

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FERNANDA NEVES ESTRELA

ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE

Spiranthera odoratissima A. ST. HIL. (RUTACEAE)

Uberlândia

2016

FERNANDA NEVES ESTRELA

ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE

Spiranthera odoratissima **A. ST. HIL. (RUTACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Luiz Ferreira

Uberlândia

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

E82a
2016 Estrela, Fernanda Neves, 1991-
 Atividades antiulcerogênica e antimicrobiana da espécie *Spiranthera odoratissima* A. ST. HIL. (RUTACEAE) / Fernanda Neves Estrela. - 2016.
 91 f. : il.

 Orientador: Anderson Luiz Ferreira.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
 Inclui bibliografia.

 1. Ciências médicas - Teses. 2. Fisiopatologia - Teses. 3. Úlceras - Teses. 4. Plantas medicinais - Teses. I. Ferreira, Anderson Luiz. II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

FERNANDA NEVES ESTRELA

ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE

Spiranthera odoratissima **A. ST. HIL. (RUTACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde.

Aprovada em 24, de Junho de 2016.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Anderson Luiz Ferreira (orientador)

Universidade Federal de Goiás

Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Ricardo José Dunder

Coordenação de Vigilância Sanitária de São Paulo

Prof. Dr. Eduardo Augusto Rabelo Socca

Universidade Estadual de Campinas



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 019/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa: FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS E DOS AGRAVOS À SAÚDE

Projeto de vinculação: IMUNOPATOLOGIA DO TRATO DIGESTIVO

Discente: **FERNANDA NEVES ESTRELA** Matrícula nº 11412CSD008

Título do Trabalho: **"ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. "**

Às 09:00 horas do dia 24 de junho do ano de 2016, no anfiteatro do Bloco 2H - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Prof. Dr. Ricardo José Dunder (CONVISA), Prof. Dr. Eduardo Augusto Rabelo Socca (UNICAMP) e Prof. Dr. Anderson Luiz Ferreira (UFG/UFU) orientador da discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Anderson Luiz Ferreira apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata aprovada. Esta defesa Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 12:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

PROF. DR. ANDERSON LUIZ FERREIRA

PROF. DR. RICARDO JOSÉ DUNDER

PROF. DR. EDUARDO AUGUSTO RABELO SOCCA

Dedico a minha família por todo apoio e amor

AGRADECIMENTOS

Primeiramente á Deus, pelo dom da vida e por sempre abençoar, me dando forças a seguir o meu caminhar!

Ao meu orientador, não tenho palavras para expressar a sua importância na minha vida, pois no dia que me disse sim, quando ainda era aluna de graduação, se tornou a minha referência no mundo científico. Foi e sempre será exemplo de profissional e de ser humano, dizem que gratidão é a memória do coração, sempre serei eternamente grata sua dedicação, empenho, confiança. Nunca terei como compensar por toda ajuda que fez e faz.

Aos meus pais, que sempre fazem tudo que podem pra me ajudar, em especial á minha mãe, que nunca mediu esforços pra que eu e meus irmãos possamos ser pessoas de bem, estudando e ajudando o próximo. Meu irmão com toda sua inteligência, paciência e sarcasmo fundamental, estão sempre me ajudando, dando forças pra seguir. A minha irmã que com toda paciência e carinho sempre está me auxiliando e muitas vezes me acalentando! Amo vocês!

Ao Pedro Henrique, amor da minha vida e grande companheiro... Obrigada pelo amor, carinho e por me proporcionar muitos momentos felizes... E também obrigada pela paciência, dedicação, confiança, incentivo e amor.

Minha amiga, Maraisa, que sempre me ouvia e me ajuda nos momentos difíceis. Aos meus colegas de mestrado, Vanessa, que desde o primeiro dia trilhou junto comigo, dividindo as alegrias e dificuldades do mestrado, a Sabrina pelo companherismo, por cuidar tanto de mim, e todos que de forma direta ou indireta me ajudaram.

Aos colegas de laboratório de Farmacologia e Fisiologia- LAFIFA, em especial, a Keise que com sua calma e doçura, compartilhou comigo grande parte da pesquisa, ao Jaciel que com suas habilidades, sempre muito prestativo, a Marcela com sua dedicação e vontade de aprender.

Aos professores da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão que sempre me incentivam, em especial a professora Dra. Karla Graziella Moreira que tem sempre um tempo pra ajudar e me repassar seus conhecimentos. Aos laboratórios de química, botânica e histologia.

A banca que se disponibilizou a se deslocar para acrescentar na minha dissertação e aprendizado.

Ao programa de Pós- graduação em Ciências da Saúde como um todo que me acolheu e me possibilitou me tornar uma profissional melhor. A coordenação, à Viviane que sempre, me ajudou da melhor forma possível, a Gisele, muito solícita, sempre me ajudou muito, com toda educação e carinho.

A Capes, pelo apoio financeiro para minha formação científica e para o desenvolvimento desse projeto.

Muito Obrigada!

RESUMO

Spiranthera odoratissima A. ST. HIL. (RUTACEAE), conhecida como manacá, é uma planta medicinal localizada na região do Cerrado Brasileiro. É utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatório, ansiolítico e para o tratamento de doenças renais, hepáticas, reumatismo, dores de cabeça e de estômago. A Rutaceae apresenta-se amplamente distribuída pelo mundo, com cerca de 150 gêneros e 1700 espécies, no Brasil há cerca de 30 gêneros nativos e aproximadamente 192 espécies, sendo rica em metabólitos secundários e suas respectivas atividades farmacológicas e biológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial gastroprotetor do extrato etanólico das folhas da *S. odoratissima* (SOL) através de modelos de úlcera gástrica em ratos bem como sua atividade antimicrobiana e toxicidade aguda. A análise da ressonância magnética nuclear mostrou sinais característicos de hidrogênio para classes de terpenos, limonoides, esteroides, cumarinas, alcaloides. Foram realizados modelos experimentais de úlcera gástrica que, com base em suas respectivas especificações, foram incluídos dois grupos controles, sendo um positivo (Carbenoxolona 100 mg.kg⁻¹ ou Cimetidina 100 mg.kg⁻¹) e um negativo (Veículo – Tween 80® 12%, 10 mL.kg⁻¹). Após cada metodologia, foi realizado a eutanásia por overdose de CO₂, os estômagos removidos, abertos na região da maior curvatura e fotografados para quantificação da área de lesão ulcerativa por meio do programa AVSoft®. O SOL, na dose de 100 mg.kg⁻¹ (a menor dose mais efetiva), apresentou atividade antiulcerogênica contra lesões gástricas induzidas por etanol absoluto (93% de inibição; p<0,05) e pelas drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs) (73% de inibição;p<0,05). Não apresentou atividade antimicrobiana nas cepas padrão utilizada neste estudo. Em adição, nenhum sinal de toxicidade foi observado, considerando os parâmetros analisados.

Palavras-chave: Úlcera gástrica.*Spiranthera odoratissima*.Extrato etanólico.

ABSTRACT

Spiranthera odoratissima A. ST. HIL. (RUTACEAE), knowns as manacá, is a medicinal plant present in Brazilian Cerrado region. It is used in traditional medicine as anti-inflammatory, anxiolytic and for the treatment of renal diseases, hepatic diseases, rheumatism, headache and stomachache. The Rutaceae presents widely distributed around the world, with about 150 genera and 1700 species, in Brazil there are about 30 native genera and approximately 192 species, is rich in secondary metabolites with diverse pharmacological and biological activities. The objective of this study was to evaluate the gastroprotective potential of ethanolic extract of the leaves of *S. odoratissima*(SOL) through gastric ulcer models in rats and its antimicrobial activity and acute toxicity. Analysis of the nuclear magnetic resonance showed characteristic signs of hydrogen to terpenes, limonoids, steroids, coumarins and alkaloids. Foram performed experimental models of gastric ulcer, based on their respective specifications, two control groups were included, one positive (carbenoxolone 100 mg.kg⁻¹ or Cimetidine 100 mg.kg⁻¹) and negative (vehicle - Tween 80® 12%, 10 mL.kg⁻¹). After each methodology was performed euthanasia by CO₂ overdose, the stomachs removed, opened in the region of greater curvature and photographed for quantification of ulcerative lesion area through AVSoft® program. SOL at a dose of 100 mg.kg⁻¹ (the lower most effective dose) showed antiulcer activity against gastric lesions induced by absolute ethanol (93% inhibition;p<0,05) and the indomethacin, an anti-inflammatory drug nonsteroidal, (73% inhibition;p<0,05). However, the treatment with SOL does not showed antimicrobial activity in the bacterial strains tested. Additionally, no signs of toxicity were observed, considering the parameters analyzed.

Keyword: Gastric ulcer. *Spiranthera odoratissima*. Ethanolic extract.

PRÓLOGO

O projeto de mestrado possibilitou a formação específica em Fisiologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto deste, os estudos das úlceras gástricas. Durante a execução deste projeto, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional da discente. As atividades realizadas envolveram:

DISCIPLINAS CURSADAS

Bioestatística – 03 créditos- Conceito: A

Fisiopatologia 1- 02 créditos- Conceito: A

Fisiopatologia 2- 01 crédito- Conceito: A

Metodologia e Ética em Pesquisa na Área da Saúde- 03 créditos- Conceito: A

Seminário da Pesquisa-04 créditos- Conceito: A

Exame de Qualificação-03 créditos

Proficiência em Língua Estrangeira- 01 crédito

Estágio Docente na Graduação 1

Defesa Dissertação de Mestrado- 24 créditos

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

- Atividade antiulcerogênica da espécie *Spiranthera odoratissima* A. ST. HIL. (RUTACEAE). Trabalho publicado na **Revista Enciclopédia Biosfera**: Disponível em:<<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014d/ATIVIDADE.pdf>>.
- Antiulcer and antimicrobial properties from *Annona Coriaceae* MART. XXIV Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. Punta Cana, República Dominicana.
- Biological activities of ethanolic extrat from *Kielmeyera Coriaceae* MART.and Zucc (Clusiaceae).XXIV Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. Punta Cana, República Dominicana.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- VI Semana da Química- Análise Fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Spiranthera odoratissima* (RUTACEAE).
- I Simpósio de Ciências Biológicas do Sudeste Goiano.

- Ciclo de Palestras em Ciências Biológicas e da Saúde- Atividade antiulcerogênica da Espécie *Spiranthera odoratissima* (RUTACEAE).
- Apresentado na Modalidade Comunicação Oral, no dia 29/11/2014, como parte das atividades do XI Fórum em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFU.
- Participação do XI Fórum em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFU. Promovido pela Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal de Uberlândia, realizado no período de 27/11/2014 a 29/11/2014, sob a coordenação da NÍVEA DE MACEDO OLIVEIRA MORALES, com carga horária de 22 horas.

Organização de evento

- Membro da Comissão Organizadora do XI Fórum em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFU, promovido pela Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal de Uberlândia, realizado no período de 27/11/2014 a 29/11/2014.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema fisiopatológico da úlcera gástrica.....	28
Figura 2 - Visualização das folhas da espécie <i>Spiranthera odoratissima</i>	36
Figura 3- 1H RMN perfil cromatográfico do extrato <i>S. odoratissima</i>	45
Figura 4- Estômagos de ratos submetidos à úlcera gástrica induzida por etanol.....	48
Figura 5- Estômagos de ratos submetidos à úlcera gástrica induzida por indometacina.....	49
Figura 6 - Fotomicrografia de secções dos órgãos coletados - Fígado (A), Coração (B), Pulmão (C), Rim (D) e Testículo (E) dos camundongos tratados com o extrato de <i>S. odoratissima</i> 5000 mg.kg ⁻¹ - (H & E × 400).....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeitos do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* em modelos de lesões gástricas induzidas pelo etanol em ratos. Resultados expressos em média \pm S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa do grupo controle.....47

Gráfico 2- Efeitos do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* no modelo de lesões gástricas induzidas pela indometacina em ratos. Resultados expressos em média \pm S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa do grupo controle.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise por CCD do extrato etanólico das folhas de <i>S. odoratissima</i> . (+) Reação positiva; (-) Reação negativa.....	44
Tabela 2- Efeitos da administração oral do extrato etanólico de folhas da <i>S. odoratissima</i> (5000 mg.kg ⁻¹) quanto aos parâmetros toxicológicos em camundongos.Resultados expressos em média ± S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.....	46
Tabela 3- Concentração Mínima Inibitória do extrato etanólico de folhas de <i>S. odoratissima</i> . MIC = concentração inibitória mínima.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
Anova	Análise de variância
bFGF	Fator de crescimento epidermal fibroblástico básico
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em camada delgada
Células G	Células de gastrina
Células D	Células delta
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CYP	Citocromo P450
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
COX-3	Ciclooxigenase 3
DAINEs	Drogas Anti-inflamatórias Não Esteroidais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FPM	Força próton motriz
GSH	Glutathione reduzida
GP _x	Glutathione peroxidase
GSR	Glutathione reductase
H&E	Hematoxilina e eosina
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
IBP	Inibidores de bomba de prótons
IL-1B	Interleucina 1B
LPS	Lipopolissacarídeos
MIC	Concentração Mínima Inibitória
NOs	Óxido nítrico sintase
iNOs	Óxido nítrico induzida
nNOs	Óxido nítrico neuronal
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento

OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Parte por milhão
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RNM	Ressonância magnética nuclear
SNE	Sistema nervoso entérico
SOL	Extrato etanólico da <i>Spiranthera odoratissima</i>
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema único de saúde
TGI	Trato gastrointestinal
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VEGF	Fator de crescimento epitelial vascular
Vitamina B-12	Cianocobalamina
v.o.	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

kg	quilograma
mg	miligrama
μm	micrômetro
M	Concentração molar
NO	Óxido nítrico
O ₂	Gás oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCO ₃	Hidrogenocarbonato (bicarbonato)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Considerações gerais	20
1.2 Trato gastrointestinal	21
1.3 Secreção ácida gástrica	22
1.4 Mecanismo de proteção do estômago	22
1.4.1 <i>Muco e Bicarbonato</i>	23
1.4.2 <i>Prostaglandinas</i>	24
1.4.3 <i>Reconstituição do epitélio gástrico</i>	25
1.4.4 <i>Fluxo sanguíneo</i>	25
1.4.5 <i>Óxido nítrico</i>	25
1.4.6 <i>Sistema Antioxidante</i>	26
1.5 Úlcera gástrica	27
1.6 Tratamento	30
1.7 Plantas Medicinais	31
1.7.1 <i>Terpenos</i>	32
1.7.2 <i>Flavonoides</i>	33
1.7.3 <i>Alcaloide</i>	33
1.8 Rutaceae	34
1.8.1 <i>Espécie vegetal</i>	35
1.9 Avaliação da Toxicidade	36
2 Atividade antimicrobiana	37
3 OBJETIVO	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Animais	40
4.2 Material botânico	40
4.2.1 <i>Material vegetal</i>	40
4.3 Drogas	41
4.4 Ressonância Magnética Nuclear	41
4.5 Métodos farmacológicos “in vivo”	41
4.5.1 <i>Modelo de indução de lesão gástrica aguda induzida pelo etanol</i>	42

4.5.2 <i>Modelo de indução de lesão gástrica aguda induzida pelo uso de DANIE</i>	42
4.6 Avaliação dos parâmetros de toxicológicos.....	42
4.7 Análise antimicrobiana.....	43
4.8 Análise histológica.....	43
4.9 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Análise química SOL.....	44
5.2 Análise da toxicidade.....	45
5.3 Atividade antiulcerogênica.....	46
5.3.1 <i>Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol e DAINES</i>	46
5.4 Análise histológica.....	49
5.5 Atividade antimicrobiana.....	50
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	55
8 PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A-Ficha para o teste geral da atividade farmacológica.....	72
ANEXO B–Parecer do comitê de ética para utilização de modelos experimentais.....	73
ANEXO C-Artigo submetido ao Journal of Ethnopharmacology.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Todos os acontecimentos históricos foram de suma importância para o processo evolutivo do conhecimento humano. Um dos fatores que tem proporcionado a permanência do ser humano no planeta é o seu conhecimento e peculiar poder sobre os recursos naturais. O uso de plantas medicinais é uma das mais remotas práticas empregadas para tratamento de enfermidades humanas, o que tem despertado o interesse de conhecimento mais específico, para tanto há o envolvimento de áreas multidisciplinares, como biologia, a química e a farmacologia (MACIEL et al., 2002).

Na temporalidade, a multidisciplinaridade possibilita que áreas tão vastas como a medicina e a química se fundissem, agregando o desenvolvimento de conhecimentos específicos (YUNES;CECHINEL FILHO, 2001). A partir da multidisciplinaridade, houve uma maior elucidação das atividades terapêuticas das espécies vegetais, integrando informações para a indústria farmacêutica no desenvolvimento de estudos utilizando produtos naturais, para o embasamento de novos fármacos (MARTINS et al., 2004; SEIDL, 1999).

A seleção da espécie *Spiranthera odoratissima* A. ST. HIL. (RUTACEAE) para pesquisa foi realizada por uma abordagem etnofarmacológica, que consiste na seleção de espécime segundo seu uso terapêutico, evidenciado por determinado grupo étnico. Essa abordagem favorece com maior probabilidade a descoberta de novas substâncias bioativas (MACIEL et al., 2002).

A adição de novas práticas culturais e destruição do ambiente têm prejudicado as práticas empíricas e o patrimônio genético de diversas espécies, incluindo as plantas medicinais, para as próximas gerações (PINTO et al., 2002). Assim, há necessidade de se conhecer os constituintes químicos das plantas, contribuindo com o uso sustentável e propiciando sua conservação.

Neste contexto, esse trabalho, busca a validação do extrato etanólico da *S. odoratissima* sobre as atividades relacionadas aos distúrbios do trato gastrointestinal, utilizando para tanto, metodologias padronizadas.

1.2 Trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é organizado fundamentalmente de um tubo muscular com epitélio especializado que compreende a cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, ânus e glândulas secretoras anexas, apresentando como principal função a digestão e absorção dos nutrientes encontrados no bolo alimentar (SANIOTO, 1991).

Devido sua organização, é um ambiente dinâmico, realizando a digestão com apropriada síntese de nutrientes, além da função imunológica desempenhada pela mucosa gástrica que, restringe a entrada de antígenos, toxinas e microrganismos e responde a agentes luminiais potencialmente prejudiciais (WALLACE; DEVCHAND, 2005).

O TGI possui um sistema nervoso próprio, denominado Sistema Nervoso Entérico (SNE), este começa no esôfago e se estende ao ânus, controlando os movimentos e as secreções gastrintestinais. É formado pelo plexo mioentérico ou plexo de Auerbach (responsável pelo peristaltismo) e pelo plexo de Meissner ou submucoso (responsável pelas secreções do TGI), constituindo a inervação intrínseca do órgão (GUYTON; HALL, 1997; RANG et al., 2004; PASRICHA, 2006).

O estômago é um órgão visceral, oco, com paredes estratificadas. Está localizado abaixo do diafragma, com sua maior porção à esquerda do plano mediano corpóreo. Apresenta duas margens, que são denominadas curvatura maior, à esquerda, e curvatura menor, à direita (DANGELO, 2007).

Além disso, divide-se em cinco regiões revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro. A cárdia é a porção pela qual o estômago se une ao esôfago, fixando ao diafragma e localiza-se cerca de dois centímetros e meio à esquerda da linha média ao nível da nona vértebra torácica. O fundo é a porção do estômago acima de uma linha horizontal que vai da transição esôfago-gástrica até a grande curvatura. O corpo encontra-se entre o fundo e a incisura angular (ângulo de Hiss). O antro, por sua vez é a porção entre o corpo e o piloro, que corresponde à junção gastroduodenal. Este é um esfíncter constituído pelo espessamento da camada muscular circular do estômago e sua localização é aproximadamente ao nível da primeira vértebra lombar (VALEZI, 2002).

1.3 Secreção ácida gástrica

A secreção do ácido clorídrico gástrico ocorre na célula parietal através da H^+K^+ -adenosina trifosfatase ($H^+K^+/ATPase$ – bomba de prótons), elaborado pelas células oxínticas (YAO; FORTE, 2003). É estimulada pela acetilcolina (ACh), liberada de neurônios pós-ganglionares entéricos, a gastrina, liberada de células G do antro gástrico e a histamina, liberada das células tipo enterocromafim. O principal inibidor da secreção do ácido gástrico é a somatostatina liberada das células D da mucosa oxíntica e pilórica (SCHUBERT; PEURA, 2008). O processo é regulado por mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico (KONTUREK et al., 2004).

A secreção ácida possibilita a digestão de proteínas e absorção de ferro, cálcio e vitamina B-12, além da prevenção do desenvolvimento bacteriano e outras infecções entéricas (SCHUBERT; PEURA, 2008). Contudo, o excesso de produção de ácido se torna um agente endógeno lesivo.

Frente ao exposto, a regulação fisiológica da secreção ácida é a principal via terapêutica para o tratamento de distúrbios gástricos visto que a redução da secreção de ácido clorídrico (HCl) ocorre diminuição da dissolução da barreira muco-bicarbonato. Entretanto, existem inúmeros mecanismos pelo quais o organismo favorece a proteção e mantém a integridade da mucosa gástrica.

1.4 Mecanismos de proteção gástrica

O trato gastrointestinal é incessantemente exposto a estímulos externos nocivos ou a fatores endógenos que podem acarretar lesões. Frente a essa problemática, é sabido que o estômago pode se proteger de injúrias causadas por uma variedade de agentes irritantes e nocivos devido à ativação de várias linhas de defesa, num processo conhecido como defesa da mucosa (BRZOZOWSKI et al., 2005). Este processo permite à mucosa continuar intacta mesmo quando exposta às substâncias com larga variação de temperatura, potencial hidrogeniônio (pH) e osmolaridade, assim como substâncias com ações detergentes ou citotóxicas, além de produtos bacterianos capazes de causar reações inflamatórias locais ou sistêmicas (WALLACE; GRANGER, 1996).

A defesa da mucosa gástrica é regulada, também pelo sistema nervoso central e fatores hormonais (regulação neurohormonal) (PESKAR, 2001; BRZOZOWSKI et al., 2005 b; HAM; KAUNITZ, 2007). Vários peptídeos, como a

gastrina e a colecistoquinina, têm função gastroprotetora (LAINE et al., 2008). A ativação vagal estimula produção de muco e aumenta o pH intracelular no estômago dos ratos (TANAKA et al., 1997).

1.4.1 Muco e Bicarbonato

O muco e bicarbonato fazem parte da primeira linha de defesa da mucosa gástrica, com capacidade de lubrificar e protegê-la de forças mecânicas da digestão, além de favorecerem a difusão e neutralização do ácido luminal contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005; LAINE et al., 2008).

O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal, formando um gel aderente entre a mucosa e o lúmen, protegendo-a contra agentes nocivos. É secretado pelas células epiteliais da mucosa e contém 95% de água e 5% de mucina (glicoproteína). A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, como a gastrina e a secretina, por prostaglandina do tipo E₂ (PGE₂) e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas, como drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs) e sais biliares, causam dispersão do gel mucoso e da camada de fosfolipídios, deixando a mucosa susceptível à ação de agentes exógenos e/ou do ácido gástrico (LAINE et al., 2008).

A camada de muco que cobre o epitélio do estômago lubrifica e protege a mucosa gástrica de forças mecânicas da digestão, além de facilitar a ação do bicarbonato. Além disso, o muco pode apresentar atividade antioxidante, minimizando os efeitos de radicais livres na mucosa gástrica (LAINE et al., 2008).

O bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais é retido pelo muco, criando um gradiente de pH entre o lúmen e o epitélio gástrico, mantendo pH neutro na superfície das células epiteliais, além de inibir o contato da pepsina com o epitélio do estômago em virtude da presença de fosfolipídeos hidrofóbicos (GARNER et al., 1984; LAINE et al., 2008).

A barreira muco-bicarbonato é uma barreira pré-epitelial entre o lúmen e o epitélio. Quando essa barreira é rompida, ocorre a neutralização do ácido intracelular, reparação epitelial, bem como manutenção e distribuição do fluxo sanguíneo da mucosa. Um relevante agente nesta etapa são as prostaglandinas (PGs), que desempenham uma série de eventos para contribuir com a proteção da mucosa gástrica (LAINE et al., 2008).

1.4.2 Prostaglandinas

As PGs são derivadas de ácidos graxos de 20-carbonos, distribuídas em praticamente todos os tecidos e órgãos, executando uma diversidade de funções fisiológicas e patológicas (CALDER, 2001).

A hidrólise de fosfolipídios de membrana mediada pela enzima fosfolipase A₂ libera no citoplasma o ácido araquidônico, precursor das PGs quando sob ação das ciclooxigenase (COX). Os prostanóides derivados do ácido araquidônico são denominados de série 2, sendo eles a prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaciclina (PGI₂), prostaglandina F₂ (PGF_{2α}) e tromboxano A₂ (TXA₂) (DEY et al., 2006). Existem três isoformas conhecidas de COX: a COX-1, constitutiva, está relacionada à síntese fisiológica de prostaglandina, a COX-2, que aumenta a síntese de prostanóides na inflamação e em várias doenças; e a COX-3 ou COX-1b (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; GUDIS; SAKAMOTO, 2005).

A redução na secreção de muco, inibição da secreção de HCO₃⁻, redução no fluxo sanguíneo da mucosa, alteração na estrutura microvascular e um aumento na secreção ácida gástrica e de pepsinogênio são as principais consequências da redução na produção das PGs, o que contribui para patogênese da ulceração da mucosa gastroduodenal (FORNAI et al., 2005).

A produção contínua de PGE₂ e PGI₂ é fundamental para a manutenção da integridade da mucosa, além de protegê-la contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes. As PGs apresentam como funções a inibição da secreção de ácido; estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídios; aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa; e aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa, além de inibir a ativação de mastócitos e leucócitos, bem como a aderência de plaquetas no endotélio vascular (LAINE et al., 2008).

As DAINES inibem, de forma não seletiva, as enzimas COX, portanto inibe também a síntese de PG. O seu uso crônico está relacionado ao desenvolvimento de gastrite e úlcera gástrica, fato que revela a influência das PG para a manutenção da integridade da mucosa gástrica (VONKEMAN; VAN de LAAR, 2010).

1.4.3 Reconstituição do epitélio gástrico

A terminologia “reconstituição” alude ao processo de reparo epitelial da mucosa que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida. As células gástricas estão ligadas à membrana basal das células epiteliais o que torna o local bastante vulnerável aos danos induzidos pelo ácido gástrico (PAIMELA et al., 1995).

A úlcera pode ser restaurada através de crescimento e formação de glândulas gástricas, proliferação e migração celulares garantidas por células progenitoras localizadas na base das glândulas gástricas, crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), reinervação da mucosa por nervos intrínsecos e extrínsecos, além de deposição de matriz extracelular. Todos esses processos encaminham à cicatrização da úlcera, sendo controlados por fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas como, por exemplo, o fator de crescimento epitelial vascular (vEGF), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), o fator de crescimento de hepatócito (HGF), a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), entre outros, de forma espacial e temporalmente sincronizada (MILANI; CALABRO, 2001; WALLACE; MA, 2001; TARNAWSKI, 2005; LAINE et al., 2008).

1.4.4 Fluxo sanguíneo

O fluxo sanguíneo na mucosa mantém a estrutura e a função do estômago bem como está associado às doenças gástricas e aos processos regenerativos.

Este é controlado pelo sistema nervoso e por mediadores químicos, como o óxido nítrico (NO), a bradicinina e algumas PG. Através do fluxo sanguíneo a mucosa gástrica é provida de nutrientes, oxigênio, hormônios e fatores responsáveis pela rápida reconstituição do epitélio, pela secreção de muco e bicarbonato, além de permitir remoção de agentes lesivos e excesso de prótons (KAWANO; TSUJI, 2000; WALLACE; MA, 2001).

1.4.5 Óxido nítrico

Representa um importante transmissor endógeno, sendo um gás volátil formado a partir da L-arginina, cuja reação de oxidação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Há três diferentes isoformas de NOS, sendo elas: a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS-1); a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3), sendo essas duas isoformas constitutivamente expressas e a óxido nítrico

sintase induzida (iNOS ou NOS-2) (LANAS, 2008). A NOS endotelial e a NOS neuronal são expressas em condições fisiológicas normais, enquanto que a iNOS é expressa em condições fisiopatológicas, como por exemplo, na presença de lipopolissacarídeos (LPS) ou pelo fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (NISHIO et al., 2006).

De acordo com a literatura, o NO revela envolvimento na preservação da mucosa, em modelos experimentais de úlcera gástricas, ao favorecer a ação vasodilatadora e redução da peroxidação lipídica (CHO, 2001). O NO produzido pela sua forma constitutiva apresenta em efeito protetor, e o NO originário da sua forma induzida possui um efeito pró-ulcerogênico (NISHIO et al., 2006).

O NO é um mediador envolvido tanto na inflamação quanto na manutenção de determinadas funções fisiológicas como a manutenção da integridade do TGI, o controle da secreção ácida e alcalina, o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e na secreção de muco gástrico (BAYIR et al., 2006). O NO pode também atuar na cicatrização, além de ser uma molécula capaz de inibir a infiltração de neutrófilos, diminuindo a expressão de moléculas de adesão e algumas citocinas (ELLIOT; WALLACE, 1998; WALLACE; MA, 2001; TATEMACHI et al., 2003).

1.4.6 Sistema antioxidante

O metabolismo celular normal envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), podendo afetar prejudicialmente o funcionamento celular, visto que a produção excessiva de EROs afeta sua integridade (KUROSE et al., 1997; TANDON et al., 2004). As EROS causam inflamação e morte celular, através da modulação das vias de transdução do sinal, por afetar as enzimas redox-sensíveis e fatores de transcrição, por auxiliar a atividade de proteases e por estimular a expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão (UZUN et al., 2005).

Os estímulos lesivos sobre a mucosa, responsáveis pelo desenvolvimento de úlceras pépticas, são acompanhados por danos microvasculares locais, com consequente isquemia, diminuição da distribuição de nutrientes, formação de radicais livres que são átomos e moléculas que possuem número ímpar de elétrons (elétrons desemparelhados) em sua órbita externa apresentando grande instabilidade e reatividade podendo levar a necrose tecidual (TARNAWSKI, 2005).

As EROS provocam a oxidação dos componentes celulares, dentre eles a peroxidação lipídica nas membranas, atacando ácidos graxos insaturados,

desencadeando assim os eventos que culminam lesões gástricas experimentais agudas induzidas por estresse, etanol e DAINES (BAYIR et al., 2006). À medida que aumenta o estresse oxidativo, os níveis de EROs também se elevam, e estas reagem com a membrana lipídica através do ataque de elétrons desemparelhados, ocasionando perda de funcionalidade ou até mesmo apoptose celular (TARNAWSKI, 2005).

O estresse oxidativo no tecido gástrico contribui para a formação de lesão na mucosa gástrica (NANJUNDAIAH, 2011). No entanto, o próprio ambiente redox (oxirredução) do interior celular impede os danos oxidativos através da atuação de moléculas antioxidantes que apresentam função protetora contra os danos oxidativos (HALLIWELL, 2011). Estes antioxidantes apresentam ainda a habilidade de quelar radicais livres protegendo a mucosa gástrica contra ulcerações (TANDON et al., 2004; TACHAKITTIRUNGROD, 2007).

As EROS são produzidas em níveis basais a fim de garantir a homeostase fisiológica. Para tanto, há um fino equilíbrio entre a produção destas EROS e sua depleção por agentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Se por ventura, este balanço for prejudicado, de forma que o sistema não consiga sozinho equilibrar os níveis de EROS produzido, estas podem agir de forma prejudicial. A este evento da-se o nome de estresse oxidativo (CHEN, et al., 2011; ABOUL-ENEIN et al., 2011).

1.5 Úlcera gástrica

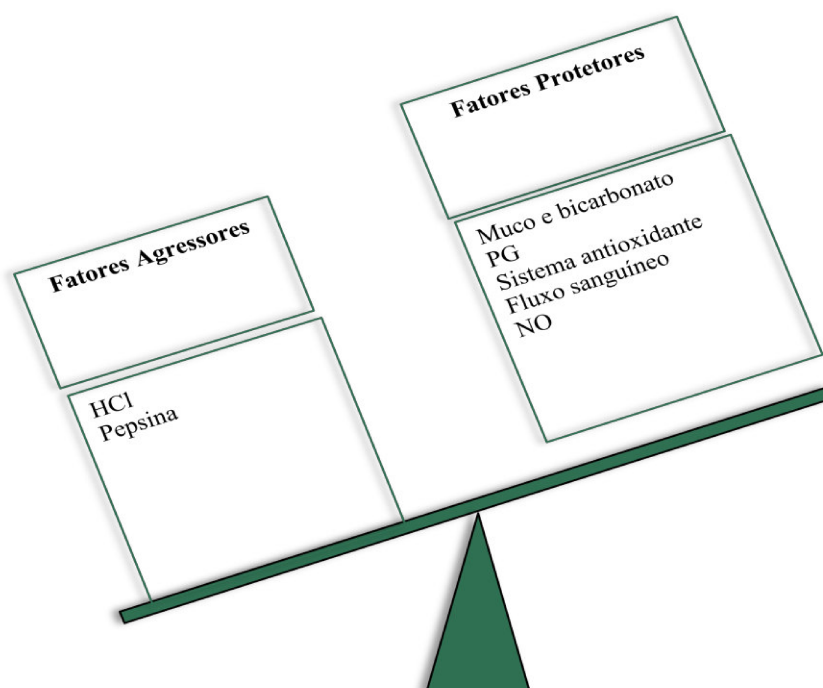
As úlceras gástricas atingem cerca de 10% da população mundial. No Brasil, apesar de ser uma doença frequente, não se sabe propriamente sua real incidência. Nas diferentes estatísticas, a incidência de úlcera gástrica no Brasil varia de 1 a 20%, devido à variação das populações estudadas e a diferenças na coleta dos dados e nos critérios de diagnóstico (BERSTAD; BERSTAD, 1993; d'ACCAMPORA et al., 2008; CASTRO et al., 2009).

Apesar dos grandes avanços no conhecimento da patologia, a sua etiopatogenia não é totalmente elucidada, sendo, especificada como uma doença dos tempos modernos. Antigamente não se apresentava em proporções representativas na medicina, contudo nos dias atuais, os distúrbios gastrointestinais ocorrem em número expressivo, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento.

São lesões profundas que se estendem através da mucosa e penetram a muscular do estômago. Estas lesões decorrem de um desequilíbrio entre agentes lesivos (ácido clorídrico e pepsina) e mecanismos protetores da mucosa

(TARNAWSKI, 2005; YUAN et al., 2006). Esta lesão ocorre majoritariamente na pequena curvatura estômago e na parte proximal do duodeno, podendo também desenvolver-se na zona inferior do esôfago, na zona distal do duodeno ou no jejuno (RAMAKRISHNAN; SALINAS, 2007).

Figura 1- Esquema fisiopatológico da úlcera gástrica. **Fonte:** LUIZ- FERREIRA, A.,2015.(Universidade Federal de Goiás- Campus Catalão).



A úlcera gástrica está associada a complicações potencialmente fatais, incluindo sangramento, perfuração, penetração e obstrução. A perfuração é a segunda mais frequente complicação após hemorragia relacionando-se a diversos fatores, como aumento na secreção de ácido e pepsina, estresse, uso de DAINES, tabagismo, consumo de álcool e infecção por *Helicobacter pylori* (MILOSAVLJEVIC et al., 2011).

A infecção por *H. pylori* é considerada como o principal fator etiológico da úlcera gástrica, com 75% dos casos associados à presença dessa bactéria. Os danos na mucosa gástrica proporcionado pela *H. pylori* são resultado da sua capacidade de alcançar as células da mucosa gástrica e causar danos, acompanhados pelo aumento da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 β (IL-

1 β), a interleucina 8 e o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α). Esta ação afeta a secreção ácida gástrica e a taxa de produção de gastrina-somatostatina, assim como a atividade secretora das células mucosas, produtoras de muco e bicarbonato e a qualidade de aderência da camada de muco, resultando na gastrite aguda e, posteriormente, gastrite crônica (KONTUREK et al., 2005).

O segundo maior fator etiológico da úlcera gástrica é a utilização de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (DAINEs). Estima-se que usuários crônicos destes fármacos têm risco de desenvolver úlcera gástrica 46 vezes maior que a média da população e a prevalência de úlcera gástrica nesse grupo são de 9 a 13% (CASTRO et al., 2009). O uso de DAINEs induz úlceras pépticas quando usados por períodos prolongados. O efeito sistêmico mais importante dos DAINEs, em termos de induzir ulceração gástrica refere-se à sua habilidade de suprimir a síntese de prostaglandinas (PGs) (WALLACE, 2008).

Outro fator de grande relevância no desenvolvimento de úlceras gástricas é o consumo de álcool pela população, que pode produzir erosões gástricas agudas hemorrágicas (JAHOVIC et al., 2007; MATSUHASHI et al., 2007). Em modelos experimentais o etanol tem efeito ulcerogênico e necrotizante que resulta em dano direto da mucosa. O etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos, inibição da síntese de PGs e consequente redução da produção de muco, além de provocar dano no endotélio vascular da mucosa gástrica, desordem da microcirculação e isquemia, resultando na produção de EROs (PAN et al., 2008).

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

A cicatrização da úlcera é um processo complexo que envolve migração e proliferação celular, re-epitelização, angiogênese e deposição da matriz celular (WALLACE, 2001; TARNAWSKI, 2005), sendo controlados por fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas (TARNAWSKI, 2005).

As úlceras gástricas podem apresentar chance de cura superior a 95%, mas a probabilidade de reincidência está entre 65-80% um ano após a cura e quase 100%

depois de dois anos. O tratamento e cura de recidivas ainda é um sério problema na clínica (FAN et al., 2005).

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

1.6 Tratamento

As úlceras pépticas eram tratadas através de cirurgias, contudo, esse método acarretava em altas taxas de morbidade e mortalidade. Diante da potencial característica danosa da secreção ácida gástrica, alvos farmacológicos que inibissem a secreção ácida foram adotados como a principal estratégia para o tratamento das úlceras pépticas (YUAN, et al., 2006).

Frente a essa problemática, é desenvolvida na década de 70, a terapia baseada na redução da secreção ácida, com uso de inibidores de receptores histamínicos do tipo H₂. Os antagonistas de receptores H₂, tais como ranitidina, famotidina, nizatidina e cimetidina, inibem a produção de ácido por competição reversível com histamina pela ligação aos receptores H₂ na membrana basolateral das células parietais (GUSTAVSSON; NYREN, 1989).

Esses fármacos são geralmente bem aceitos e acreditava-se inicialmente que apresentavam baixos efeitos colaterais (LEWIS, 1991), contudo, seu uso disseminado, possibilitou adquirir informações e, por conseguinte uma melhor elucidação do uso recorrente, sendo descritos alguns efeitos colaterais como: náuseas, sonolência, mialgia e prurido (MARCOLIN et al., 2004). Szabo e Vincze (2000), demonstraram que as úlceras cicatrizadas com o uso de cimetidina eram precariamente vascularizadas, apresentando menos densidade de vasos sanguíneos novos do que no tecido normal ao redor, o que pode ser uma das razões da alta taxa de reincidência das úlceras gástricas.

Considerando a necessidade de se desenvolver fármacos para o tratamento das úlceras gástricas, foram desenvolvidos na década de 80 os inibidores de bomba protônica (IBP – omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol). Estes são considerados pró-fármacos, pois necessitam da atuação em ambientes

ácidos para apresentar efeitos farmacológicos. Após absorção, difundem-se pelas células parietais do estômago e acumulam-se nos canalículos secretores de ácido das células parietais, onde são ativados pela formação de uma sulfenamida tetracíclica catalisada por prótons (GILMAN, 2007). Assim, com o progresso dos inibidores da bomba de prótons $H^+/K^+ATPase$ (IBP), houve redução no uso dos antagonistas de receptores H_2 histaminérgicos (YUAN, et al., 2006; BRUNTON, et al., 2006). A redução da acidez gástrica mediada pelos IBP aumenta a produção da gastrina, favorecendo um quadro de hipergastrinemia, além de outros efeitos colaterais associados como: cefaléia, diarreia, dor abdominal, náusea, deficiência de vitamina B12, angina, hipotensão e o aumento do risco de infecção bacteriana (como pela *Helicobacter pylori*) (YUAN, et al., 2006; BRUNTON, et al., 2006, GILMAN, 2007).

Considerando os efeitos colaterais acima apresentados, é notável que ainda existam algumas limitações na atual terapêutica, como a ineficácia na prevenção e reincidência de úlceras em usuários de DAINE's, diminuição na eficácia de erradicação de *H. pylori* e em úlceras não associadas a *H. pylori* ou DAINE's (YUAN et al., 2006), o que traz a necessidade de investigação de novas substâncias para o tratamento de úlcera.

1.7 Plantas Medicinais

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade para aliviar, prevenir ou curar doenças, sendo à base da medicina popular e utilizadas para o tratamento das mais diversas enfermidades (RATES, 2001; GURIB-FAKIM, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais englobam todas as espécies, que podem ser usadas como recurso para prevenir, aliviar, curar e modificar um processo fisiológico normal ou patológico, apresentando como compostos ativos que servem como fonte para os fármacos (BRAGA, 2008; DUTRA et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

O Brasil pode se destacar no cenário mundial da produção de fitomedicamentos, pois possui a maior biodiversidade do mundo (cerca de 20% do número total de espécies do planeta) (CALIXTO, 2003).

Cerca de um quarto dos medicamentos é de origem vegetal ou contêm substâncias sintetizadas a partir de estruturas encontradas em plantas (GURIB-FAKIM, 2006).

Devido, a grande parte de fármacos antiulcerogênicos atuais apresentam efeitos colaterais, há crescente interesse em terapias alternativas como o uso de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas (RATES, 2001). Estudos experimentais mostram que a maior parte das plantas reduz os fatores agressores à mucosa e, desta forma, possivelmente mais segura, tolerável e acessível para os pacientes (GOEL; SAIRAM, 2002).

O uso de plantas medicinais pelo Sistema Único de Saúde (SUS) pode ser uma solução alternativa para gastos públicos com medicamentos, aliando sua eficácia comprovada, ao baixo custo e conhecimento popular. Neste tocante, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), objetiva promover o uso e a inserção de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS com segurança, eficácia e qualidade. Para tanto, é fundamental qualificá-las de acordo com procedimentos como a identificação botânica, fatores ambientais, solo, época da colheita, transporte, secagem e armazenamento do produto, a preparação dos extratos e frações, as doses e as concentrações os modelos experimentais, o teor de princípios ativos presentes, a ser utilizada, e a reprodutibilidade dos estudos. Assim, a seleção das espécies a serem estudadas é de suma importância, visto que uma escolha inadequada da planta implica em perda de tempo e recursos (BRITO, 1996).

1.7.1 Terpenos

Terpenos apresentam-se como o grupo mais antigo de produtos de pequenas moléculas sintetizado por plantas, por conseguinte é também considerado o grupo mais difundido de produtos naturais (AUGUST BERNTHSEN, 1891).

Os terpenos são usualmente caracterizados como hidrocarbonetos insaturados, visto que muitas vezes são formados pela ciclização enzimática através da conversão de moléculas simples, lineares de hidrocarbonetos fosfatados em esqueletos carbocíclicos quirais (MAIOMONE; BARAN, 2007). Sua nomenclatura relaciona-se ao número de estruturas isoprênicas e dos átomos de carbono presentes na molécula (WAGNER; ELMADFA, 2003).

São compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (MARCANO; HASEGAWA, 2002), apresentando uma gama de ações farmacológica, atuando desde a capacidade de interferência em canais iônicos na malária até ação antiulcerogênica (MAIMONE; BARAN, 2007).

Diversos estudos avaliavam a ação dos terpenos frente á sua atividade antiulcerogênica, contudo, o único terpeno já comercializado para o tratamento de úlceras gástricas foi a Carbenoxolona, um triterpeno pentacíclico derivado do ácido glicirretínico (U.S. Patent 3.070.623). Seus efeitos benéficos eram acompanhados por graves efeitos colaterais, sendo atualmente comercializada como ferramenta farmacológica (BAKER, 1994; DZUBAK et al., 2006; BARBASTEFANO, 2007).

1.7.2 Flavonoides

Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas (LOPES et al., 2010), constituem um grupo de polifenóis com origem na biossíntese a partir da via chiquimato e da via acetato (BEECHER, 2003).

Compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, encontrados amplamente em frutas, folhas, chás, vinhos e cuja síntese não ocorre na espécie humana (PETERSON; DWYER, 1998).

Apresentam uma variedade de propriedades farmacológicas que os permitem atuar sobre sistemas biológicos (PETERSON; DWYER, 1998); apresenta à capacidade de inibir enzimas específicas, antifúngica, antiparasitária, estimulam alguns hormônios e neurotransmissores e sequestram radicais livres (HAVSTEEN, 2002). Destacam-se, dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: atividades anti-inflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica, atividade vascular e cardioprotetora, atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (LIN et al., 1997).

Flavonoides possuem efeito considerável como agente gastroprotetor, contudo, são pouco estudados em humanos (ZAYACHKIVSKA et al., 2005), são capazes de proteger a mucosa gástrica de substâncias necrotizantes e podem ser úteis na terapia de ulcerações gástricas agudas e crônicas (ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

1.7.3 Alcaloide

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que apresentam um ou mais átomos de nitrogênio em estado de oxidação negativo (MANN et al., 1993).

De acordo com Falcão et al., (2008) os alcaloides têm despertado interesse para várias atividades biológicas, sendo investigados para tratar distúrbios no trato gastrointestinal, incluindo as úlceras gástricas.

Muitos alcaloides estudados mostram resultados significativos para o tratamento das úlceras gástricas, inibindo lesões induzidas por indometacina (SANDOR, 1977; AL-SHABANAH, et al., 1993), por ácido acético, por HCl/etanol e por etanol absoluto (TAN et al., 2000; TAN et al., 2002; NOLDIN et al., 2005).

Além destes efeitos protetores em modelos clássicos de indução de úlceras, os alcaloides também aumentam fatores citoprotetores da mucosa gástrica como a produção de muco e prostaglandina, além de diminuir a secreção de ácido e inibir a motilidade gástrica (YAMAZAKI et al., 1984; OMOTO et al., 1990; TRAMONTANA et al., 1994; YAMAZAKI, 2000; PARK et al., 2000; TOMA et al., 2004).

Um alcaloide muito estudado, a melatonina, secretada pela glândula pineal e células gastrointestinais, protege a mucosa gástrica contra os danos causados por isquemia-reperfusão, modelo que envolve exclusivamente a participação de fatores pró-oxidativos da mucosa gástrica (KONTUREK et al., 1997).

Embora os alcaloides exerçam um efeito benéfico para a mucosa gástrica, estes têm atividades complexas sendo necessário realizar um estudo de estrutura/atividade. Assim, também se faz necessário investigar modelos experimentais específicos devido à complexidade envolvida com a patofisiologia das doenças (FALCÃO et al., 2008).

1.8 Rutaceae

A família das Rutaceae apresenta-se amplamente distribuída pelo mundo, com cerca de 150 gêneros e 1700 espécies sendo encontradas especialmente em regiões tropicais quentes e temperadas (COSTA et al., 2010). No Brasil há cerca de 30 gêneros nativos e aproximadamente 192 espécies. De acordo com características morfológicas, apresentam folhas com glândulas e pontos translúcidos que secretam óleos essenciais além de frutos variados, caracterizando seus membros como aromáticos (PIRANI, 2005; GURIB-FAKIN et al., 2006).

É rica em metabólitos secundários e suas atividades farmacológicas e biológicas, são bem difundidas. Diferentes partes das plantas são utilizadas na medicina popular e estas são administradas na forma de chá ou garrafadas para o tratamento de diversos males como: reumatismo, dermatite, diarreia, diabetes, malária, dores de estômago, inflamação, diaforéticas, antireumáticas, câibras, claudicação intermitente, síndrome de Raynaud, hipertensão e também como diurético

e anti-séptico e disfunções do sistema urinário (PHILLIPSON et al., 2002; DE LA CRUZ, 2008) sendo uma família promissora para novas pesquisas devido a gama de metabólitos secundários presentes.

1.8.1 Espécie vegetal

A *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. (Rutaceae) é uma planta arbustiva presente no Cerrado, com cerca de 1 metro de altura, caules eretos que se reúnem formando touceiras. Os ramos apresentam folhas alternas, cartáceas, compostas, trifolioladas e pecioladas apresentando glândulas translúcidas. As suas raízes são amareladas, as flores são brancas e perfumadas (Figura 3) (ALMEIDA et al., 1998).

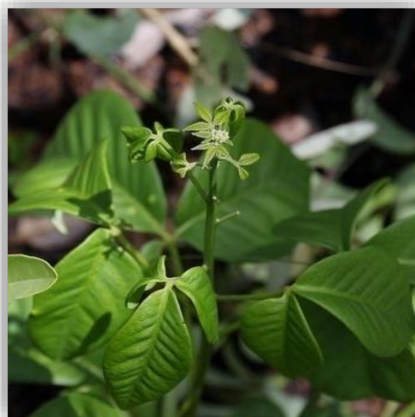
A espécie vegetal é conhecida popularmente como manacá, encontrada nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Bahia, Distrito Federal e Goiás. Na medicina popular essa planta é utilizada para o tratamento de reumatismo, gota, dores abdominais, dores de estômago, infecções renais e hepáticas, ação contra protozoários e leveduras, retenção urinária, (SALLES et al., 1997; SILVA, 1998; TRESVENZOL et al., 2006; ALBERNAZ et al., 2010). Os testes de contorção abdominal induzida por ácido acético, de edema de orelha induzido por óleo de Croton e de peritonite induzida por carragenina mostraram atividades analgésicas e/ou anti-inflamatórias da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* (MATOS et al., 2003). Estudos prévios sugerem que a fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *S. odoratissima* contém substâncias com atividade anti-inflamatória (MATOS et al., 2003), enquanto o extrato etanólico das raízes apresenta substâncias com ação calmante e anti-inflamatória de ação central (MATOS et al., 2004).

A espécie selecionada para esse trabalho faz parte de um bioma altamente ameaçado. Encontra-se na lista de espécies ameaçadas, enquadrando-se na categoria de vulnerável da flora de Minas Gerais, principalmente devido à exploração de suas raízes para fins medicinais (MENDONÇA; LINS, 2000).

Segundo Ricklefs (1996), a conservação da biodiversidade depende muito do valor que damos às espécies individuais e, na ausência de proteção moral, esse valor está relacionado aos benefícios econômicos e recreacionais para a espécie humana, como a possibilidade de obtenção de substâncias químicas orgânicas e drogas. Assim, informações sobre atividade terapêutica de produtos naturais podem dar embasamento para a conscientização sobre a importância da conservação dos

ecossistemas e seus recursos, além de contribuir para a instalação de planos de manejo sustentável de seus elementos.

Figura 2- Visualização das folhas da espécie *Spiranthera odoratissima*. **Fonte:** SALLES, A.E.H. Jardim Botânico de Brasília. 2007.



1.9 Avaliação da Toxicidade

A vasta utilização de plantas medicinais tem despertado a preocupação das autoridades regulatórias, principalmente no que se refere à segurança, eficácia e qualidade dos fitoterápicos (TUROLLA, 2004). A toxicidade é caracterizada como a capacidade de certas substâncias ocasionarem danos aos seres vivos (PINTO et al., 2000).

Esses testes são realizados no sentido de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e por seguinte dimensionar o grau de toxicidade relativa das substâncias (FORBES, FORBES, 1994 apud LIMA et al., 2009). Devem-se ser avaliados de forma a garantir a segurança, as propriedades físicas, químicas e farmacodinâmicas, da espécie bem como as características biológicas dos indivíduos, analisando alterações comportamentais e os parâmetros bioquímicos e hematológicos (KERR, 2003).

Para realização do estudo é necessário inicialmente a etapa botânica que envolve a seleção do material, dados referentes à coleta da planta, identificação macro e microscópica e correto armazenamento (ALVARENGA, 2012). A etapa química ou fitoquímica relaciona-se a estudos de identificação e isolamento de substâncias dos

componentes da planta, podendo estes ser ativos ou inativos e depois levados a estudos farmacoténicos (OLIVEIRA, 2007).

Tais ensaios podem ser realizados para analisar a toxicidade aguda, subaguda e crônica. O ensaio da toxicidade aguda é uma etapa inicial que permite determinar o perfil toxicológico de uma substância, podendo sugerir o mecanismo de toxicidade envolvido na absorção da mesma por diferentes vias de administração, estabelecimento das doses a ser usadas nos estudos, além de fornecer informações sobre o risco a saúde humana (BIGUETHI et al., 2004).

2 Atividade Antimicrobiana

A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais registrados da evolução biológica, acarretando um importante problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006). Os estudos sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação terapêuticas dos vegetais, bem como pelos efeitos medicinais, o uso de plantas medicinais contribui significativamente com os primeiros cuidados com a saúde (MACIEL et al., 2002).

Newman e Cragg, 2012 evidenciaram em seu estudo que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, já que esses estudos são complexos e longos. De forma a corroborar com os cuidados primários a saúde, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganhando importância nas companhias farmacêuticas.

Estudos relacionados às atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm ganhado destaque em muitos países como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais com atividades antibacterianas ou antifúngicas (MARTÍNEZ et al., 1996; NAVARRO et al., 1996; AHMAD; BEG, 2001; MAHASNEH et al., 1999; DUARTE et al., 2005).

As doenças infecciosas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre humanos, especialmente nos países em desenvolvimento. Dessa forma, existe uma crescente demanda das indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, para impulsionar as investigações científicas pela busca de novos antimicrobianos, especialmente em função da ocorrência de resistência microbiana a tais medicamentos (NASCIMENTO et al., 2000).

Em geral, bactérias têm habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas usadas como agentes terapêuticos, pois tem agravado a problemática de bactérias resistentes a todos, ou a quase todos, fármacos disponíveis no mercado (NASCIMENTO et al., 2000; SAKAGAMI; KAJAMURA, 2002).

Os sítios de ação dos produtos naturais frente às bactérias geralmente são desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula (BURT, 2004).

Embora, levantamentos etnofarmacológicos comprovem a indicação da *S. odoratissima* para o tratamento de distúrbios estomacais, não há estudos farmacológicos que comprovem a ação antiulcerogênica. Além disso, existe uma grande preocupação sobre os efeitos colaterais que muitas vezes são inevitáveis e limitam sua utilidade clínica para o tratamento de úlcera gástrica. Por esta razão, este trabalho objetivou estudar farmacologicamente as indicações terapêuticas da espécie para a prevenção e tratamento de distúrbios gastrointestinal, mais especificadamente, a úlcera gástrica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos gastroprotetor do extrato etanólico obtidos a partir de folhas da *Spiranthera odoratissima*, utilizando modelos experimentais de úlceras gástricas;
- Avaliar atividade antimicrobiana;
- Avaliar a toxicidade aguda.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antiulcerogênica do extratoetanólico em modelos experimentais de úlcera induzida por diferentes agentes químicos;
- Estudar a atividade antimicrobiana nas cepas patogênicas, *E. coli* ATCC 25922; *S. aureus* ATCC 25923 e *P.aeruginosa* ATCC 27853;
- Estudar a toxicidade aguda que caracterizará um possível efeito tóxico do extrato que inviabilizar o uso pela comunidade;
- Oferecer novas opções terapêuticas antiulcerosas que promovam uma melhor eficácia e ausência de efeitos adversos;
- Agregar valor a um bem natural que vem sendo destruído pelo homem, através do diálogo entre conhecimento popular e científico, e disponibilização adequada dos dados para as comunidades que utilizam as espécies selecionadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Whistar machos ($n = 7$, 150 - 250 g) e camundongos Swiss ($n = 10$, 35-45 g) albinos machos cedidos do Central de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEBA-UFU). Os animais foram alimentados com uma dieta certificada Presence (Purina®) com acesso livre a água filtrada em condições padrão de 12 h-escuro de 12 h de luz, umidade ($60 \pm 1,0\%$) e temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$). O jejum 12h foi utilizado para todos os ensaios. Além disso, os animais foram mantidos em gaiolas com piso elevado de malha larga para evitar a coprofagia. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Universidade Federal de Goiás (CEUA / UFG, não. 001/14). Animais foram preservados em conformidade aos procedimentos para o uso científico de animais, Lei Arouca (nº 11.794 / 2008).

4.2 Material Botânico

Foram coletadas folhas da espécie vegetal na rodovia 251 – Julio Garcia no Distrito Federal. As amostras foram coletadas e autenticadas pelo Dr. Helder Nagai Consolaro e as exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade de Brasília UB 5114.

4.2.1 Material vegetal

As folhas da espécie vegetal foram coletadas no mês de novembro, estas foram previamente divididas, separadas e dispostas em camadas finas e submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 45°C até peso constante. A temperatura da estufa utilizada durante a secagem foi controlada por um termostato e um termômetro, os quais garantiram a homogeneidade da amostra. Após secagem completa, as folhas serão trituradas em moinho de facas e pesadas.

As folhas coletadas foram submetidas separadamente à percolação simples pelo método de extração exaustivo (PRISTA, 1995). O processo teve início com ointumescimento prévio de uma quantidade do pó com etanol 70% (V/V) durante 2 horas fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70%). O empacotamento foi feito de uma forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo colocado dentro do

percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção 5:1 (cada 5 referente ao percolador 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. Após a extração, os extratos foram rota-evaporados sob pressão reduzida em temperatura de 40°C, liofilizados para completa remoção da água e armazenado em frascos âmbar tarados e mantidos em dessecador.

4.3 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: Tween 80[®] (Sinth, SP, Brasil), etanol absoluto (Merk, Darmstadt, Alemanha); cimetidina, indometacina e carbenoxolona Sigma Chemical Co., (St. Louis, EUA). Os produtos químicos utilizados nos tampões e em outras soluções foram todos de grau analítico. Todos os medicamentos e reagentes foram preparados imediatamente antes da utilização.

4.4 Ressonância magnética nuclear

O extrato etanólico de folhas de *S. odoratissima* foi preparado com solvente deuterado por análise de ressonância magnética nuclear (RMN). O espectro de ¹H RMN foi obtido utilizando Bruker DRX-500 MHz com espectrômetro d6 dimetil sulfóxido (DMSO-d6) usando TMS como padrão interno.

4.5 Métodos farmacológicos *in vivo*

Nos testes de atividade antiulcerogênica, os extratos hidro-alcoólicos da espécie selecionada, drogas-padrão (cimetidina ou carbenoxolona, as quais serão usadas como controles positivos e indicadas em cada modelo de lesão péptica) foram sempre administradas por via oral. Foi utilizado ainda um grupo (controle-negativo) recebendo um volume equivalente de uma solução de Tween, no qual foram dissolvidos os extratos ou as drogas-padrão. Os animais foram mantidos em gaiola especial sem maravalha e submetidos a jejum de 12h.

Após cada experimento, os animais foram mortos por excesso atmosférico de CO₂, os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, as áreas de lesões foram fotografadas com uma câmera para serem analisadas por planimetria (área total e área relativa) de acordo com a severidade das áreas lesadas através do programa Avsoft Bioview (BARBASTEFANO et al., 2007).

4.5.1 *Modelode indução de lesão gástrica aguda induzida pelo etanol*

Após 12 horas de jejum e livre acesso a água, ratos machos Whistar Unib: WH (n = 7, por grupo) foram tratados por gavagem, com extrato etanólico da *S. Odoratissima* – SOL nas doses 25, 50, 100, 200 e 300 mg.Kg⁻¹, com carbenoxolona 1000 mg.kg⁻¹ e com Veículo 10mL.kg⁻¹. Após 1 hora deste tratamento, os animais foram desafiados com 1 mL.kg⁻¹ de etanol absoluto, v.o. Após 1 hora do desafio, os animais foram sacrificados por excesso atmosférico de CO₂, os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, examinados, fotografados e analisados conforme descrito anteriormente. De acordo com os resultados obtidos após avaliação macroscópica dos tecidos, a dose de melhor resposta foi selecionada para os demais ensaios (MORIMOTO et al.,1991).

4.5.2 *Modelo de indução de lesão gástrica aguda induzida pelo uso de DANIE*

Os ratos, dos diferentes grupos experimentais, foram tratados com o SOL, com 100 mg.kg⁻¹ de cimetidina ou 10 mL.kg⁻¹ de veículo, após 12h de jejum. Trinta minutos após o tratamento, as lesões pépticas foram induzidas por administração oral de 30 mL.kg⁻¹ de indometacina. Os animais foram eutanasiados 4h e 30 minutos após a administração da indometacina e os estômagos e duodenos retirados e posteriormente abertos, no sentido da maior curvatura e longitudinalmente, respectivamente, para contagem e classificação das lesões, como descrito anteriormente (HAYDEN et al., 1978).

4.6 Avaliação dos parâmetros toxicológicos

Os estudos de toxicidade aguda foram realizados em camundongos machos albinos Swiss (n = 10). Os animais receberam Tween® a 12% (10 mL.kg⁻¹) ou dose única de SOL (5000 mg.kg⁻¹, v.o.)(IRWIN, 1968).

Este teste se baseia na observação de vários sinais ou alterações comportamentais, em relação aos animais controles, que possam indicar alguma atividade no sistema nervoso central ou possíveis ações neurotóxicas, além de alterações relacionadas aos sistemas periféricos que possam auxiliar na escolha da via de administração, bem como a faixa de doses adequadas para os demais testes biológicos in vivo (CARLINI, 1972; ALMEIDA et al., 1999; MATTEI; FRANCA, 2006). Os sinais e sintomas associados com a administração de SOL foram realizados com 5, 10, 20, 30, 60, 240 e 360 minutos depois das administrações orais.

O efeito toxicológico agudo foi realizado pelo método descrito por Souza Brito (1994), transcorridos 360 minutos, os órgãos (coração, fígado, rins, pulmões e testículos) foram removidos, pesados e armazenados para análises histológicas.

4.7 Análise Antimicrobiana

Os ensaios de sensibilidade microbiana do SOL foram realizados utilizando a Concentração Inibitória Mínima (MIC) por microdiluição em caldo, descrito por Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Os extratos foram testados para sucessivas diluições variando 0,25-1024 mg.mL⁻¹. *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), foram incubadas em placas de microdiluição inoculadas a 35 ± 2°C durante 20 horas. A MIC é a concentração mais baixa de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos poços de microdiluição.

4.8 Análise Histológica

Transcorridos os 360 minutos da administração oral no ensaio de toxicidade aguda, os animais foram eutanasiados e os órgãos (pulmão, coração, fígado, rim, testículo) foram coletados para análises histopatológicas. Biópsias desses órgãos foram recolhidas e fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% em PBS 0,1 mol.L⁻¹ a pH 7,4. Após 24hs os tecidos foram lavados para total retirada do agente fixador. Os órgãos foram bissectados longitudinalmente, embebidos em parafina, e, em seguida, cortadas em secções de 10µm. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para as observações de possíveis alterações histopatológicas.

4.9 Análise estatística

Todos os resultados farmacológicos foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM), depois foi submetido à análise de variância (ANOVA) com teste a posteriori de Tukey, com um nível de significância mínimo de p<0,05 em todas as análises (Prisma USA).

5 RESULTADOS

5.1 Análise química do SOL

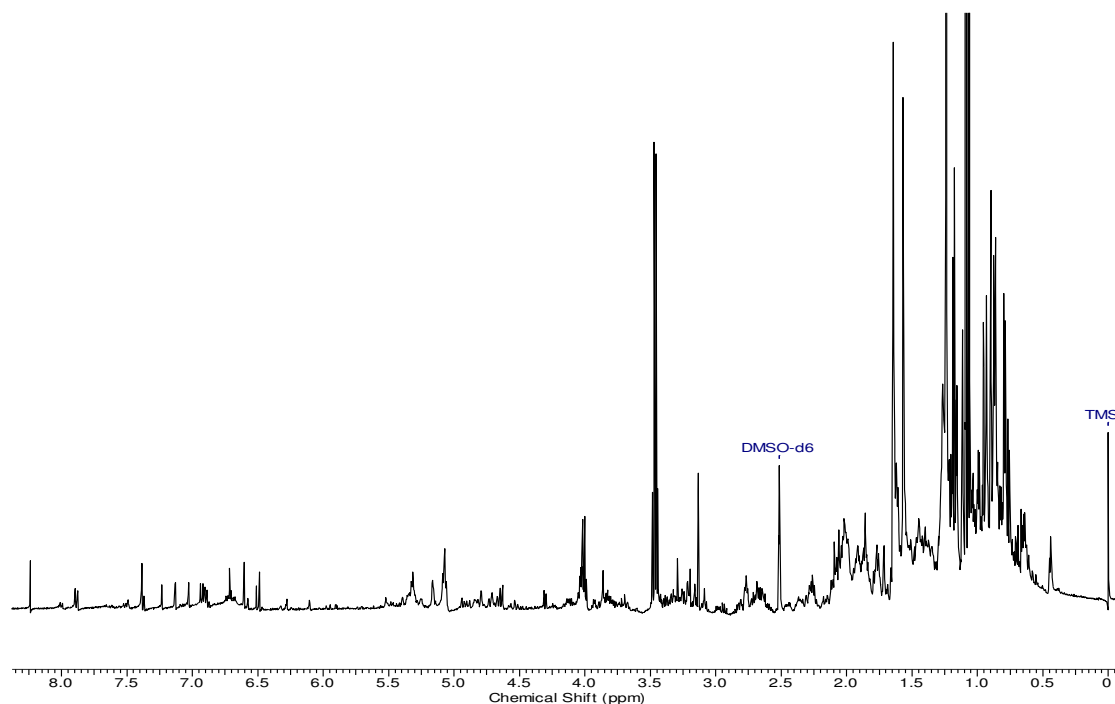
A análise química dos metabólitos secundários da *Spiranthera odoratissima* foi realizada pelos métodos de: análise por cromatografia em camada delgada (CCD). Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1- Análise por CCD do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima*. (+) Reação positiva; (-) Reação negativa. **Fonte:**ESTRELA, F.N. 2015.

Classe de compostos naturais	SOL
Alcaloides	-
Triterpenoides/ Esteroides	-
Flavonoides/ Terpenoides	+
Taninos	-

O espectro da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos sinais de extrato bruto apresentaram características químicas de compostos alcalóides, cumarinas e limonoides, na região de hidrogênio aromático de 6,0-8,3 ppm, hidrogênio ligado a carbono sp^2 e/ou vizinhos heteroátomos na região de 3,0-5,6 ppm de alcalóides, cumarinas e limonoides. Observou-se também hidrogênio ligado ao carbono sp^3 a presença dos compostos esteróides, terpenos e limonoides na região de 0,5-3,0 ppm (Figura 3). Estes dados estão de acordo com as classes de produtos naturais encontrados na literatura.

Figura 3 - ^1H RMN perfil cromatográfico do extrato *S. odoratissima*. **Fonte:** TEREZAN, A.P. 2016. (Laboratório de química- Universidade Federal de Goiás- Campus Catalão).



5.2 Análise da toxicidade

Antes de avaliar os efeitos farmacológicos do SOL, a toxicidade aguda do extrato foi testada em camundongos Swiss machos. A Tabela 2 mostra, respectivamente, a evolução ponderal e o peso de órgãos vitais dos animais submetidos à administração oral subaguda. O estudo observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na progressão dos pesos corpóreos nem nos pesos dos órgãos para todos os grupos. Nenhuma anormalidade macroscópica foi detectada nos órgãos avaliados, também não houve nenhuma alteração comportamental.

Tabela 2-Efeitos da administração oral do extrato etanólico de folhas da *S. odoratissima* (5000 mg.kg⁻¹) quanto aos parâmetros toxicológicos em camundongos. Resultados expressos em média \pm S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Os resultados são a média \pm S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. **Fonte:**ESTRELA, F.N., 2016.

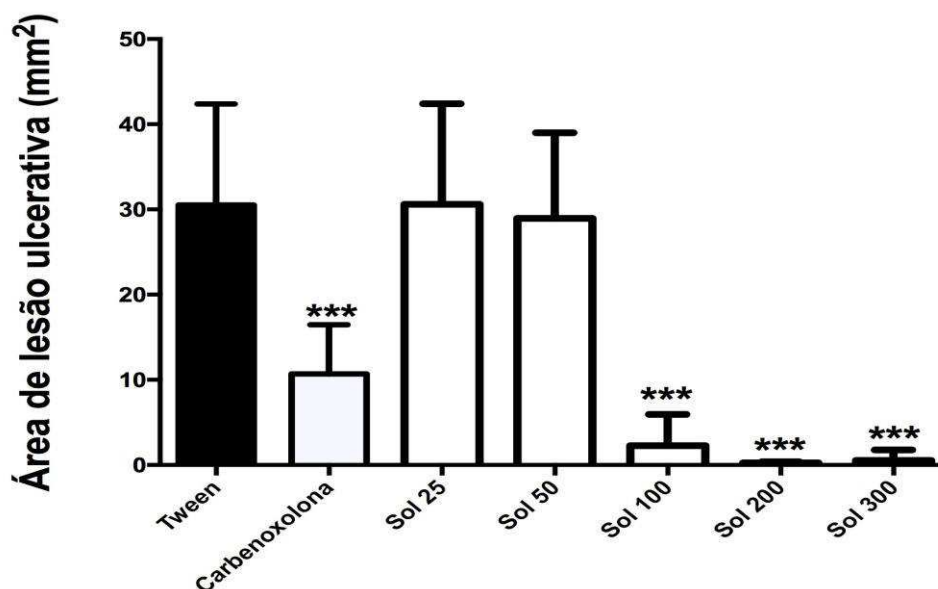
Tratamentos (v.o)	Dose (mg.Kg ⁻¹)	N	Fígado	Coração	Pulmão	Rim	Testículo	Morte
Tween 12%	-	10	2.11 \pm 0.32	0.24 \pm 0.02	0.31 \pm 0.03	0.80 \pm 0.08	0.29 \pm 0.03	0
SOL	5000	10	2.30 \pm 0.32	0.23 \pm 0.02	0.31 \pm 0.03	0.78 \pm 0.12	0.31 \pm 0.05	0

5.3 Atividade antiulcerogênica

5.3.1 Modelo de úlcera gástrica aguda induzida pelo etanol e DAINES

O SOL inibiu de forma estatisticamente significativa as lesões ulcerativas induzidas por etanol nas doses de 100, 200 e 300mg.kg⁻¹, estas inibições foram de 93, 99 e 99%, respectivamente, em relação ao grupo tratado com Veículo 100 mL.kg⁻¹. Esses percentuais de proteção ficaram evidentes nas fotos dos grupos desafiados com etanol. O controle negativo apresentou extensivos sinais hemorrágicos (Figura 6) enquanto que o grupo tratado com SOL (100, 200 e 300 mg.kg⁻¹) não apresentou sinais hemorrágicos. A dose de 100 mg.kg⁻¹ é a menor dose mais efetiva, esta dose foi selecionada para os demais ensaios (Figura 4).

Gráfico 1-Efeitos do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* em modelos de lesões gástricas induzidas pelo etanol em ratos. Resultados expressos em média \pm S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p<0,01$. *** $p<0,001$ representa a diferença significativa do grupo controle. **Fonte:**ESTRELA, F. N., 2016.



Com a dose efetiva selecionada, verificou-se a atividade antiulcerogênica do SOL no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina 30 mg.kg⁻¹, uma droga anti-inflamatória não-esteroidal. A administração do SOL 100 mg.kg⁻¹ inibiu significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas por indometacina 30 mg.kg⁻¹ em 73% (Figura 5.). Adicionalmente, é possível analisar macroscopicamente os estômagos nos diferentes grupos, onde o grupo negativo apresentou várias regiões com necroses decorrentes da ação da indometacina. Por outro lado, estes pontos necróticos são visualizados em menor quantidade no grupo tratado com SOL (100 mL.kg⁻¹) (Figura 7).

Gráfico 2 - Efeito do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* no modelo de lesões gástricas induzidas pela indometacina em ratos. Resultados expressos em média \pm S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa do grupo controle. **Fonte:** ESTRELA, F. N., 2016.

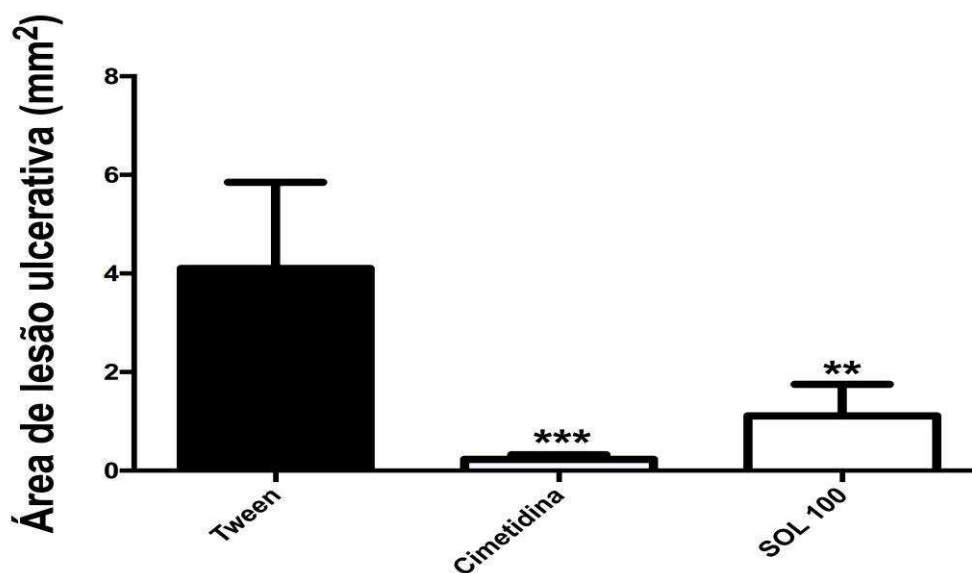


Figura 4- Estômagos de ratos submetidos à úlcera gástrica induzida por etanol. **Fonte:** ESTRELA, F. N., 2016.

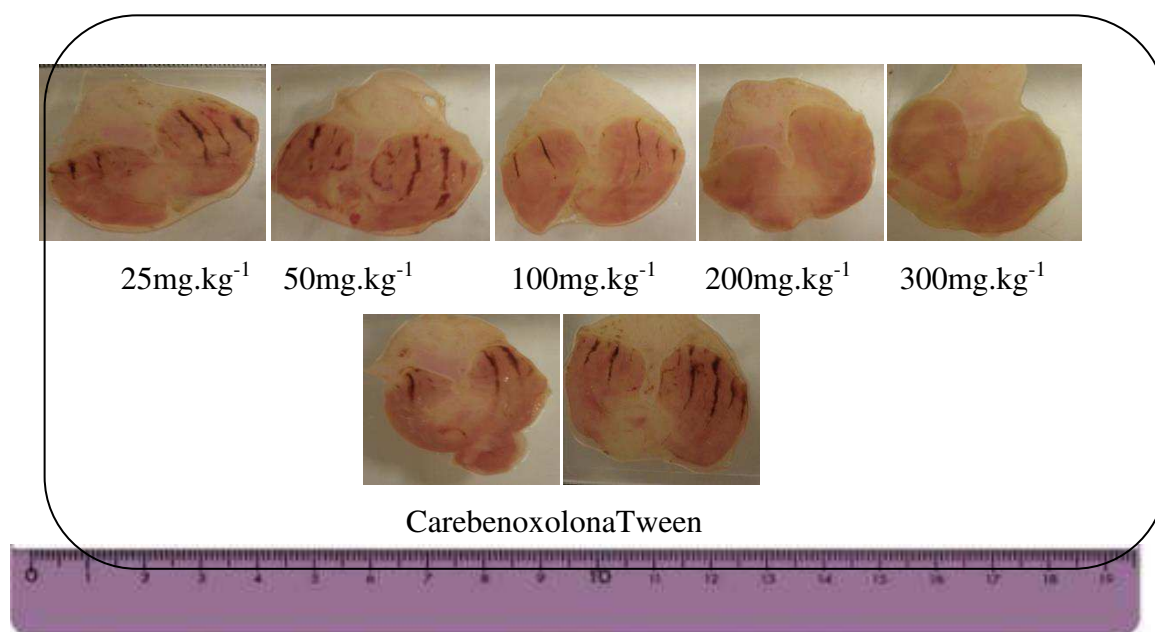
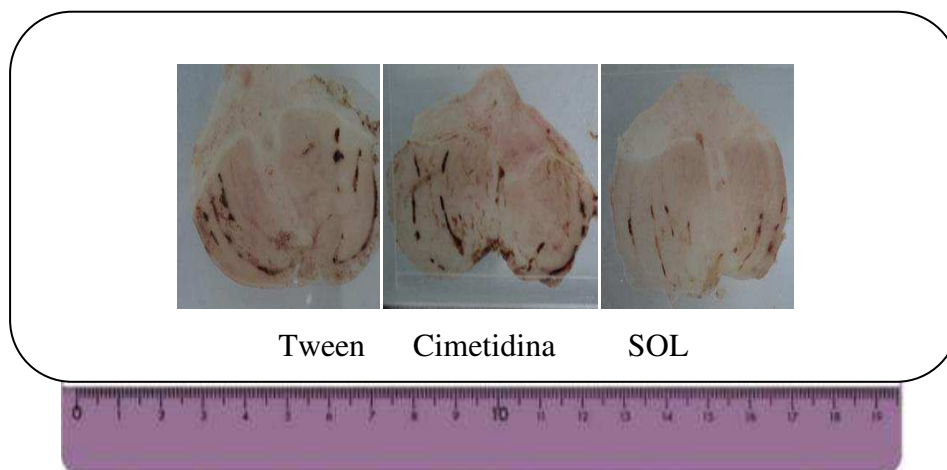


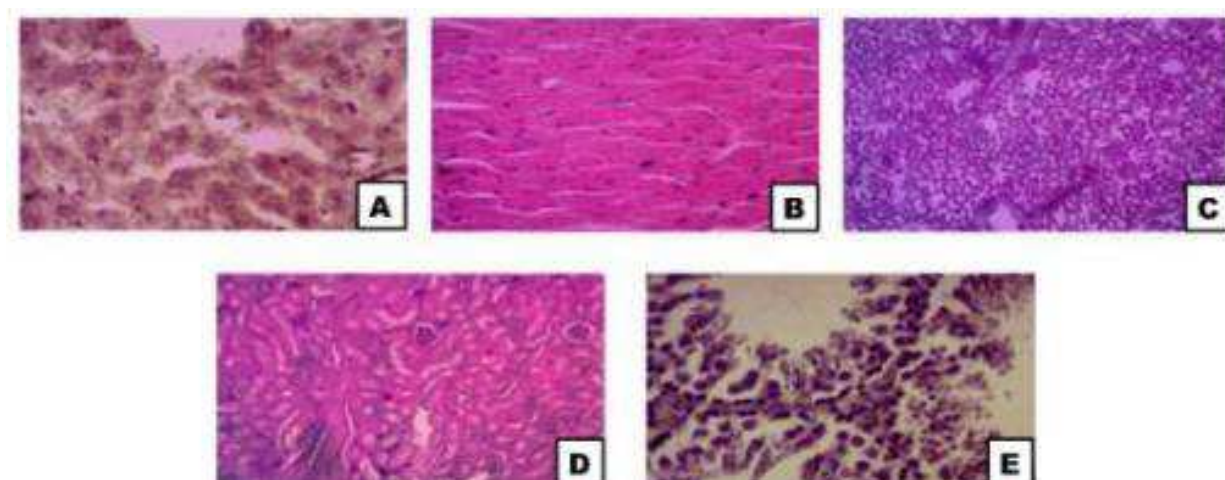
Figura 5-Estômagos de ratos submetidos à úlcera gástrica induzida por indometacina.
Fonte: ESTRELA, F. N., 2016.



5.4 Análise Histológica

Análises histológicas não detectou nenhuma anormalidade nas lâminas dos órgãos de animais tratados com SOL (5000 mg.kg^{-1}) quando comparado com animais tratados com o grupo Veículo (Figura 8).

Figura 6-Fotomicrografia de secções dos órgãos coletados - Fígado (A), Coração (B), Pulmão (C), Rim (D) e Testículo (E) dos camundongos tratados com o extrato de *S. odoratissima* 5000 mg.kg^{-1} (H & E $\times 400$). **Fonte:** ESTRELA, F. N., 2016.



5.5 Atividade antimicrobiana

Neste estudo, também foi avaliado a atividade antimicrobiana *in vitro* de SOL. Os ensaios antimicrobianos realizados com cepas de *E. coli*, *S. Aureus* e *P. Aeruginosa*, demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* não tem atividade antimicrobiana nas cepas avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3-Concentração Mínima Inibitória do extrato etanólico de folhas de *S. odoratissima*. MIC = concentração inibitória mínima. **Fonte:** ESTRELA, F. N., 2016.

Microorganismos	SOL MIC($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1024
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>1024
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	>1024

6 DISCUSSÃO

Produtos naturais são ricas fontes de compostos promissores para a descoberta de novos fármacos, o interesse em produtos naturais derivados de plantas está crescendo significativamente no mundo inteiro (HARVEY et al., 1999; DUTRA et al., 2016). Estes estudos com plantas medicinais tem trazido grandes contribuições para produção de fármacos já utilizados comercialmente, incluindo a efedrina da *Ephedra sinica*, digitoxina da *Digitalis purpurea*, salicina da *Salix alba* e a reserpina da *Rauwolfia serpentina* (RASTOGI et al., 2015).

A espécie *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil., (Rutaceae), popularmente conhecida como manacá, é utilizada na medicina popular no Brasil para o tratamento de doenças renais ou hepáticas, distúrbios estomacais, dores de cabeça e reumatismo (NASCIMENTO et al., 2012; GALDINO et al., 2012), ainda não havia nenhum estudo sobre a prevenção e tratamento de úlceras gástricas.

Considerando a relevância da inserção do uso plantas medicinais e a possíveis reações adversas decorrentes do seu uso, o equilíbrio entre a terapêutica e os efeitos toxicológicos é um parâmetro importante para avaliar a sua aplicabilidade em relação à ação farmacológica.

Inicialmente foi realizado o teste geral de atividade farmacológica, (Anexo A) este teste é considerado o primeiro passo na pesquisa sobre a atividade farmacologia de qualquer substância, seja ela de origem vegetal ou sintética, bem como frações, preparações ou extratos obtidos de plantas medicinais (IRWIN, 1968).

A análise macroscópica e comportamental dos animais tratados com uma única dose oral de SOL (5000 mg.kg⁻¹) não apresentaram quaisquer sinais visíveis, de toxicidade ou de mudança de comportamento em camundongos do machos (p> 0,05). Durante os 5, 10, 20, 30, 60, 240 e 360 minutos após a administração deste extrato, nenhum animal morreu e os órgãos (coração, pulmão, rim, fígado, testículo) foram analisados (Figura 8). Este ensaio permitiu a continuação dos testes. De acordo com Loomise Hayes (1996), consideram que substâncias testadas na dose de 5000 mg.kg⁻¹ e que não apresentam sinais de toxicidade, são praticamente não tóxicas.

Vários aspectos podem estar envolvidos na patogênese da úlcera gástrica, logo para manter a integridade funcional da mucosa gástrica faz-se necessário o

equilíbrio entre fatores agressores e mecanismos protetores da mucosa (CUEVAS et al., 2011; TAKAYAMA et al., 2011; de ALMEIDA et al., 2012).

De forma a corroborar para as pesquisas, bem como elucidar os mecanismos envolvidos na patologia da úlcera gástrica aguda, o modelo de lesão gástrica induzida pelo etanol tem sido utilizado como ferramenta para estudar efeitos gastroprotetores de diferentes compostos. O modelo não representa integralmente a patologia humana, considerando que as lesões gástricas em roedores são superficiais, múltiplas e induzidas por diferentes mecanismos, contudo, este modelo continua sendo de suma importância e amplamente utilizado em estudos experimentais (POTRICH, 2009).

A atividade gastroprotetora do SOL foi caracterizada nos modelos de indução de lesões por agente necrotizante (etanol) e pela droga anti-inflamatória não-esteroidal (DAINEs) indometacina, uma vez que seu uso crônico está relacionado com a etiologia das úlceras gástricas no homem (MURATA et al., 2011; LEMOS et al., 2011).

O consumo de álcool pode gerar a formação das lesões gástricas de origem multifatorial que inclui dano ao DNA, decréscimo nos níveis de glutathione total e peroxidação lipídica nas células da mucosa gástrica (REPETTO e LLESUY, 2002; VAZQUEZ-RAMIREZ et al., 2006; MADALOSSO et al., 2011). Estão relacionados também, ao desenvolvimento de erosão gástrica hemorrágica, edema da mucosa, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (MATSUHASHI et al., 2007).

O etanol é caracterizado como um agente necrotizante de ação direta na mucosa gástrica, induzindo lesões gástricas através do rompimento da barreira muco-bicarbonato, danos no endotélio vascular, desordem da microcirculação e isquemia, com consequente produção de radicais livres. O etanol também induz degranulação de mastócitos e inibição da síntese de prostaglandinas (PAN et al., 2008). Assim, a sua supressão no estômago é um evento crítico para o desenvolvimento da lesão da mucosa após a administração de DAINE.

Vale ressaltar que o etanol, apesar de agir de forma rápida no estômago, reduzindo a camada muco-bicarbonato e deixando, assim, a mucosa susceptível aos danos causados pelo próprio etanol e pelo ácido gástrico, é depletado rapidamente, bem como a integridade da mucosa é rapidamente restabelecida. Estes eventos também são vistos em humanos. No entanto o que ocorre, tanto no modelo experimental quanto em humanos é que o volume e velocidade de ingestão de álcool

são maiores que a capacidade do sistema em inativar o etanol e restaurar a integridade da mucosa, o que resulta nos danos observados experimentalmente.

Os grupos tratados com SOL, nas doses de 100, 200 e 300 mg.kg⁻¹, protegeram a mucosa gástrica contra as lesões, inibindo estas em 93, 99 e 99%, respectivamente. O grupo controle positivo, carbenoxolona, reduziu as lesões gástricas com percentual de inibição de 65%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com o SOL nas três doses estudadas (Figura 4). Considerando que a patofisiologia deste modelo envolve mecanismos de citoproteção da mucosa como a barreira de muco-bicarbonato (MORIMOTO et al., 1991, LUIZ-FERREIRA et al., 2010), o tratamento com SOL pode aumentar a secreção de muco e bicarbonato na mucosa estomacal.

A citoproteção gástrica consiste nas secreções de muco e de bicarbonato para o lúmen gástrico; as prostaglandinas (PGs) medeiam vários aspectos fisiológicos desta defesa da mucosa. Assim, a sua supressão no estômago é um evento crítico para o desenvolvimento da lesão da mucosa após a administração de DAINES.

O dano gástrico provocado pela administração de DAINES, classe de fármacos que inibem a produção de PGs, é atribuída à diminuição das secreções de muco e bicarbonato, bem como diminuição do fluxo sanguíneo e aumento da retrodifusão do ácido clorídrico e inibição do reparo da mucosa lesionada.

No modelo de úlcera gástrica induzida pela indometacina, SOL(100 mg.kg⁻¹) reduziu significativamente a ocorrência de úlceras (73% de inibição),(Figura 5), reforçando que o seu efeito citoprotetor pode ser mediado pelo aumento na produção de prostaglandina. De fato, alguns estudos publicados mostram que as classes de compostos que se encontram no extrato SOL modulam fatores protetores das mucosas, tais como a secreção de muco (BIGHETTI et al., 2005; ZANATTA et al., 2009; SINGH et al., 2015).

A identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)¹H das classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* foi baseado em características químicas a partir de dados da literatura dos compostos presentes nesta espécie. Estudos químicos anteriores sobre esta espécie relataram o isolamento de furoquinolina, 2-arylquinoli-4-ona e p-indoloquinazolina, alcalóides, limonoides e cumarinas (de JESUS FREITAS et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005; TEREZAN et al., 2010). Além disso, polyprenylated acylphloroglucinols, um sesquiterpeno, juntamente com sesamina e β -sitosterol foram isolados a partir do

extrato de acetato de etila das folhas desta mesma espécie (CARNEIRO ALBEMAZ et al., 2012).

A Cromatografia em camada delgada (CCD) (Tabela 1) é uma análise qualitativa, nesta foi encontrada a presença dos compostos: flavonoides e terpenoides, portanto, os resultados, mesmo que divergentes, como para taninos, alcaloides, cumarinas, têm por função a geração de conhecimento da possível constituição química da espécie, para estudos químico-biológicos posteriores.

Repetto e Llesuy (2002) relatam que flavonóides, triterpenos e taninos podem ser considerados potenciais compostos ativos contra lesões gástricas, agindo como fatores protetores ou aumentando a atividade antioxidante. Há diversos trabalhos na literatura descrevendo atividade antiulcerogênica de extratos vegetais ricos em compostos fenólicos, em diferentes modelos experimentais (de-FARIA et al., 2012).

As infecções intestinais mais comuns que induzem a diarreia aquosa aguda em cerca de 80% das pessoas são aquelas causadas pela *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (HUNTER et al., 2010).

A resistência a agentes antimicrobianos têm ganhando cada vez mais relevância frente a cepas de bactérias multirresistentes. Para tanto, requer não somente a pesquisa para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, mas também para o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas. Logo, a busca de extratos e substâncias de plantas com propriedades antibacterianas tem sido incentivada e intensificada (MIGUEL; MIGUEL, 2000).

O presente estudo não apresentou atividade antimicrobiana para as cepas padrão avaliada. Segundo critério adotado por Holetz et al., (2002), MIC inferior a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados bons; $500\text{-}100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pode ser considerada moderada; $500\text{-}1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ é considerada fraca; e mais de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inativo. O extrato etanólico da espécie *S. odoratissima* apresentou MIC de $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando atividade antimicrobiana não-efetiva para essas Cepas padrão em estudo (Tabela 3). No Brasil, pesquisas sobre produtos naturais com atividades antimicrobianas vêm aumentando significativamente nos últimos anos. Apesar da rica biodiversidade, ainda há um baixo número de estudos diante da importância que alguns micro-organismos apresentam na clínica (DUARTE, 2006).

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* confirmaram a indicação popular para o tratamento de úlceras gástricas. A prospecção química revelou a presença dos compostos fenólicos, como flavonoides, terpenoides. Estes resultados sugerem ainda que o potencial gastroprotetora da *S. Odoratissima* se deu, provavelmente, pela presença destes compostos que ativaram os mecanismos de defesa da mucosa gástrica contra fatores agressivos. Además, este estudo também motiva novas investigações para melhor elucidar sua ação, bem como avaliar os mecanismos de citoproteção envolvidos e o papel dos compostos ativos presentes em SOL.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos com SOL são promissores devido à significativa proteção contra úlcera gástrica induzida por diferentes agentes, no entanto, estudos adicionais ainda são necessários. São perspectivas do trabalho com SOL:

- Estudos adicionais de toxicidade;
- Avaliar o potencial antiulcerogênico dos compostos majoritários do óleo essencial da *S.odoratissima*, bem como seus possíveis mecanismos de ação;
- Desenvolvimento de metodologias gastroprotetoras;
- Avaliar outros possíveis mecanismos envolvidos na atividade antiulcerogênica;
- Avaliar outras Cepas bacterianas para melhor elucidar a atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, et al. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation, An overview. **Journal Physiology**, Paris, n.95, p.105-127, 2001.
- ABOUL-ENEIN, H.Y.; KŁADNA, A.; KRUK, I. Radical scavenging ability of some compounds isolated from Piper cubeba towards free radicals. **The Journal of Biological and Chemical Luminescence**, Europa, v.26,n.3, p.202-7, 2011.
- AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Etnopharmacology**, São Paulo, v.74, p. 113-123, 2001.
- ALBERNAZ, L.C. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, v.131, p.116-121, 2010.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖN, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, Londres, v.288, p.1 –19, 2005.
- ALMEIDA, S.P. et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina, DF: **EMBRAPA-CPAC**, Brasília, p.464,1998.
- ALMEIDA, R.N.; BARBOSA,-FILHO, J.M.; ANTONIOLLI, A.R. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.80, n.3/4, p.72-6, 1999.
- ALVARENGA, F.L. **Avaliação da Toxicidade pré-clínica da *Hovenia dulcis***. 2012, 168 f. Tese (Doutorado em Bóquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.2012.
- AL-SHABANAH, O.A. et al. Effect of khatamines and their enantiomers on aspirin, indomethacin, phenylbutazone and reserpine induced gastric ulcers in rats. **ResearchGate**, São Francisco, v.14, p.81-94, 1993.
- ALVES, T.M.A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.95, p.367-373, 2000.
- ARAUJO, D.A.O. **Avaliação da gastroproteção do óleo essencial do *protium heptaphyllum march* (Burseraceae) bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos em modelos de úlcera gástrica em ratos**.2012, 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas.agosto, 2012.
- BAGGIO, C.H. et al. Antiulcer effect of *Achillea millefolium* L. extracts. In: SINGH, V.K.; GOVIL, J.N.; AHMAD, K.; SHARMA, R.K. Recent Progress in Medicinal Plants. Texas, **USA: Studium Press**, Texas, p. 235-251, 2005.

BAKER, M.E. Licorice and enzymes other than 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: an evolutionary perspective. **Steroids Journal**, São Paulo, v.59, n.2, p.136-141,1994.

BARBASTEFANO, V. et al. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs.**Fitoterapia**, São Paulo, v.78, p.545-551.2007.

BARBASTEFANO, V. **Atividade antiulcerogênica de extratos brutos, frações empurificadas e substância ativa de duas espécies do gênero *Vernonia*: *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea***. 2007, 100f., Tese (Tese em Biologia Funcional e Molecular)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2007.

BARBOSA, D.B.M. **Estudo do efeito antinociceptivo e/ou anti-inflamatório das folhas de *Spiranthera odoratissima* st.-hil. (manacá) - possível mecanismo envolvido**.2010, 94 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.

BAYIR, Y. et al. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid.**Phytomedicine**, São Paulo, v. 13, p. 584–590, 2006.

BEECHER, G.R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **The Journal of Nutrition**, Guiné, p.3248S – 3254S, 2003.

BERSTAD, K.; BERSTAD, A. Helicobacter pylori infection in peptic ulcer disease.**Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Escandinávia, v.28, p.561-567, 1993.

BIGHETTI, A.E. et al. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, São Paulo, v.12, p.72-77, 2005.

BRAGA, T. V. **Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson e C. E. Jarvis subsp *verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante**.2008, 175 f., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, São Paulo, 2008.

BRITO, A.R.M.S. How to study pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries.**Journal of Ethno-pharmacology**, São Paulo, v. 54, p. 131-138, 1996.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – Polish achievements.**Journal of Physiology and Pharmacology**, Canadá, v.54, n.3, p.99-126,2003.

BRZOZOWSKI, T.; Konturek, P. C.; Konturek, S. J.; Brzozowska I.; Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation.**Journal of Physiology and Pharmacology**, Canadá, v.56,n.5,p. 33-55, 2005.

BRZOZOWSKI, T. et al. Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defense. **Inflammopharmacology**, Europa, v.13, n.1-3, p. 45–62, 2005 b.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. United States of America: McGraw-Hill Companies, Inc., Nova Iorque, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, São Paulo, n.94, p.223-253, 2004.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, Nova Iorque, v.36, p. 1007 -1023, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CARLINI, E.A. **Farmacologia sem aparelhagem**. São Paulo: Savier, 1972.

CASTRO, L.P. et al. **Úlcera Péptica Gastroduodenal** : Tratado de clínica médica. 2. ed. São Paulo: ed. Roca, 2009.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, n.21, p.99 – 105, 1998.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, p.13926-13931, 2002.

CHEN, X. et al. Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species. **Chemical Society Reviews**, São Paulo, 2011.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **Journal of Physiology**, Paris, v. 95, n. 1-6, p. 253-6, Jan-Dec, 2001.

COSTA, A. F. et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p.502-505, ago-set, 2010.

CUEVAS, V.M. et al. Effects of grape seed extract, vitamin C, and vitamin E on ethanol- and aspirin induced ulcers. **Advances in Pharmacological Sciences**, Nova Iorque, 2011. Doi:10.1155/2011/740687

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

- d'ACCAMPORA, J.A. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perfurada atendidos no centro cirúrgico do Hospital Florianópolis. **Revista do Médico Residente**,Paraná, v.10, p.141-146, 2008.
- de ALMEIDA, A.B.et al. Anti-ulcerogenic mechanisms of the sesquiterpene lactone onopordopicrin-enriched fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): role of somatostatin, gastrin, and endogenous sulphydryls and nitric oxide. **Journal of Medicinal Food**, Alabama,n.15, p.378-383, 2012.
- deFARIA, F.M.et al. Antioxidant action of mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. **The Scientific World Journal**, Nova Iorque, 2012. Doi: 10.1100/2012/327071.
- deFONESKA, A.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, Nova Iorque, n.26, p.604–610, 2010.
- de LA CRUZ, M. G. Plantas Medicinais de Mato Grosso: a farmacopéia popular dos raizeiros. **Caniato**, Cuiabá: Carlini; 2008.
- de JESUS FREITAS, C.M.et al. Coumarins, furoquinoline alkaloids and terpenes from *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**,São Paulo,v.31, p. 805-807, 2003.
- DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract.**British Journal of Pharmacology**,México, v.149, p.611-623, 2006.
- DUARTE, M.C.T. et al. Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**,São Paulo, n.97, p.305-311, 2005.
- DUARTE,T.C.M. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil.**Revista MultiCiencia**, São Paulo, outubro,2006.
- DUTRA, R.C.et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, São Paulo,Jan., 2016.pii: S1043-6618(16)00023-2. Doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021. [Epub ahead of print].
- DUTRA, R. C. et al. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian**,Curitiba, v.19, n.2^a, p.429-435, Abr./Jun. 2009.
- DZUBAK, P. et al.Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports**,Washington, v.23, n.3, p.394-411, 2006
- ELLIOTT, S.N.;WALLACE, J.L. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. **Journal of Gastroenterology**,Japão,n.33, p.792-803, 1998.

FALCÃO, H. DE S. et al. Gastric and Duodenal Antiulcer Activity of Alkaloids: A Review. **Molecules**, Pequim, v.13, p. 3198-3223, 2008.

FAN, T. et al. Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. **World Journal of Gastroenterology**, Washington, v. 11, n. 8, p. 1204-1209, 2005.

FABROWSKI, F.J. **Eucaliptus smithii R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba, 2002, 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2002.

FERRONATTO, R. **Análise química e antimicrobiana do óleo essencial de Helietta apiculata Benth. (Rutaceae)**. 2010, 60f. Dissertação (Mestre em Ciências Ambientais)-Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Chapecó. fevereiro, 2010.

FLORÃO, A. **Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de Baccharis, Asteraceae**. 2006, Paraná, 82f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

FORBES, V.E.; FORBES, T.L. Ecotoxicology in theory and practice. Chapman and Hall, Londres, p.247, 1994, apud LIMA, J.M. et al. Prospeção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.27, n.1, p.7-11, 2009.

FORNAI, M. et al. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Buenos Aires, v.372, p.79–87, 2005.

GALDINO, P. M. et al. Espécies vegetais do cerrado, avaliadas no laboratório de Farmacologia de produtos naturais – ICB - UFG, quanto ao potencial antiinflamatório de seus extratos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. IV, n. 2, p. 103-106, 2007.

GALDINO, P.M. et al. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, São Paulo, n.38, p. 276-284, 2012.

GARNER, A. et al. Gastric-mucosal protective mechanisms - Roles of epithelial bicarbonate and mucus secretions. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Escandinávia, v.19, p.79-86, 1984.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2007.

GOEL, R.K.; SAIRAM, M. K. Antiulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasna*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. **Indian of Journal Pharmacology**, Mumbai, n.34, p.100–110, 2002.

- GUDIS, K; SAKAMOTO, C. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. **Digestive Diseases and Sciences**, Berlim, v.50, p.S16-S23, 2005.
- GURIB-FAKIN, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, São Paulo, v. 27, p. 1–93, 2006.
- GUSTAVSSON, S.; NYREN, O. Time trends in peptic-ulcer surgery, 1956 to 1986 - a nation-wide survey in Sweden. **Annals of Surgery**, Nova Iorque, n.210, p.704-709, 1989.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 715-723, 1997.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? Trends in Pharmacological. **Sciences**, Washington, v.32, n.3, p.125-30, 2011.
- HAM, M.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, Washington, v.23, p. 607– 616, 2007.
- HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **TiPS**, São Paulo, v.20, p. 196-198, 1999.
- HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology e Therapeutics**, São Paulo, v.96, n.67, 2002.
- HAYDEN, L.J.; THOMAS, G.; WEST, G.B. Inhibitors of gastric lesions in the rat. **European Journal of Pharmacology**, França, v.30, p.244-246, 1978.
- HIRANO, H. et al. Gastric-mucous membrane protection activity of coptisine derivatives. **Biological and Pharmaceutical**, Japão, v. 24, p.1277-1281, 2001.
- HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.97, p.1027-1031, 2002.
- HUNTER, P.A. et al. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing practices and policies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, n.65, p.13–17, 2010.
- IRWIN, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. **Psychopharmacologia**, Washington, v.13, n.3, p.222-57, 1968.
- JAHOVIC, N. et al. Gastric protection by α -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. **Life Sciences**, São Paulo, v. 80, p. 1040 - 1045, 2007.

- KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Massachusetts, v.15, p.D1-6, 2000.
- KERR, M.G. Exames laboratoriais em Medicina Veterinária. Bioquímica Clínica e Hematologia. 2ed. São Paulo: **Roca**, parte II, p.81-163, 2003.
- KONTUREK, P.C. et al. Melatonin affords protection against gastric lesions induced by ischemia-reperfusion possibly due to its antioxidant and mucosal microcirculatory effects. **European Journal of Pharmacology**, Paris, v.322, p.73-77, 1997.
- KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; OCHMAŃSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **European Journal of Pharmacology**, Paris, n.19, p.1527, 2004.
- KONTUREK, S.J. et al. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; nobel prize for achievements in gastrology during last century. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Canadá, v. 56, n. 4, p. 507-530, 2005.
- KUROSE, I. et al. Oxidative stress - mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication., **Hepatology**, São Paulo, v. 25, n. 2, p.368-378, 1997. Doi:10.1053/jhep.1997.v25.pm0009021949.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. **Gastroenterology**, São Paulo, v.135, p.41-60, 2008.
- LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v. 10, S2:S4, 2008.
- LEMOS, M. et al. Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, v.138, n.2, p.503-7, 2011.
- LEWIS, J. H. Safety profile of long- term H₂ –Antagonist therapy. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, Massachusetts, v.5, p.49-57, 1991.
- LIN, M. et al. In vitro antiHIV activity of bioflavonoids isolated from *rhus succedanea* and *garcinia multiflora*. **Journal Natural Products**, Washington, v.60, p.884-8, 1997.
- LOOMIS, T.; HAYES, A.W. Loomis's Essentials of Toxicology, 4th edition, 1996.
- LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.D.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.D.S. Flavonóides. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, v.3, 2010.
- LUIZ-FERREIRA, A. et al. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Molecules**, Nova Iorque, v.15, p.7153-7166, 2010.
- MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C; VEIGA, V.F. JR. Plantas Medicinais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

- MADALOSSO, R.C. et al. Campomanesia lineatifolia Ruiz e Pav. as a gastroprotective agent. **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, 2011.
- MAHASNEH, A.M.A.; ADEL, M.A.; EL-OQLAH, A.A.B. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, v.64, n.3, p.271-276, 1999.
- MAIMONE, T. J. e BARAN, P.S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature Chemical Biology**, Washington, v.7, n.3, p.396-407, 2007.
- MALVEZZI, K.C. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudos dos extratos brutos e suas associações**. 2010, 113f. Tese (Doutor em Ciências em Biotecnologia Industrial na área de concentração: Conversão de Biomassa)- Lorena, São Paulo, 2010.
- MANN, J. et al. Natural products: their chemistry and biological significance. Nova Iorque, **Essex: Addison Wesley Longman**, p. 389-395, 1993.
- MARCANO, D.; HASEGAWA, M. Fitoquímica orgânica. 2.ed., Venezuela: **Editorial Torino**, 2002.
- MARCOLIN, M. A.; CANTARELLI, M. G.; GARCIA JUNIOR, M. Interações farmacológicas entre medicações clínicas e psiquiátricas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v.31, n.2, p.70-81, 2004.
- MATTEI, R.E.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central: modelos animais em psicofarmacologia. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.138-42, 2006.
- MARTINS, M.B.G. et al. Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* Stapf. (POACEAE) e perfil químico do óleo essencial. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, São Paulo, v. 6, p. 20 – 29, 2004.
- MARTÍNEZ, M.J. et al. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, v.52, n.3, p.171-174, 1996.
- MATOS, L.G. et al. Atividades analgésica e/ou antiinflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá), **Revista Brasileira Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, supl., p. 15-16, 2003.
- MATOS, L.G. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of the ethanolic extract from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (Manacá) roots. **Phytotherapy Research**, Massachusetts, v.18, p.963–66, 2004.
- MATSUHASHI, T. et al. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digestive Diseases and Sciences**, Berlim, v. 52, p. 434 – 441, 2007.

MENDONÇA, M. P. E LINS, L. V. (ORGS). Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. **Fundação Biodiversitas**, Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Brasil, p.160, 2000.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 1. ed. São Paulo: **Robe**, 2000.

MILANI, S.; CALABRO, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microscopy Research and Technique**, Massachusetts, v.53, n.5, p.360-371, 2001.

MILOSAVLJEVIC, T.; KOSTIC-MILOSAVLJEVIC, M.; JOVANOVIC, I.; KRSTIC, M. Complications of peptic ulcer disease. **Digestive Disease and Science**, Berlim, v.29, p.491-493, 2011.

MORIMOTO, Y. et al. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, Tóquio, v.57, p.495-505, 1991.

MURATA, K. et al. Protective Effects of Astaxanthin from *Paracoccus carotinifaciens* on Murine Gastric Ulcer Models. **Phytotherapy Research**, Massachusetts, 2011.

NANJUNDAIAH, S. M.; ANNAIAH, H. N. M.; DHARMESH, S. M. Gastroprotective effect of ginger rhizome (*Zingiber officinale*) extract: role of gallic acid and cinnamic acid in H(+), K(+)-ATPase/H. pylori inhibition and anti-oxidative mechanism. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Nova Iorque, p. 1-13, 2011.

NASCIMENTO, M.V. et al. Anti-inflammatory effect of *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. leaves involves reduction of TNF- α . **Natural Product Research**. São Paulo, v. 26, n. 23, supl. 4, Part 1-2, pp. 2274-2279, 2012.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.4, p. 247-256, 2000.

NAVARRO, V. et al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, v.53, n.3, p.143-147, 1996.

NEWMAN, D. J. e CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Nova Iorque, v.75, n. 3, p.311-335, 2012.

NIIHO, Y. et al. Studies on the gastric antiulcer components from the woods of *Picrasma quassioides* (Simaroubaceae). **Nature Medicine**, Washington v. 48, p.116-121, 1994.

NISHIO, H. et al. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. **Life Sciences**, São Paulo, v. 79, p. 1523–1530, 2006.

NOLDIN, V.F. et al. Phytochemical and antiulcerogenic properties of rhizomes from *Simaba ferruginea* St. Hill. (Simaroubaceae). **Zeitschrift für Naturforschung C.**, Berlim, v. 60, p.701-706, 2005.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models -The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v.28, p.1321-1341, 2005.

OLIVEIRA, A.B. et al. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, Paraná, v.7, n.2, 2007.

OMOTO, T. et al. Antiulcer alkaloids from *Picrasma ailanthus*. **Japanese Kokai Tokkyo Koho**, Tóquio, 1990.

PAIMELA, H.; GODDARD, P.J.; SILEN, W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. **Digestive Diseases and Sciences**, Nova Iorque, v.40, p.2495-2496, 1995.

PAN, J.S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World Journal of Gastroenterology**, Washington, v. 14, p. 5857-5867, 2008.

PARK, J.S. et al. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. **Life Sciences**, Washington, v. 67, p.3087-3093, 2000.

PASRICHA, P.J. **Procinéticos, antieméticos e agentes usados na síndrome do intestino irritável**. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: MacGraw- Hill, 2006.

PESKAR, B.M. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. **Journal Physiology Pharmacology**, Canadá, v.52, p.555–568, 2001.

PETERSON, J. E DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Journal Nutrition Research**, Washington, v.18, n.12, 1998.

PINTO, T.J.A. et al. **Ensaio toxicológico e de inocuidade**. In: Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatados e cosméticos. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p.291, 2000.

PINTO, E. P. P.; AMAROSO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica – Itacaré-BA. **Botânica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 751-762, 2002.

PIRANI, J. R. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.56, s.86, p. 189-204, 2005.

PRISTA, L.N.;ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, São Paulo,1995.v. I, II e III.

POTRICH, F. B. **Atividade gastroprotetora do extrato bruto hidroalcoólico da *achillea millefolium* L.: envolvimento do sistema antioxidante**. 2009, 67f. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2009.

RADÜNZ, L. L., **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata Sprengel*) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds)**. 2004, 90 f., Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.2004.

RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences**,Washington, v. 25, p. 502 – 508, 2000.

RAMAKRISHNAN, K. E.; SALINAS, R. C. Peptic ulcer disease.**American Family Physician**, Nova Iorque, v.76, p. 1005-1012, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**,São Paulo, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RASTOGI, S.; PANDEY, M.M.; RAWAT, A.K. Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. **Phytomedicine**.Nova Iorque, Nov., 2015. pii: S0944-7113(15)00331-1. Doi: 10.1016/j.phymed.2015.10.012. [Epub ahead of print].

REPETTO, M.G.;LLESUY, S.L. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medice for gastric ulcers.**Brazilian Journal of Medical and Biological Reserach**,São Paulo, v.35, p.523-534, 2002.

RIBEIRO, T. A. N.et al. Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. **Journal of the BrazilianChemical Society**, São Paulo, v.16, n. 6B, p.1347-1352, 2005.

RICKLEFS, R. E. **Economia da Natureza**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1996,p. 470.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin – resistant Enterococci.**Journal of Hospital Infection**, São Paulo, v.50, n.2, p.140-144, 2002.

SALLES, A.H. et al. **Horto Medicinal do Cerrado**. 2.ed. Brasília: Jardim Botânico de Brasília,1997,p.33.

SALLES, A.E.H. Jardim Botânico de Brasília. 2007. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/15906526012/in/photolist-dFiwA8-pXfgYD-dFoVm1-qcobNY-qeB71u-8ZVbJA-8ZVbMm-8hrkMX-8c2ybw-dFizT4>

phFb9d-pXfi4K-phFbRq-8c2ygC-qcobyu-koUWHz-7pXqjt-xBWhWD>. Acesso em 12 nov. 2015.

SANDOR, V.; CUPARENCU, B. Analysis of the mechanism of the protective activity of some sympathomimetic amines in experimental ulcers. **Pharmacology**, Paris, v.15, p. 208-217, 1977.

SANIOTO, D.L. **Sistema digestivo: secreção e digestão**. In: Fisiologia, Ed. PorAIRES, M.M., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991.

SANTOS, V. L.et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v.13, n.1, p.68-72, 2011.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, São Paulo, v. 134, p. 1842 – 1860, 2008.

SEIDL, P.R. Prospects for Brazilian natural products. In: **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, p. 239-247, 1999.

SILVA, S.R. **Plantas do Cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. 1. ed. Brasília: Funatura, 1998, p.109.

SILVA, C.C.N. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010, 69 f. Dissertação (Mestre em Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, Botucatu, São Paulo, 2010.

SINGH, R.et al. Cytoprotective and anti-secretory effects of azadiradione Isolated from the seeds of *Azadirachta indica* (neem) on gastric ulcers in rat models. **Phytotherapy Research**, Massachusetts, v.29, p.910-916, 2015.

SOUZA-BRITO, A.R.M. In **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Editora da Unicamp, Campinas, 1994.

SZABO, S. ;VINCZE, Á. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **The Journal of Physiology**, Londres, v.94, p.77-81, 2000.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGLI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, Washington, vol. 103, no. 2, pp. 381-388. 2007.

TEREZAN, A.P.et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.21, p.882-886, 2010.

TAN, P.V.et al. Prophylactic and healing properties of a new anti-ulcer compound from *Enantia chlorantha* in rats. **Phytomedicine**, São Paulo, v.7, p. 291-296, 2000.

TAN, P.V.et al. Synergistic and potentiating effects of ranitidine and two new anti-ulcer compounds from *Enantia chlorantha* and *Voacanga africana* in experimental animal models. **Pharmazie**, Nova Iorque, v.57, p.409-412, 2002.

TANDON, R. et al. Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, Nova Deli, v. 48, n. 1, p. 115-118, 2004.

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. **The Japanese Journal Pharmacology**, Tóquio, v.19,p.418,426. 1969.

TAKAYAMA, C.**Determinação dos mecanismos antiulcerogênicos e antioxidantes do óleo essencial de *hyptis spicigera* lam., lamiaceae.** 2011, 102 f.Dissertação (Mestre em Biologia Funcional e Molecular)- Instituto de Biologia, Campinas, Janeiro, 2011.

TAKAYAMA, C.et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacol.**, São Paulo, v.135,n.1,p.147-55, 2011.

TAKEUCHI, K.et al. Prostaglandin E receptor subtypes involved in stimulation of gastroduodenal bicarbonate secretion in rats and mice. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Polônia, v. 50, p. 155 -167, 1999.

TANAKA, S.et al. Central vagal activation increases mucus gel thickness and surface cell intracellular pH in rat stomach. **Gastroenterology**, São Paulo,v.122, n.2, p.409–417, 1997.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing.**Digestive diseases and sciences**,Paris, v. 50 Suppl 1, p. S24-33, Oct, 2005.

TOMA, W. et al. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacol**, São Paulo, v.95, p.345-351, 2004.

TRAMONTANA, M. et al. Capsaicin-like effect of resiniferatoxin in the rat stomach. **Neuropeptides**, Nova Iorque,v.26, p.29-32,1994.

TRESVENZOL, L. M.et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 3, s. 1, p. 23-28, 2006.

TUROLLA,R.dos S.M. **Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo.** 2004, 131f. Dissertação(Mestre em farmacologia)- Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

UE, A.P.F. et al. Ginecomastia induzida por anti-histamínicos no tratamento da urticária crônica. **Brasileiros de Dermatologia**, São Paulo,v.82, n.3, p.253-6, 2007.

UZUN, H.et al. Potential effects of L-NAME on alcoholinduced oxidative stress. **World Journal Gastroenterology**, Nova Iorque, v. 11, n.4, p.600-604, 2005.

VALEZI, A.C. **Bases Anatômicas**. In: Garrido JAB (Org). Cirurgia da Obesidade. São Paulo: Atheneu, 2002.

VAZQUEZ-RAMIREZ, R.et al. Reversing gastric mucosal alterations during ethanolinduced chronic gastritis in rats by oral administration of Opuntia ficus-indica mucilage. **World Journal of Gastroenterology**, Nova Iorque, v.12, n.27, p.4318-4324, 2006.

VONKEMAN, H.E.; VAN de LAAR, M.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. **Arthritis and Rheumatism**, v.39, p.294-312, 2010. Periodico, Nova Iorque.

WAGNER, K.H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Nutrition and Metabolism**, Suíça, v.47, n.3-4, p.95-106, 2003.

WALLACE, J.L.; Granger, D.N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **The Faseb Journal**, v.10, p.731-740, 1996.

WALLACE, J.L.; MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Experimental Biology and Medicine**, Califórnia, v. 226, p.1003-1015, 2001.

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

WALLACE, J.L.; DEVCHAND, P.R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **British Journal of Pharmacology**, Washington, v.145, n.3, p.275-282, 2005.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, Nova Iorque, v. 88, p.1547 – 1565, 2008.

YAMAZAKI, M.et al. Protective effects of matrine and oxymatrine on stress ulcer in relation to their effects on the central nervous system. **Yakugaku Zasshi**, Berlim, v.104, p.293-301, 1984.

YAMAZAKI, M. The pharmacological studies on matrine and oxymatrine. **Yakugaku Zasshi**, Berlim, v.120, p.1025-1033, 2000.

YAO, X.; FORTE, J.G. **Cell biology of acid secretion by the parietal cell**. Annual Review of Physiology, Nova Iorque, n.65, p.103-31. Review. 2003.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology e Hepatology**, Washington, v.3, 2006.

YUNES, R.A.; CECHINEL, V.F. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó:Argos, 2001.


ZANATTA, F.et al. Gastroprotective activity of alkaloid extract and 2-phenylquinoline obtained from the bark of *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae). **Chemico Biological Interactions**, Londres, v.180, p.312-317, 2009.

ZAYACHKIVSKA, O.S.et al. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Nova Iorque, 56 Suppl, v.1, p.219-231, 2005.


ANEXO A-Ficha para o teste geral da atividade farmacológica

Parâmetros observados	5 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos	60 minutos	4horas	6horas
Contorções							
Motilidade							
Piloereção							
Movimentos							
Esteriotipados							
Ptose palpebral							
Amontoados no canto							
Salivação							
Ereção de cauda							
Apreensão de patas							
Analgesia							
Alienação ambiental							
Convulsões							
Reação de fuga							
Agressividade							
Outras manifestações							
Morte							

ANEXO B-Parecer do comitê de ética para utilização de modelos experimentais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 17 de março de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 001/14

I - Finalidade do projeto: Pesquisa

II - Identificação:

- ☐ **Título do projeto:** EFEITO DE PLANTAS MEDICINAIS PRESENTES NO CERRADO DE GOIÁS SOBRE A DOENÇA ULCEROSA PÉPTICA E INFLAMATÓRIA INTESTINAL.
- ☐ **Pesquisador Responsável/ Unidade:**
 - o Anderson Luiz Ferreira - *Campus Catalão* – Universidade Federal de Goiás
- ☐ **Pesquisadores Participantes:**

Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro	UFG	Ciências Biológicas
Prof. Dr. Karla Graziella Moreira	UFG	Ciências Biológicas
Profa. Dra. Lúcia de Paula	UFG	Ciências Biológicas
Profa. Dra. Vanessa Giselle Pasqualotto Severino	UFG	Bacharel em Química
- ☐ **Unidade onde será realizado:** *Campus Catalão* – Universidade Federal de Goiás
- ☐ **Data de apresentação a CEUA:** 13/01/14

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivos: Encontrar novas substâncias farmacologicamente ativas com potencial terapêutico para o combate e/ou prevenção das úlceras gástricas e da colite experimental.

Justificativa: As doenças inflamatórias intestinais (DII) são distúrbios inflamatórios intestinais idiopáticos que compreendem a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. Uma das fontes de substâncias para uso terapêutico tanto das úlceras quanto das DII são os produtos naturais, originados de plantas, animais, microrganismos ou minerais. Plantas são a base da medicina popular e utilizadas para o tratamento das mais diversas enfermidades. Este estudo pode colaborar com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos visando o aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais, e enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas.

IV - Sumário do projeto:

- ☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
 (Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-7215.
 E-mail: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Método alternativo: Os modelos experimentais com animais têm desempenhado um papel importante na pesquisa que visa compreender a patofisiologia de várias doenças, incluindo a doença inflamatória intestinal (DII) e a úlcera péptica.

Na úlcera péptica eles ajudaram a definir mecanismos básicos de defesa e reparação da mucosa gástrica. Adicionalmente, a base para o entendimento da lesão gástrica após a administração do DAINÉ foi facilitada pela utilização de modelos animais que podem ser correlacionados com a doença em seres humanos (Lee et al., 2000).

Os modelos animais de DII têm sido muitas vezes utilizado para identificar alvos terapêuticos, para testar fisiopatologia da DII e verificar a toxicidade de possíveis candidatos a fármacos (Valatas et al., 2013). Existem semelhanças fisiológicas dos modelos experimentais de DII durante as fases ativas de inflamação intestinal. Além disso, o modelo animal de colite oferece a possibilidade de acompanhar de perto o desenvolvimento da doença nos diferentes estágios da doença (Bamias et al., 2005). Neste contexto, não há dúvidas de que os modelos animais representam ferramentas indispensáveis para estudar a patogênese das úlceras pépticas e das DII.

Número de animais: Considerando que os animais são sanitariamente homogêneos e que as variáveis ambientais serão controladas, diminuindo desta forma a variabilidade amostral, os critérios utilizados para definir a amostra foram aqueles propostos por Eckelman et al. (2007) que determina o número de animais necessários para alcançar significância para $P < 0,05$ para várias diferenças entre o grupo controle e o tratado, com coeficiente de variação máxima de 20%.

☐ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):**

Serão utilizados 349 ratos Wistar machos, com 8 semanas de idade e peso corporal entre 150 a 200g.

☐ **Espécie e número total de animais utilizados:** serão utilizados 349 ratos Wistar.

☐ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:**

Os animais, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Goiás, serão mantidos em câmaras com temperatura controlada (20 ± 2 o. C), alternância de ciclos claro-escuro de 12 horas, além de água e ração ad libitum. Umidade do ar: $45 \pm 15\%$. As trocas das gaiolas serão realizadas duas vezes por semana no período da manhã por uma equipe treinada para esta finalidade.

☐ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:**

Não se aplica

☐ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:**

A metodologia é embasada na literatura e a equipe apresenta experiência para a devida execução da mesma. O projeto é exequível, contando com recursos já aprovados e infraestrutura da Universidade. Os autores descrevem os detalhes do manejo para o bem estar dos animais, e como a eutanásia dos mesmos será realizada pouco tempo após a indução das úlceras, não há a necessidade de maiores informações sobre possíveis sinais de sofrimento impostos pela metodologia, bem como a conduta em caso de constatação desse aspecto.

☐ **Método de eutanásia:**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
(Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



A eutanásia será realizada com CO₂.

☐ **Destino do animal:**

Após a eutanásia adequada dos animais, as carcaças serão destinadas ao Aterro Sanitário de Catalão, conforme acordo firmado entre a UFG – campus Catalão e a Secretaria do Meio Ambiente da Cidade de Catalão.

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

☐ **Quanto a documentos:**

- O processo apresenta todos os elementos necessários para sua análise.
- Possui orçamento detalhado e segundo os pesquisadores, a execução será com verba oriunda do Projeto Universal CNPq aprovado recentemente pelo coordenador do presente projeto.
- Apresenta cronograma adequado.

☐ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:**

Riscos físicos: Eventuais acidentes com materiais perfurocortantes (seringas, agulhas, vidrarias, lancetas).

Os pesquisadores e alunos serão treinados quanto ao manuseio e descarte desses materiais para evitar acidentes.

Riscos Biológicos: Eventuais contaminações com fungos e parasitos no biotério de manutenção. Todos os envolvidos com o projeto deverão utilizar equipamentos de segurança (máscara, luvas, aventais, óculos de proteção) para diminuir as chances de contaminação.

Riscos psicológicos e sociais: A manipulação dos animais nos procedimentos pode gerar riscos psicológicos aos pesquisadores. No entanto, estes são orientados das questões éticas que envolvem estes procedimentos, principalmente aqueles relacionados com a eutanásia.

V - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto APROVADO, smj desta Comissão.

VI - Data da reunião: 17/03/2014

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera

Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Prof.ª Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
(Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com

Pharmacological effect of *Annona coriacea* Mart. and *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil: the Cerrado biome as a source of plants with anti-ulcer activity

Fernanda Neves Estrela^a, Keise Rodrigues Silva^a, Jaciel Costa Moura Vidal^a, Patrícia Fernandes de Souza^a, Leonardo Oliveira Costa^b, Geraldo Sadoyama Leal^a, Lucia de Paula^a, Helder Nagai Consolaro^a, Ana Paula Terezan^b, Vanessa Gisele Pasqualotto Severino^c, Anderson Luiz-Ferreira^{a*}

^aNucleus of Biological Sciences, Institute of Biotechnology, Federal University of Goiás (UFG), CEP 74704-020, Catalão, GO, Brazil.

^bSpecial Academic Unit of Physics and Chemistry, Federal University of Goiás (UFG), CEP 75704-020, Catalão, GO, Brazil.

^cDepartment of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Goiás (UFG), CEP 74690-900, Goiânia, GO, Brazil.

*Correspondence to: Dr. Anderson Luiz-Ferreira, Nucleus of Biological Sciences Institute of Biotechnology, Federal University of Goiás, CEP 75704-020, Catalão, GO, Brazil. e-mail: luiz_ferreira@ufg.br Tel.: +556434415350; fax: +556434415300.

Ethnopharmacological relevance: Medicinal plants from the Brazilian Cerrado are used in folk medicine to treat several diseases such as gastric disorders.

Aim of the study: The present work evaluated the antiulcerogenic and antimicrobial effects of the ethanolic extracts obtained from leaves of two Cerrado plant species.

Materials and methods: The action of ethanolic extracts of *Spiranthera odoratissima* (SOL) and *Annona coriacea* (ACL) were evaluated in experimental *in vivo* models in rodents that simulated this disease in human gastric mucosa. Additionally, a pharmacological study to test antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were also evaluated by microdilution methods.

Results: The pretreated with SOL (100, 200 and 300 mg/kg, p.o.) promoted significant inhibition of mucosal injury (93, 99 and 98% inhibition; respectively). This inhibition also was detected in ACL treatment (50, 100, 200 and 300 mg/kg; 67, 52, 48 and 67% inhibition, respectively). The both extracts SOL (100 mg/kg) and ACL (50 mg/kg) also reduced significantly the formation of gastric lesions induced by indomethacin (73 and 63%, respectively) when compared to animals treated with respective vehicle. The phytochemical profile from SOL and ACL indicated the presence alkaloids as a main constituent of these extracts. ACL but not displayed antimicrobial activities *in vitro*.

Conclusions: *Spiranthera odoratissima* and *Annona coriacea* species present gastroprotective activity, supporting previous claims that its traditional use can treat gastrointestinal disorders.

INTRODUCTION

The species diversity is not evenly distributed across the planet, being Brazil a featured in the world's biodiversity, since it contains the second most extensive biome in South America, the Brazilian Cerrado (BASSO et al., 2005; SANO et al., 2010). The Brazilian Cerrado area, regarded as biodiversity hotspots, covers nearly 2 million km², approximately 23% of the area of Brazil (OLIVEIRA and FREITAS, 2004). Cerrado flora is rich in species containing several chemical compounds with biological activities. In fact, several studies have been shown different activities of medicinal plants present in the Cerrado (da SILVA et al., 2014; PÉRICO et al., 2015; CHARNEAU et al., 2016).

Spiranthera odoratissima A. St.-Hil., (Rutaceae) is popularly known as “manacá” and used in folk medicine in the Brazil, for the treatment of several diseases such as renal and hepatic diseases, headaches, rheumatism and stomachache (NASCIMENTO et al., 2012; GALDINO et al., 2012).

Annona coriacea Mart. (Annonaceae), popularly known as "marolo", has been used as folk medicine for treating parasitoses, inflammation processes and ulcers (SONNET et al., 1971; CASTILLO-JUÁREZ et al., 2009).

Although, ethnopharmacology studies reveals that folk medicinal practices have been used to treat many illness, many still have not been subjected to scientific study to confirm their effectiveness (CARTAXO et al., 2010). Taking into account current concerns over the side effects that are often inevitable and limit clinical utility to treat gastric ulcer (BI et al., 2014), the screening of potential new antiulcerogenic agents as therapeutic alternatives is an important issue. Therefore, we aimed to explore gastroprotective effects promoted by ethanolic extracts obtained from two species, used in folkmedicine. Additionally, we undertook evaluation study of the antimicrobial activity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats ($n = 7$, 150–250 g) from Central Animal House of the Federal University of Uberlândia (CEBA-UFU; Uberlândia, Brazil) were used. The animals were fed a certified Presence (Purina®) diet with free access to tap water under standard conditions of 12 h dark – 12 h light, humidity ($60 \pm 1.0\%$) and temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). Fasting was used prior to all assays because standard drugs or extract treatment were always administered orally (by gavage). Moreover, the animals were kept in cages with raised floors of wide mesh to prevent coprophagy. The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Federal University of Goiás (CEUA/UFG, no. 001/14). Animals were preserved in accordance with behavior ethical statements, which follows the guidelines for animal care prepared by the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA and Brazilian Arouca Law (n° 11.794/2008).

Material plant

Both species were collected and identified by Dr. Helder Nagai Consolaro of Universidade Federal de Goiás (UFG). The *Spiranthera odoratissima* leaves (SOL) were collected in Julio Garcia Road (Brasília, DF, Brazil), a Cerrado region, and a “voucher” was deposited under the number UB 5114 at Brasília University Herbarium (Brasília, DF, Brazil). The *Annona coriacea* leaves (ACL) were collected in the dependencies of the Federal University of Goiás, which is situated in a Cerrado region. The “voucher” was deposited under the number 47919 at Federal University of Goiás (Goiás, GO, Brazil).

Preparation of the extract and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis

The leaves from *S. odoratissima* (2.3 kg) and *A. coriacea* (0.62 kg) were dried carefully by forced air at 45°C and reduced to powder. The powdered dried leaves were extracted with EtOH ($3 \times 9\text{L}$, 7 days each) at room temperature and filtered. The filtered material was concentrated to yield the crude leaves extracts (270 g SOL and 57.5 g ACL). The ethanolic extracts from leaves of *S. odoratissima* and *A. coriacea* were prepared with deuterated solvent for nuclear magnetic resonance (NMR)

analysis. The ^1H NMR spectrum was obtained using Bruker DRX-500MHz spectrometer with dimethyl sulfoxide $-d_6$ (DMSO- d_6) using TMS as internal standard.

Drugs and chemicals

The following drugs were used: Tween 80[®] (Sinth, SP, Brazil), absolute ethanol (Merk, Darmstadt, Germany); cimetidine, carbenoxolone and indomethacin were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). The chemicals used in the buffers and other solutions were all of analytical grade. All drugs and reagents were prepared immediately before use.

Antiulcerogenic activity

Ethanol-induced ulcer

After fasting for 24 h, the experimental groups were submitted to the treatments (p.o.) with vehicle (Tween 80 or saline; 10 mL/Kg), carbenoxolone (100 mg/Kg; positive control), SOL and ACL (25, 50, 100, 200 or 300 mg/Kg) 1 h before induction of gastric injury by absolute ethanol. Animals were euthanized, by CO₂ gas, 1 h after ethanol administration (1mL); the stomachs were opened along the greater curvature, pressed onto a glass plate, and scanned. So that the lesions could be counted aided by the AVSoft program (BARBASTEFANO et al., 2007). The results were expressed as total ulcerated area (mm²) (MORIMOTO et al., 1991).

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)-induced ulcer

Animals were fasted for 24 h. The gastric injuries were induced by oral administration of indomethacin 30 mg/Kg in male rats. The treatments (p.o.) with vehicle (Tween 80 or saline; 10 mL/Kg), cimetidine (100 mg/Kg; positive control), and SOL (100 mg/Kg) and ACL (50 mg/Kg) were carried out 30 min before administration of the NSAID. Four hours after the NSAID administration the animals were euthanized by CO₂ gas and the stomachs were removed for lesion quantification (HAYDEN et al., 1978).

Antimicrobial activity

Microbial susceptibility assays of the SOL and ACL using the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by microdilution in broth, was described by Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). The extracts were sterilized by filtration

in nylon syringe filter 33 mm 0.45 μm and tested for successive 1:2 dilutions range 0.25 to 1024 $\mu\text{g/mL}$. The *S. aureus* ATTC 29213, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were incubate in inoculated microdilution trays at $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 16 to 20 hours. The MIC is the lowest concentration of antimicrobial agent that completely inhibits growth of the organism in the microdilution wells.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm S.E.M. and statistical significance was determined using the graphed Prism Software version 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) by one-way analysis of variance followed by Tukey's test with $p < 0.05$ defined as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Natural products have been a rich source of compounds for drug discovery and the interest in natural products derived from medicinal plants has increased significantly worldwide (HARVEY et al., 2015; DUTRA et al., 2016). Medicinal plants has made many contributions to commercial drug preparations manufactured today including ephedrine from *Ephedra sinica*, digitoxin from *Digitalis purpurea*, salicin from *Salix alba* and reserpine from *Rauwolfia serpentina* (Rastogi et al., 2015).

The effects of the SOL and ACL on gastric ulceration induced by different necrotizing agents in gastric mucosa are summarized in Table 1.

Ethanol causes necrosis of superficial epithelial cells on gastric mucosa and erosion. In addition, it promotes damage in the mucosa result of decreased of the mucus (ABDEL-SALAM et al., 2001; de-FARIA et al., 2012).

The effects of SOL and ACL on ethanol model were tested in rats, and carbenoxolone, a stimulatory agent of the gastric mucus secretion, was used as a positive control. Oral administration of absolute ethanol led to severe lesions in the gastric mucosa in rats. On the other hand, in the SOL (100, 200 and 300) and ACL (50, 100, 200 and 300)-treated groups, protect the gastric mucosal lesions by inhibiting 93, 99 and 98% respectively 67, 52, 48 and 67%. Compared with the control group, the carbenoxolone group reduced the gastric lesions (65%).

Considering that the pathophysiology of this model is involved cytoprotection (MORIMOTO et al., 1991, LUIZ-FERREIRA et al., 2010), SOL and ACL may increases the secretion levels of mucin in the stomach.

The gastric cytoprotection, which consists of mucus and bicarbonate secretion to the gastric lumen; the prostaglandins mediate various physiological aspects of this mucosal defense. Thus, its suppression in the stomach is a critical event to development of mucosal injury after administration of NSAID. The gastric damage is attributed to decreased reduced mucus secretion, mucosal blood flow and bicarbonate secretion, enhanced acid back-diffusion, and inhibition of mucosal injury repair (BARBASTEFANO et al., 2007; LUIZ-FERREIRA et al., 2010).

In NSAIDs-model, the lower effective dose for both species, SOL (100 mg/kg) and ACL (50 mg/kg) significantly reduced ulcer occurrence in the NSAIDs induced model (73 and 63% inhibition; respectively), supporting its cytoprotective effect, which may be mediated by prostaglandin production (Table 1). Other species

of the genus *Annona* (*Annona muricata* L. and *Annona squamosa*) were active against gastric ulcers, increased the mucus secretion and PGE₂ production (YADAV et al., 2011; MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

The phytochemical analysis of both crude extract revealed the presence of alkaloids as a main constituent. It is important to mention that several alkaloids present anti-ulcer activity (de SOUSA FALCÃO et al., 2008). Toma et al., (2004) showed that the alkaloids present in *Senecio brasiliensis* are able to increase mucus secretion and prostaglandin production in gastric mucosa. Zanatta et al., (2009) also showed which alkaloids from *Galipea longiflora* were able to increase mucus secretion.

The most common intestinal infections that induce acute watery diarrhea in approximately 80% of people are caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (HUNTER et al., 2010).

In this study, we also evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of SOL and ACL. The antimicrobial assays showed that the ethanolic extract from leaves of *S. odoratissima* does not have antimicrobial activity presenting inhibitory concentrations ≥ 1000 $\mu\text{g/ml}$ for the Gram-positive and Gram-negative bacteria. On the other hand, the ethanolic extract from leaves of *A. coriacea* showed antibacterial activity against Gram-positive bacteria (MIC = 256 $\mu\text{g/ml}$ against *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria (MIC = 512 against *Pseudomonas aeruginosa*) and (MIC = 512 against *Escherichia coli*) (Table 2). These results are in agreement with that found in the literature with other *Annona* species, Castillo-Juárez and collaborators (2009) showed that the *Annona cherimola* species has a high inhibitory effect of *Helicobacter pylori*.

CONCLUSIONS

The data obtained from ethanolic extracts from leaves of *S. odoratissima* and *A. coriacea* confirmed the traditional medicinal uses for the gastrointestinal disorders. These results further suggest the potential use of both species for its gastroprotective activities, probably by the action of alkaloids present in the composition that activated the defense mechanism of the gastric mucosa against aggressive factors. In view of our results, more investigation of their function could provide insight into the mechanism of gastric cytoprotection and the role of active compounds presents in SOL and ACL.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq—grant number 010977/2013-9, 2014).

REFERENCES

- Abdel-Salam, O.M., Czimmer, J., Debreceni, A., Szolcsányi, J., Mózsik, G., 2001. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **J. Physiol.**, 95,105–127.
- Barbastefano, V., Cola, M., Luiz-Ferreira, A., Farias-Silva, E., Hiruma-Lima, C.A., Rinaldo, D., Vilegas, W., Souza-Brito, A.R., 2007. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs.**Fitoterapia** 78, 545-551.
- Basso, L.A., da Silva, L.H., Fett-Neto, A.G., de Azevedo, W.F.Jr., Moreira I.S., Palma, M.S., Calixto, J.B., Astolfi Filho, S., dos Santos, R.R., Soares, M.B., Santos, D.S., 2005. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases- a review. Mem. Inst. **Oswaldo Cruz**, 100, 475-506.
- Bi, W.P., Man, H.B., Man, M.Q., 2014. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: a review. **World J. Gastroenterol.** 20, 17020-17028.
- Cartaxo, S.L., Souza, M.M., de Albuquerque, U.P.,2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil.**Journal of Ethnopharmacology**, 131, 326–342.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., (2009).Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders.**Journal of Ethnopharmacology**.122, 402-405.
- Charneau, S., de Mesquita, M.L., Bastos, I.M., Santana, J.M., de Paula, J.E., Grellier, P., Espindola, L.S., 2016.*In vitro* investigation of Brazilian Cerrado plant extract activity against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* gambiense. **Nat. Prod.Res.** 30, 1320-1326.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9 .USA, 2012.
- da Silva, A.O., Damaceno Alves, A., Almeida, D.A., Balogun, S.O., de Oliveira, R.G., Aires Aguiar, A., Soares, I.M., Marson-Ascêncio, P.G., Ascêncio, S.D., de Oliveira Martins, D.T., 2014. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg.**J. Ethnopharmacol.**154, 319-329.
- de-Faria, F.M., Almeida, A.C., Luiz-Ferreira, A., Takayama, C., Dunder, R.J., da Silva, M.A., Salvador, M.J., Abdelnur, P.V., Eberlin, M.N., Vilegas, W., Toma, W., Souza-Brito, A.R., 2012.Antioxidant action of mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in the rat.**ScientificWorldJournal**,2012, 327071.

- de Sousa Falcão, H., Leite, J.A., Barbosa-Filho, J.M., de Athayde-Filho, P.F., de Oliveira Chaves, M.C., Moura, M.D., Ferreira, A.L., de Almeida, A.B., Souza-Brito, A.R., de Fátima Formiga Melo Diniz, M., Batista, L.M., 2008. Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: a review. **Molecules**, 13, 3198-3223.
- Dutra, R.C., Campos, M.M., Santos, A.R., Calixto, J.B. 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res.** 2016 Jan 23. pii: S1043-6618(16)00023-2. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021. [Epub ahead of print].
- Galdino, P.M., Nascimento, M.V., Florentino, I.F., Lino, R.C., Fajemiroye, J.O., Chaibub, B.A., de Paula, J.R., de Lima, T.C., Costa, E.A., 2012. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 38, 276-284.
- Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R., Quinn, R.J., 2015. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat. Rev. Drug Discov.** 14, 111-129.
- Hayden, L.J., Thomas, G., West G.B., 1978. Inhibitors of gastric lesions in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.** 30, 244-246.
- Hunter, P.A., Dawson, S., French, G.L., Goossens, H., Hawkey, P.M., Kuijper, E.J., Nathwani, D., Taylor, D.J., Teale, C.J., Warren, R.E., Wilcox, M.H., Woodford, N., Wulf, M.W., Piddock L.J., 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing practices and policies. **J. Antimicrob. Chemother.** 65, 13-17.
- Luiz-Ferreira, A., Almeida, A.C., Cola, M., Barbastefano, V., Almeida, A.B., Batista, L.M., Farias-Silva, E., Pellizzon, C.H., Hiruma-Lima, C.A., Santos, L.C., Vilegas, W., Brito, A.R., 2010. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Molecules** 15, 7153-7166.
- Moghadamtousi, S.Z., Rouhollahi, E., Karimian, H., Fadaeinasab, M., Abdulla, M.A., Kadir, H.A., 2014. Gastroprotective activity of *Annona muricata* leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement. **Drug Des. Devel. Ther.** 8, 2099-2110.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., Sukamoto, T., 1991. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Jpn. J. Pharmacol.** 57, 495-505.
- Nascimento, M.V., Galdino, P.M., Florentino, I.F., de Brito, A.F., Vanderlinde, F.A., de Paula, J.R., Silva, R.N., Costa, E.A., 2012. Anti-inflammatory effect of *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. leaves involves reduction of TNF- α . **Nat Prod Res**, 26, 2274-2279.
- Oliveira, P.S., Freitas, A.V., 2004. Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. **Naturwissenschaften**, 91, 557-570.

Périco, L.L., Heredia-Vieira, S.C., Beserra, F.P., de Cássia Dos Santos, R., Weiss, M.B., Resende, F.A., Dos Santos Ramos, M.A., Bonifácio, B.V., Bauab, T.M., Varanda, E.A., de Gobbi, J.I., da Rocha, L.R., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2015. Does the gastroprotective action of a medicinal plant ensure healing effects? An integrative study of the biological effects of *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) in rats. **J. Ethnopharmacol.** 172, 312-324.

Rastogi, S., Pandey, M.M., Rawat, A.K., 2015. Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. **Phytomedicine**, 2015 Nov 10. pii: S0944-7113(15)00331-1. doi: 10.1016/j.phymed.2015.10.012. [Epub ahead of print].

Sano, E.E., Rosa, R., Brito, J.L., Ferreira, L.G., 2010. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environ. Monit. Assess.** 166, 113–124.

Yadav, D.K., Singh, N., Dev, K., Sharma, R., Sahai, M., Palit, G., Maurya, R., 2011. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. **Fitoterapia**. 2011 Jun;82(4):666-75. doi: 10.1016/j.fitote.2011.02.005. Epub 2011 Feb 20.

Zanatta, F., Gandolfi, R.B., Lemos, M., Ticona, J.C., Gimenez, A., Clasen, B.K., Cechinel Filho, V., de Andrade, S.F., 2009. Gastroprotective activity of alkaloid extract and 2-phenylquinoline obtained from the bark of *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae). **Chem. Biol. Interact.** 180, 312-317.

Tables legends

Table 1- Effects of ethanolic extract from leaves of *S. odoratissima* (SOL) and *A. coriacea* (ACL) on models of gastric lesions induced in rodents. Results are mean \pm S.E.M. ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ represents significant difference from the control group.

Table 2- Minimum Inhibitory Concentration of ethanolic extracts from leaves of *S. Odoratissima* (SOL) and *A. coriacea* (ACL). MIC = Minimum Inhibitory Concentration.

Table 1-Effects of ethanolic extract from leaves of *S. odoratissima* (SOL) and *A. coriacea* (ACL) on models of gastric lesions induced in rodents. Results are mean \pm S.E.M. ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ represents significant difference from the control group.

Experimental Model	Treatments (p.o.)	Dose (mg/kg)	N	Gastric lesions (mm ²)	Inhibition (%)
Ethanol	Tween 12%	—	7	30.53 \pm 11.85	—
	Carbenoxolone	100	7	10.68 \pm 5.78***	65
		25	7	30.61 \pm 11.80	
		50	7	28.94 \pm 10.06	
	SOL	100	7	2.26 \pm 3.66***	93
		200	7	0.25 \pm 0.11***	99
		300	7	0.53 \pm 1.23***	98
	Saline	—	7	293.70 \pm 30.32	—
	Carbenoxolone	100	7	147.10 \pm 8.49***	50
		50	7	97.63 \pm 19.83***	67
	ACL	100	7	139.40 \pm 18.47***	52
		200	7	151.10 \pm 16.12***	48
		300		95.95 \pm 10.53***	67
	Tween 12%	—	7	4.10 \pm 1.75	—
	Cimetidine	100	7	0.22 \pm 0.09***	95
DAINEs	SOL	100	7	1.11 \pm 0.63**	73
	Saline	—		17.43 \pm 2.79	—
	Cimetidine	100		8.98 \pm 1.39*	48
	ACL	50		6.50 \pm 1.21**	63

Table1-

Microorganisms	SOL	ACL
	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1024	512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>1024	256
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1024	512

Table 2-