs* e FaHex-*Hs* envolve mecanismos citoprotetores e antioxidantes.

REFERÊNCIAS

ABDEL SALAM, O.M.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **The Journal of Physiology Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 105-127, 2001.

AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K.; OKABE, S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacological Therapy**, v. 98, n.1, p. 109-127, 2003.

ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal Physiological cell physiology**, v. 288, p. 1-19, 2005.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANAS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

AKAOGI, J.; YAMADA, H.; KURODA, Y.; NACIONALES, D.C.; REEVES, W.H.; SATOH, M. Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristine-treated mice and modulate TNF α and IL-6 production. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 227- 236, 2004.

ANDREO, M.A.; BALLESTEROS, K.V.R.; HIRUMA-LIMA, C.A.; ROCHA, L.R.M.; SOUZA BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3-4, p. 431-441, 2006.

ANDREOLI, T.E. Free radicals and oxidative stress. **American Jornal of Medicine**, v. 108, p. 650-651, 2000.

ARUOMA, O.I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 675- 705, 1995.

ARROYO, J.; ALMORA, Y.; QUINO, M.; MARTINEZ, J.; CONDORHUAMÁN, M. F.; BONILLA, P. Efecto citoprotector y antisecretores del aceite de *Copaifera officinalis* em lesiones gástricas enduzidas em ratas. **An. Fac. Med.**, v. 70, n. 02, p. 89-96, 2009.

ATTAWISH, A.; CHIVAPAT, S.; CHAVALITTUMRONG, P.; PHADUNGPAT, S.; BANSIDDHI, J.; CHAORAI, B. Chronic toxicity study of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in rats. **Songklanakarin Journal Science and Technology**, v. 27, n. 5, p. 1027-1036, 2005.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A.S.; DuBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 61, p. 105-124, 2000.

AYHIRO, K.; SHIRASAKA, D.; TAGASHIRA, M.; WADA, A.; MORINAGA, N.; KURODA, F.; CHOI, O.; INOUE, M.; AOYAMA, N.; IKEDA, M.; HIRAYAMA, T.; MOSS, J.; NODA, M. Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* Vac A toxin. **Helicobacter**, v. 10, p. 231-239, 2005.

AZEVEDO, N.R.; CAMPOS, I.F.P.; FERREIRA, H.D.; PORTES, T.A.; SANTOS, S. C. SERAPHIN, J.C.; PAULA, J.R.; FERRI, P.H. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 733-736, 2001.

AZEVEDO, N.R.; CAMPOS, I.F.P.; FERREIRA, H.D.; PORTES, T.A.; SERAPHIN, J.C.; PAULA, J.R.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 205-216, 2002.

BACKERT, S.; NAUMANN, M. What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 479-486, 2010.

BALESTIERI, F.M.P. *Imunologia*. 1. ed. Manole. 2006. 799 p.

BALTRONS, M.A.; PEDRAZA, C.; SÁRDON, T.; NAVARRA, M.; GARCIA, A. Regulation NO dependent cyclic GMP formation by inflammatory agents in neural cells. **Toxicology Letters**, v. 139, p. 191-198, 2003.

BORRELLI, F. IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytoterapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BASÍLIO, I.J.L.D.; AGRA, M.F.; ROCHA, E.A.; LEAL, C.K.A.; ABRANTES, H.F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518-525. 2006.

BAUER, A.W.; PERRY, M.B.; KIRBY, W.M.M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BOTTING, R.M. Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208-219, 2006.

BOU-ABBOUD, C.F.; WAYLAND, H.; PAULSEN, G.; GUTH, P.H. Microcirculatory stasis precedes tissue necrosis in ethanol- induced gastric mucosal injury in the rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 33, n. 7, p. 872- 877, 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas medicinais e fitoterápicos. **BRASÍLIA**: Ministério da Saúde.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; KWIECIEN, S.; DROZDOWICZ, D.; BIELANSKI, W.; PJADO, R.; PTAK, A.; NIKIFORUK, A.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress- induced gastric damage. **Regulatory Peptides**, v. 120, n. 1-3, p. 39-51, 2004.

BRZOZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, S.J.; KORBUT, R.; KRZYSIEK-MACZKA, G.; KWIECIEN, S.; OLSZANECKI, R.; PJADO, R.; PTAK-BELOWSKA, A.; STRZALKA, M.; PAWLIK, W.W. Novel concept in the mechanism of injury and protection of gastric mucosa: role of rennin-angiotensin system and active metabolites of angiotensin. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, n.1, p. 55-62, 2012.

CALAM, J.; BARON, J.H. Patophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **British Medical Journal**, v. 323, p. 980-983, 2001.

CALDAS, G.F.R.; COSTA, I.M.A.; SILVA, J.B.R.; NÓBREGA, R.F.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M.; WANDERLEY, A.G. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 886-892, 2011.

CARVALHO, J.C.T. *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. 1. ed. Tecmedd. Ribeirão Preto-SP. 2004. 480 p.

CALVO, T.R.; LIMA, Z.P.; SILVA, J.S.; BALLESTEROS, K.V.; PELLIZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A.; TAMASHIRI, J.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; TAKAHIRA, R.K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosal during the healing process. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p. 451-459, 2007.

CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

CHATTOPHADHYAY, I.; BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; MAITY, P.; BANERJEE, R.K. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induced reactive oxygen mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 1397- 1408, 2006.

CHIOU, S. K.; TANIGAWA, T.; AKAHOSHI, T.; ABDELKARIM, B.; JONES, M.K.; TARNAWSKI, A.S. Survivin-a novel target for indomethacin-induced gastric injury. **Gastroenterology**, v. 128, p. 63-73, 2005.

CHUKWUJEKWU, J.C.; SMITH, P.; COOMBES, P.H.; MULHOLLAND, D.A.; VANSTADEN, J. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 295-297, 2005.

CONTI, B.; CANALE, A.; CIONI, P.L.; FLAMINI, G.; RIFICI, A. *Hyptis suaveolens* and *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against *Sitophilus granaries* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 219-228, 2011.

CRAVEIRO, A.C.S.; CARVALHO, D.M.M.; NUNES, R. S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, A.S.; TEIXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 739-743, 2008.

DARLING, R.L.; ROMERO, J.J.; DIAL, E. J.; AKUNDA, J.K.; LANGENBACK, R.; LICHTENBERGER, L.M. The effects of aspirin on the gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. **Gastroenterology**, v. 127, p.94-104, 2004.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO (DOU). Ministério da Saúde. Portaria 533 de 28 de março de 2012. ISSN 1677.7042.

EDEOGA H.O.; OMOSUN, G.; UCHE, L.C. Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigéria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 892-895, 2006.

FALCÃO, H.S. Mecanismos antiulcerogênicos das fases clorofórmica e acetato de etila obtidas das partes aéreas de *Praxelis clematidea* (GRISEB.) R. M. King & H. Robinson (Asteraceae). 2011, **Tese de doutorado** apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa -PB, 2011.

FARIA, F.M.; ALMEIDA, A.C.A.; FERREIRA, A.L.; TAKAYAMA, C.; DUNDER, R. J.; SILVA, M.A.; SALVADOR, M.J.; ABDELNUR, P.V.; EBRLIN, M.N.; VILEGAS, W.; TOMA, W.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Antioxidant action of mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. **The Cientific World Journal**, vol. 2012, p 1-9, 2012.

FERREIRA, A.L. **Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. Tese de mestrado. UNICAMP, Campinas-SP, 2005.

FERREIRA, M.P.; NISHIJIMA, C.M.; SEITO, L.N.; DOKKEDAL, A.L.; FERREIRA, M.L.; DI STASI, L.C.; VILEGAS, W. HIRUMA-LIMA, C.A. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 170-174, 2008.

FILARETOVA, L.; TANAKA. A.; MIYAZAWA, T.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-

induced gastric injury in rats. **American Journal Physiological Gastrointestinal Liver**, v. 283, p. G1082-G1089, 2002.

FILARETOVA, L.; PODVIGINA, T.; BAGAEVA, T.; BOBRY SHEV, P.; TAKEUCHI, K. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 104, p. 195-201, 2007.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1 p. 99-105, 1998.

FOCK, K.M.; ANG, T.L. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, p. 479-486, 2010.

FUNATOGAWA, K.; HAYASHI, S.; SHINOMURA, H.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H.; HIRAI, Y. Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 251-261, 2004.

FRY, C. Secretions of the salivary glands and stomach. **Basic Science**, v. 27, p. 503-506, 2009.

GAVANI, U.; PAARAKH, P.M. Antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* Poit. **International Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 227-229, 2008.

GEIBEL, J.P. Role of potassium in acid secretion. **World journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 34, p. 5259-5265, 2005.

GILIANI, H.; RAHMAN, A.U. Trends in pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GLAVIN G.B.; SZABO S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB Journal**, v. 6, p. 825-831. 1992.

GOMES, R.C.; BONAMIN, F.; DARIN, D.D.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C.; DOKKEDAL, A.L.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M.; HIRUMA-LIMA, C.A. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 466-471, 2009.

GOO, T.; AKIBA, Y.; KAUNITZ, J.D. Mechanisms of intragastric pH sensing. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, p. 465-470, 2010.

GRASSI, P.; URIAS-REYES, T.S.; SOSA, S.; TUBARO, A.; HOFER, O.; ZITTERL-EGLSEER, K. Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, p. 165-170, 2006.

GROENEM, M.J.M.; KUIPERS, E. J.; HANSEN, B.E.; OUWENDDIJK, T.J.T. Incidence of duodenal ulcers and gastric ulcers in a Western population: Back to where it started. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 9, p. 604-608, 2009.

GUEDES, M.M. CARVALHO, A.C.S.; LIMA, A.F.; LIRA, S.R.S.; QUEIROZ, S.S.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Gastroprotective mechanisms of centipedic acid, a natural diterpene from *Egletes viscosa* Less. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1351- 1355, 2008.

HAMAGUCHI, M.; WATANABE, T.; HIGUCHI, K.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; ARAKAWA, T. Mechanisms and roles of neutrophil infiltration in stress-induced gastric injury in rats. **Digestive Disease and Sciences**, v. 46, p. 2708-2715, 2001.

HAMPTON, D.D.; HALE, L.P. Mast cells are critical for protection against peptic ulcers induced by the NSAID piroxicam. **Plosone**, v. 6, n. 8, p. 1-8, 2011.

HATA, A.N.; BREYER, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 103, p. 147-166, 2004.

HENKEL, R.R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 43-52, 2011.

HIRUMA-LIMA, C.A.; SANTOS, L.C.; PELLIZZON, C.H.; SILVEIRA, G.G.; VASCONCELOS, P.C.P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M. *Qualea grandiflora*, a brazilian "Cerrado" medicinal plant presentes an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 207-214, 2006.

HONGO, M.; OHARA, S.; HIRASAWA, Y.; ABE, S.; ASAKI, S.; TOYOTA, T. Effect of lansoprazole on intragastric pH comparison between morning and evening dosing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 37, p. 882-890, 1992.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, P. 1170-1179, 2008.

ISOBE, T.; DOE, M.; MORIMOTO, Y.; NAGATA, K.; OHSAKI, A. The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1039-1041, 2006.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J. R.; BHOSALE, S.M. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.

JAINU, M.; DEVI, C.S.S. Gastroprotective action of *Cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. **Chemico-biological Interactions**, v. 161, p. 262-270, 2006.

JAISWAL, S.K.; RAO, C.V.; SHARMA, B.; MISHA, P. DAS, S.; DUBEY, M.K. Gastroprotective effects of standardized leaf extract from *Argyrea speciosa* on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 341-344, 2011.

JESUS, N.Z.T. Levantamento etnobotânico e triagem antiúlcera e antiedematogênica de plantas medicinais do Distrito de Pirizal-MT: Avaliação da atividade antiúlcera do extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. Cuiabá. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Mato Grosso. 2007.

JESUS, N.Z.T.; LIMA, J.C.S; ESPINOSA, M.M.; SILVA, R.M.; MARTINS, D.T.O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 130-139, 2009.

JESUS, N.Z.T.; FALCÃO, H.S.; GOMES, I.F.; LEITE, T.J.A.; LIMA, G.R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; TAVARES, JF.; SILVA, M.S.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BATISTA, L.M. Tannins, peptic ulcer and related mechanisms. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 3203-3228, 2012.

JIA, Y.T. WEI, W.; MA, B.; XU, Y.; LIU, W.J.; WANG, Y.; LVKAI, Y.; TANG, H.T.; WEI, D.; XIA, Z.F. Activation of p38 mapk by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 7808-7819, 2007.

JORDÃO-JÚNIOR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.M.; VANNUCCI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434- 449, 1998.

JOZEFEZAK, M.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J.; CUYPER, A. Glutathione is a key player in metal- induced oxidative stress defense. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 3145-3175, 2012.

KOMORI, M.; TSUJI, S.; SUN, W.; TSUJII, M.; KAWAI, N.; YASUMARU, M.; KAKIUCHI, Y.; KIMURA, A.; SASAKI, Y.; HIGASHIYAMA, S.; KAWANO, S.; HIRI, M. Gastrin enhances gastric mucosal integrity through cyclooxygenase 2 up regulation in rats. American journal **Physiological Gastrointestinal Liver**, v. 283, p. G1368-G1378, 2002.

KOHN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.

KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KANIA, J.; KONTUREK, S.J.; HAHN, E.G. Nitric oxide releasing aspirin protects gastric mucosal against ethanol damage in rats with functional ablation of sensory nerves. **Inflammation Research**, v. 52, p. 359-365, 2003.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, J.W. PAWLIK, W.W. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; nobel prize for achievements in gastrology during last century. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 507-530, 2005.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 5-31, 2005.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃ secretion: the role of brain- gut axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, p. 15-27, 2004.

KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; WALTER, B.; BURNAT, G.; HESS, T.; HAHN, E.G.; KONTUREK, S.J. Gherlin induced gastroprotective against ischemia reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, v. 536, n. 12, p.171-181, 2006.

KOVACS, T.O.; FRESTON, J.W.; HABER, M.M.; HUNT, B.; ATKINSON, S.; PEURA, D.A. Long-term efficacy of lansoprazole in preventing relapse of erosive reflux esophagitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, p. 1693-1701, 2009.

KWIECIENT, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.H.; KONTUREK, S.J. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 761-773, 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Reviews in basis and clinical gastroenterology: gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41-60, 2008.

LAKSHMI , V.; SINGH, N.; SHRIVASTVA, S.; MISHRA, S.K.; DHARMANI, P.; MISHRA, V.; PALIT, G. Gedunin and photogedunin of *Xylocarpus granatum* show significant anti- secretory effects and protect the gastric mucosa of peptic ulcer in rats. **Phytomedicine**, v. 17, p. 569-574, 2010.

LANDIS, G.N.;TOWER, J. Superoxide dismutase evolution on life span regulation. **Mechanisms of ageing and development**, v.126, p.365-379, 2005.

LAPA, A.J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C. M. O. (Ed). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 181-196, 1999.

LAPA, A.J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LIMA, T.C.M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Salvador. Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE). 74p, 2001.

LEMO, M.; SANTIN, J.R.; KLEIN, L.C.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F. Gastroprotective activity of hidroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleraceae* var. *Acephala* DC in different animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 503-507, 2011.

LEVINE, R.J. A method for rapid production of stress ulcer in rats. In: Pfeiffer, C.J. (Ed), **Peptic ulcer**. **Munksgaard**, Copenhagen, p. 92-97, 1971.

LICHTENBERGER, L.M.; ZHOU, Y.; DIAL, E.J.; RAPHAEL, R.M. NSAID injury to the gastrointestinal tract evidence that NSAIDs interact with phospholipids to weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p.1421-1428, 2006.

LIMA, G.R.M. Atividade gastroprotetora de *Combretum duarteanum* Cambess (Combretaceae) em modelos animais. 2011. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa- PB, 2011.

LIMA, I.O. Avaliação farmacológica do extrato metanólico bruto e da fase n-butanólica obtida da espécie *Herissantia crispa* (L.) Brizicky em modelos animais frente à atividade antiulcerogênica. 2008. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa-PB, 2008.

LIU, W.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; HARADA, N.; SOBEH, I.; IRIE, T. Role of neutrophil elastase in stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 132, p. 432-439, 1998.

LIU, W.; CRAWFORD, J.M. O trato gastrointestinal. IN: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran. Patologia- Bases Patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 17, p. 851-857, 2005.

LUTHER, J.; HIGGINS, P.D.R.; SCHOENFELD, P.S. ; VAKIL, N. ; CHEY, W.D. Empiric quadruple vs. triple therapy for primary treatment of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of efficacy and tolerability. **The American Journal of Gastroenterology**, v.105, p. 65-73, 2010.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAIA, S.S.S.; PINTO, J.E.B.P.; SILVA, F.N.; OLIVEIRA, C. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 327-331, 2008.

MANCHAND, P.S. Structures of suaveolic acid and suaveolol. **Journal of Organic Chemistry**, v.39, n. 15, p. 2306- 2308, 1974.

MANDAL S.M.; MONDAL, K.C.; DEY, S.; PATI, P.R. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 4, p. 568-569. 2007.

MARLIÉRE, L.D.P.; RIBEIRO, A.Q.; BRANDÃO, M.G.L.; KLEIN, C.H.; ACURCIO, F.A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 754-760, 2008.

MARTINS, F.T.; SANTOS, M.H.S; POLO, M. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit sob condições de cultivo. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1203-1209, 2006.

MATES J.M.; PEREZ-GOMEZ C.; DE CASTRO.I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v.32, p. 595-603, 1999.

MATOS, F.J.A.; AGUIAR, L.M.B.A.; SILVA, M.G.V. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, fortaleza, 128p, 1988.

MATSUDA; H.; LI;Y.; YOSHIDA, M. Roles of capsaicin- sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesion in rats. **Life Science**, v.65, p. 27-32, 1999.

MAYER, B.; BAGGIO, A.C.H.; FREITAS, C.S.; SANTOS, A.C.; TWARDOWSCHY, A.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; MICKE, G.A.; HELLER, M.; SANTOS, E.P.; OTUKI, M.F.; MARQUES, M.C.A. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. **Fitoterapia**, v. 80, p. 421-426, 2009.

McCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, p. 652-659, 2000.

McNEIL, M.; FACEY, P.; PORTER, R. Essential oils the Hyptis genus- a review (1909-2009). **Natural product Communication**, v. 6. N. 11, p. 1775-1796, 2011.

MEJIA, A.; KRAFT, W.K. Acid peptic diseases: Pharmacological approach to treatment. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 295-314, 2009.

MISHRA, S.B.; VERMA, A.; MUKERJEE, A.; VIJAYAKUMAR, M. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n 9, p. 689-693, 2011.

MISRA, T.N.; SINGH, R.S.; OJHA, T.N.; UPADHYAY, J. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. Part I. Spectral and Biological studies on triterpene acid. **Journal of Natural products**, v. 44, n. 6, p. 735-738, 1981.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of poliamines on acidified ethanol induced gastric lesions in rats. **Japanese journal of pharmacology**, v. 33, p. 939-945, 1983.

MOFLEH, I.A.A. Spices, herbal xenobiotics and the stomach: friends or foes? **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 22, p. 2710- 2719, 2010.

MONTENEGRO, C.A. Atividade gastroprotetora de *Xylopiá langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) em modelos animais. 2011, **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa-PB, 2011.

MONTROSE, M.H.; YASUTADA, A.; TAKEUCHI, K. Gastroduodenal mucosal defense. In: Johnson L. R. Ed New York: Academic Press, p. 1259-1291, 2006.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAYUKI, T. Effects of new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesion and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. Japan. **Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.

MOTA, K.S.L. Avaliação da atividade antiulcerogênica de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae) em modelos animais. 2009, **Dissertação de mestrado**-Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2009.

MÓZSIC, G. Gastric cytoprotection 30 years after its discovery by André Robert: a personal perspective. **Inflammopharmacology**, v. 18, p. 209-221, 2010.

NAGESWARARAO, K.B.; LAKSHMI, K.; RAMAKRISHNA, R. Nitric oxide: A novel therapeutic target. **International Journal of Pharmaceutical Science and research**, v.2, n. 7, p. 1603-1615. 2011.

NANTITANON W.; CHOWWANAPHOONPOHN, S.; OKONOGLI, S. Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. **Scientia Pharmaceutica**, v. 75, p. 35-46, 2007.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; DE SOUZA, M.A.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. ; ESPINDOLA, F.S. Down modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plants extracts from the brazilian cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 37-41, 2005.

NERGARD, C.S.; DIALLO, D.; INNGJERDINDGEN, K.; MICHAELSEN, T.E.; MATSUMOTO, T.; KIJOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B.S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali anti ulcer, radical scavenging and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.

NGUYEN, T.; CHAI, J.; LI, A.; AKAHOSHI, T.; TANIGAWA, T.; TARNAWSKI, A.S. Novel roles of local Insulin-Like Growth Factor 1 activation in gastric ulcer healing: promotes actin polymerization, cell proliferation, re-epithelialization and induces COX-2 in PI3K- dependent manner. **The American Journal of Pathology**, v. 70, p. 1219-1228, 2007.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, I. Involvement of the xanthine- xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **Digestion**, v. 58, p. 340-351, 1997.

OATES, P.J.; HAKKIMAN, J.P. Studies on the mechanism of ethanol induced gastric ulcer damage in rats. **Gastroenterology**, v. 94, p. 10-21, 1988.

The organization of Economic Co-operation Development (OECD). The OECD Guideline for Testing of Chemical: 407 Repeated Dose Oral Toxicity- Rodent: 28 Day or 14 Day Study. **OECD**, Paris, p.1-7, 2001.

OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 132-139, 2003.

OKABE, S.; AGAMASE, K. An overview of acetic acid ulcer models : the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1321- 1341, 2005.

OSAWA, H. Ghrelin and Helicobacter pylori infection. **Word Journal of Gastroenterology**, v.14, n. 41, p. 6327-6333, 2008.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiology Research**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; CAMPOS, A.R.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion induced intestinal injury by oil resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 1979-1987, 2004.

PAN,J.S.; HE, S.Z.; XU, H.Z.; ZHAN, X.J.; YANG, X.N.; XIAO, H.M.; SHI, H.X.; REN, J.L. Oxidative estress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 38, p. 5857- 5867, 2008.

PASA, M.C.; SOARES, J.J.; GUARIM NETO, G. Estudo etnobotânico da comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 195-207, 2005.

PAWLIK, M.; PTAK, A.; PAJDO, R.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. 2001. Sensory nerves and calcitonin gene related peptide in the effectt of ischemic preconditioning on acute and chronic gastric lesions induced by ischaemia- reperfusion. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 52, n.4, p. 569-581, 2001.

PEERZADA, N. Chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Molecules**, v. 2, p. 165-168, 1997.

PENISSE, A.; PIEZZI, R. Effect of dehydroelucidine on mucus production. A quantitative study. **Digestion Disease Sciences**, v. 44, p. 708-712, 1999.

PRABHAT, K.D.; SABUJ, S.; RANJAN, S.; PRAVEEN, S.N.; SHWETA, N.; ANIRUDHA, J. Phytochemical and pharmacological investigation of the protective effect of plant *Hyptis suaveolens* against duodenal ulceration. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 1, n. 1, p. 82-87, 2009.

PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; PASÇA, R. TORRES, J. MÁRQUEZ, M.; HERRERO, E.; FILLAT, O.; ORTIZ, J.A. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam induced gastroduodenal lesions. **Arzeimittelforschung**, v. 47, p. 568-572, 1997.

QUIDEAU S, DEFFIEUX D, DOUAT-CASASSUS C, POYSÉGU L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew. Chem. Ind**, v. 50, p. 586-621, 2011.

RAFFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M.A.; MOSSA, J.S.; AGEEL, A.M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 25-34, 1990.

RAJPUT, R.; BOSE, U.; BARMA, M.; UDUPA, L.A.; BHAT, V.; RAO, N. Evaluation of *Hyptis suaveolens* for anti-oxidant property and reversal of dexamethasone suppression in dead space wound model. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 141-144, 2010.

RAO, C.V.; OJHA, S.K.; RADHAKRISHNAN, K.; GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; MEHROTRA, S. ; PUSHPANGADAN, P. Antiulcer activity of *Utleria salicifolia* rhizome extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 243-249, 2004.

REPETTO, M.G.; LLESSUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E.L.A. Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.1, n. 2, p. 80-87, 2003.

RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.R.; ANDRADE, G.M. SILVA, M.G.V.; ALBUQUERQUE, R.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of barbatusin and 3- beta- hydroxy-3 – deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol- induced gastric lesiona in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 725-730, 2010.

ROY, S.; KHANNA, S.; NALLU, K.; HUNT, T.K.; SEN, C.K. Dermal wound healing is subject to redox control. **Molecular Therapy**, v. 13, p.211-220, 2006.

RUGGIERO, P.; TOMBOLA, F.; ROSSI, G.; PANCOTTO, L.; LAURETTI, L.; DEL GIUDICE, G.; ZORATTI, M. Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2550-2552, 2006.

SAIRAM, K.; PRIYAMBADA, S.; ARYYA, N.C.; GOEL, R.K. Gastroduodenal ulcer protective activity of *Asparagus racemosus*: an experimental, biochemical and histological study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 1-10, 2003.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. Revista **Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 650-659, 2009.

SANTOS, T.C.; MARQUES, M.S.; MENEZES, I.A.C.; DIAS, K.S.; SILVA, A.B.L.; MELLO, I.C.M.; CARVALHO, A.C.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R.; MARCAL, R. M. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 333-336, 2007.

SANTOS, V.L. Avaliação da atividade antiulcerogênica, antidiarréica e antiespasmódica do extrato bruto e fase acetato de etila obtidos da entrecasca do caule *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae) em modelos animais. 2008, **Tese de doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa-PB, 2008.

SATYANARAYANA, M.N. Capsaicin and gastric ulcers. **Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 4, p. 276-328, 2006.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidants gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SCHUBERT, M.L. Stomach and duodenum. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, p. 527-528, 2009.

SCHUBERT, M.L. Stomach and duodenum. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, p. 534-535, 2011.

SIBILIA, V.; RINDI, G.; PAGANI, F.; RAPETTI, D.; LOCATELLI, V.; TORSSELLO, A.; CAMPANINI, N.; DEGHENGI, R.; NETTI, C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. **Endocrinology**, v. 144, p. 353-359, 2003.

SIKIRIC, P.; SEIWERTH, S.; GRABEREVIC, Z. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on L- nitro-arginine metylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. **European Journal of Pharmacology**, v. 332, p. 23-33, 1997.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M. ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas de plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 618- 626, 2008.

SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 387- 437, 2004.

SHAFFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p.165-171, 2008.

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUESTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHENOY, C.; PATIL, M.B.; KUMAR, R. Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L) Poit (Lamiaceae). **International Journal of PharmTech Research**, v.1, n. 3, p. 737-744.

SHIRWAIKAR, A.; SHENOY, R.; ADUPA, A.L.; SHETTY, S. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. **Indian Journal Expert Biological**, v. 41, n. 3, p. 238-241. 2003.

SOBUE, M.; JOH, T.; OSHIMA, T.; SUZUKI, H.; SENO, K.; KASUGAI, K.; NOMURA, T.; OHARA, H.; YOKOYAMA, Y.; ITOH, M. Contribution of capsaicin sensitive afferent nerves of rapid recovery from ethanol induced gastric epithelial damage in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, p. 1188-1195, 2003.

SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R.M.; TANAE, M.M.; TORRES, L.M.B. Inhibition of gastric secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 15, p. 462-469, 2008.

SOUZA BRITO, A.R.M. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Ciências Médicas. Campinas: Editora Unicamp, p. 15-22, 1994.

SUNG, J.J.Y.; KUIPERS, E.J.; EL-SERAG, H.B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 938-946, 2009.

SUMBUL, S.; AHMAD, M.A.; MOHD, A.; MOHOD, A. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: an review. **Journal of Pharmacy and Bioallied Science**, v. 3, n. 3, p. 361- 367, 2011.

SUZUKI, H.; MASSAOKA, T.; HIBI, T. Ghrelin- A novel appetite-stimulating hormone which also affects gastrointestinal functions. **The Korean Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 2, p. 82-88, 2006.

SUZUKI, H.; MATSUZAKI, J.; HIBI, T. Ghrelin and oxidative stress in gastrointestinal tract. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 2, p. 122-125, 2011.

SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TSUGAWA, H.; MOGAMI, S.; HIBI, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 35-39, 2012.

SZABO, S. Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional biochemical and histochemical studies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 22, p.21-28, 1987.

SZABO, S., DENG, S.; KHOMENKO,T.; CHEN, L.; TOLSTANOVA, G.; OSAPAY, K.; SANDOR, Z.;XIONG, X. New molecular mechanisms of duodenal ulceration. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1113, p. 238-255, 2007.

SZASZÁK, M.; CHRIDTISN, F.; ROSENTHAL, W.; KLUSSMANN, E. Compartmentalized cAMP signaling in regulated exocytic processes in non-neuronal cells. **Cellular Signalling**, v. 20, p. 590-601, 2008.

SZELENYI, I.; BRUNE, K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Disease and Sciences**, v. 33, 7, p. 865-877, 1988.

SZELENY I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Archives of Toxicology**, v. 41, p. 99-105, 1978.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 19, p. 418-426, 1969.

TAKEUCHI, K.; ARAKI, H.; UMEDA, M.; KOMOIKE, Y.; SUZUKI, K. Adaptive gastric protection is mediated by prostaglandin EP1 receptors: A study using rats and knockout mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 292, n. 3, p. 1160-1165, 2001.

TAKAYAMA, C.; FARIA, F.M.; ALMEIDA, A.C.A.; VALIM-ARAÚJO, D.A.O.; REHEN, C.S.; DUNDER, R.J.; SOCCA, E.A.R.; MANZO, L.P.; ROZZA, A.L.; SALVADOR, M.J.; PELLIZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A.; FERREIRA, A.L.; SOUZA- BRITO, A.R.M. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam.(Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 147- 155, 2011.

TANAKA, A.; MIZOGUCHI, H.; HASE, S.; MIYAZAWA, T.; TAKEUCHI, K. Intestinal protection by lafutidine, a histamine H2 receptor antagonist, against

indomethacin-induced damage in rats-role of endogenous nitric oxide. **Medical Science Monitor**, v. 7, n. 5, p. 869- 877, 2001.

TANAKA, A.; HATAZAWA, R.; TAKAHIRA, Y.; IZUMI, N.; FILARETOVA, L.; TAKEUCHI, K. Preconditioning stress prevents cold restraint stress-induced gastric lesions in rats: roles of COX₁, COX₂, and PLA₂. **Digestive Disease and Sciences**, v. 52, p. 478-487, 2007.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Disease and Science**, v. 50, p. 24-33, 2005.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing: state of the art. **Gastroenterologia Polska**, v. 17, n. 3, p.171-179, 2010.

TATEMACHI, M.; OGURA, T.; SAKURAZAWA, N. SUGITA, M.; ESUMI, H. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p.213-220, 2003.

TOMBOLA, F.; CAMPELLO, S.; DE LUCA, L.; RUGGIERO, P.; DEL GIUDICE, G.; PAPINI, E.; ZORATTI, M. Plant polyphenols inhibit Vac A, a toxin secreted y the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **FEBS Letters**, v. 543, p. 184-189, 2003.

TOMISATO, W.; TSUTSUMI, S.; HOSHINO, T. HWANG, H.J.; MIO, M.; TSUCHIYA, T.; MIZUSHIMA, T. Role of direct cytotoxic effects of NSAIDS in the induction of gastric lesions. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 575-585, 2004.

TRIPATHI, A.; SHARMA, N.; SHARMA, V. In vitro efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) essential oil on growth and morphogenesis of *Fusarium oxysporum*. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 503-512, 2009.

UCHIDA, M., MATSUEDA, K.; SHODA, R.; MURAOKA, A.; YAMATO, S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl –induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 133-138, 2001.

UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; OYAMADA, H.; TANIGAWA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 162, p. 55-58, 1989.

USTÜN, O.; OZÇELİK, B.; AKYÖN, Y.; ABBASOĞLU, U.; YESİLADA, E. Flavonoids with anti *Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 457-461, 2006.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress- induced cancer. **Chemical Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and

human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, P.C.P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.A.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R.K.; PELLIZZON, C.H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 293-301, 2008.

VASCONCELOS, P.C.P.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C.H. Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 146-153, 2010.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; MELO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 464-471, 2008.

VERA- ARZAVE, C.; ANTONIO, L.C.; ARRIETA, J.; CRUZ-HERNÁNDEZ, G.; VEÁSQUEZ-MÉNDEZ, A.M.; REYES-RAMIREZ, A.; SÁNCHEZ-MENDOZA, M.A. Gastroprotection of suaveolol, isolated from *Hyptis suaveolens*, against ethanol-induced gastric lesions in wistar rats: role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. **Molecules**, v. 17, p. 8917- 8927, 2012.

VIALA, J.; CHAPUT, C.; BONECA, I.G.; CARDONA, A.; GIRANDIN, S.E.; MORAN, A.P.; ATHMAN, R.; HUERRE, M.R.; COYLE, A.J.; DISTEFANO, P.; SANSONETTI, P.J.; LABIGNE, A.; BERTIN, J.; PHILPOTT, D.J.; FERRERO, R. L. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 1166-1174, 2004.

WADA, K.; KAMISAKI, Y.; KITANO, M.; KISHIMOTO, Y.; NAKAMOTO, K. ; ITOH, T. A new gastric model induced by ischaemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. **Life Science**, 59, p. 295-301, 1996.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest it self? **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WARNER, T.D.; MITCHELL, J.A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 790-804, 2004.

WALSH, J.H.; PETERSON, W.L. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 15, p. 984-991, 1995.

WEST, S.D.; HELMER, K.S.; CHANG, L.K.; CUI, Y.; GREELEY, G.H.; MERCER, D.W. Cholecystokinin secretagogue-induced gastroprotection: role of nitric oxide and blood flow. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and liver Physiology**, v. 294, p. 399-410, 2003.

WINTERBOURN, C.C.; HAWKINS, R.E.; BRIAN, M.; CARREL, R.W. The stimulation of red cell superoxide dismutase activity. **Jornal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.85, p. 337-341, 1975.

WULFF, R. Intrapopulational variation in the germination of seeds in *Hyptis suaveolens*. **Ecology**, v. 54, p. 646-649, 1973.

YUAN, Y.;PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, p. 80-89, 2006.

ZADÁK , Z.; HYSPLER, R.; TICHÁ, A.; HRONEK, M.; FIKROVÁ, P.; RATHOUSKÁ, J.; HRNCIARIKOVÁ, D. ; STETINA, R. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. **Physiology Research**, v.58, n. 1, p. S13-S17, 2009.

ZANNER, R.; HAPFELMEIER, G.; GRATZL, M.; PRINZ, C. Intracellular signal transduction during gastrin-induced histamine secretion in rat gastric ECL cells. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. 374-382, 2002.

ZAPATA-COLINDRES, J.C.; ZEPEDA-GOMEZ, S.; MONTANO-LOZA, A.; VAZQUEZ BALLESTEROS, E.; JESUS-VILLALOBOS, J.; VALDOVINOS-ANDRACA, F. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 4, p. 277-280, 2006.

ZHAO, C.M.; MARTINEZ, V.; PIQUERAS, L.; WANG, L.; TACHÉ, Y. CHEN, D. Control of gastric acid secretion in somatostatin receptor 2 deficient mice: shift from endocrine/paracrine to neurocrine pathways. **Endocrinology**, v.149, n. 2, p. 498-505, 2008.

ZIMMERNAM, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.