



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SUZANA BARBOSA BEZERRA

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIMICROBIANA
DO EXTRATO SECO DE *MATRICARIA RECUTITA*
(CAMOMILA) E DO ALFA-BISABOLOL: POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO**

FORTALEZA

2009

SUZANA BARBOSA BEZERRA

***ATIVIDADE GASTROPROTETORA E
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO SECO DE MATRICARIA
RECUTITA (CAMOMILA) E DO ALFA-BISABOLOL:
POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Farmácia Experimental e Tecnológica.

Orientador (a): Prof. Dra. Nádia Accioly
Pinto Nogueira

Co-Orientador(a): Prof. Dra. Adriana Rolim
Campos Barros

FORTALEZA
2009

B469a

Bezerra, Suzana Barbosa

Atividade gastroprotetora e antimicrobiana do extrato seco de *Matricaria recutita* (camomila) e do alfa-bisabolol : possíveis mecanismos de ação / Suzana Barbosa Bezerra. – Fortaleza, 2009.

122 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Fortaleza-Ce, 2009

1.Camomila 2. Matricaria 3. Úlcera Gástrica 4. Produtos com Ação Antimicrobiana I. Nogueira, Nádia Accioly Pinto (orient.) II. Título

CDD: 615.32399

SUZANA BARBOSA BEZERRA

*ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO SECO DE MATRICARIA RECUTITA (CAMOMILA) E DO
ALFA-BISABOLOL: POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO.*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Farmácia Experimental e Tecnológica.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dra. Adriana Campos Rolim Barros (Co-Orientadora)
Universidade de Fortaleza-UNIFOR

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dedico este trabalho à minha mãe, exemplo de vida e força para mim. Sempre presente nas minhas decisões e apoando minhas escolhas. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira, orientadora deste trabalho, pelo auxílio, ajuda e orientação durante esse tempo;

À Prof^a Dra. Adriana Rolim Campos Barros, co-orientadora, sempre presente de várias formas, agradeço pela paciência, pelos conselhos e ajuda de grande importância durante o curso;

À Prof^a Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, pessoa única, que “comprou a idéia” do projeto, confiou no meu trabalho e mostrou ser um exemplo de mestre;

Aos bolsistas do Laboratório de Microbiologia: Dânya, Mirlayne, Cássia, Samara e Felipe, sempre dispostos a ajudar quando fosse necessário;

Aos bolsistas da Farmacognosia Amanda, Diego, Jean, Camila e Lucas, agradeço a colaboração para que este trabalho fosse realizado;

À coordenação do curso, em especial à secretária Raimundinha, pela simpatia única e presteza em todos os momentos;

Aos colegas do mestrado, pela amizade e companheirismo no decorrer do curso, em especial Alba e Andréa, sempre dispostas a ajudar quando muitas dúvidas surgiam;

Ao Prof. Said Fonseca, Júlia e Emídio do Laboratório de Farmacotécnica que acompanharam toda a minha caminhada para chegar nesse momento e sempre mantiveram suas portas abertas para mim;

Aos colegas de trabalho do CEDEFAR (Beatriz, Mariana, Maira, Prof. Luis Carlos, Prof. Mário, Profa. Célia e Profa. Francisca) que me apoiaram no final dessa jornada;

Aos professores do mestrado, pela aprendizagem e troca de experiências;

Ao colega Francisco Noé da Fonseca, sempre acessível e que sempre mostrava que tudo poderia ser mais simples do que parecia;

Ao grande amigo Tiago Moreira de Olinda, grande companheiro de vários momentos e fases, que sempre acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava e me apoiou durante o curso;

À amiga Ticiana Praciano Pereira, amiga dentro e fora do campus, companheira na preparação de seleção, durante todo o curso, na faculdade à noite, fins de semana e principalmente na vida, pois sua presença é indispensável na minha vida;

Aos amigos e amigas, que sempre tentavam entender o mundo do mestrado, sem saber exatamente o que era, mas sempre estiveram do meu lado;

Aos meus pais, Wares e Zeneide e irmãos Wares Júnior e Milena por serem a base da minha vida.

A Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pela concessão da bolsa de estudos.

“É preciso entender que cada momento traz uma cobrança, uma fatura pelo que pensamos e fazemos. Nada é de graça na vida, nem o ar que respiramos. Em tudo e por tudo existe trabalho, existem lições, que precisamos assimilar, aprender, tirar proveito da dor, do amor e até do sabor. Somos crianças no Universo tão rico de experiências, e se você entender apenas, que em cada um de nós existem possibilidades infinitas, ninguém vai te derrubar, nem a dor, que é sempre passageira, nem o vento, que sopra forte e vem do mar, que nessa noite traz apenas a brisa para te felicitar: Viva a esperança de estar vivo e poder continuar.”

Paulo Roberto Gaefke

RESUMO

ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO SECO DAS FLORES DE *MATRICARIA RECUTITA (CAMOMILA)* E DO ALFA-BISABOLOL: POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO. Suzana Barbosa Bezerra. Orientador(a): Nádia Accioly Pinto Nogueira. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, 2009.

Matricaria recutita, conhecida popularmente como camomila, é uma espécie vegetal utilizada na medicina devido às suas propriedades sedativa, antiinflamatória e cicatrizante, entre outros. O alfa-bisabolol, um sesquiterpeno presente em seu óleo essencial, também possui várias atividades farmacológicas reconhecidas. Neste trabalho foram avaliadas as atividades gastroprotetora, antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do extrato seco das flores de camomila (ESFC) e do alfa-bisabolol (BISA). Na atividade gastroprotetora, o ESFC nas doses 100, 200 e 400 mg/Kg, via oral, reduziu significativamente em 78, 68 e 89 %, respectivamente ($p<0,001$) as lesões gástricas induzidas por etanol (1,0 mL/animal) em ratos. BISA também inibiu a formação de úlceras induzidas por etanol, mas somente nas doses 50 e 100 mg/Kg (87% e 96%, respectivamente). O mecanismo de gastroproteção do BISA nas lesões gástrica induzidas por etanol em ratos foi avaliado na dose de 100 mg/Kg. O pré-tratamento com o antagonista do óxido nítrico (L-NAME) e com um inibidor das prostaglandinas (indometacina) não bloqueou efetivamente o efeito gastroprotetor do BISA, mas o pré-tratamento com glibenclamida, um inibidor dos canais K^{+}_{ATP} , reduziu significativamente ($p<0,05$) o efeito gastroprotetor de BISA. Esses resultados mostram que BISA pode reduzir os danos da mucosa gástrica induzidos por etanol através do mecanismo de ativação dos canais K^{+}_{ATP} . Na avaliação do potencial antioxidante mensurado através do teste do DPPH, tanto ESFC quanto BISA não apresentaram atividade seqüestradora de radicais livres. O método de difusão em ágar foi usado para determinar o potencial antimicrobiano do ESFC e do BISA sobre cepas microbianas originárias da ATCC e de origem hospitalar. O ESFC não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma das cepas de bactérias testadas e determinou apenas uma pequena inibição para a levedura *C. albicans* na concentração de 5mg/mL. BISA inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 6538, *C. albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumanii* até nas concentrações de 0,0625, 0,0625, 4 e 4 mg/mL, respectivamente. A maior atividade antimicrobiana de BISA foi demonstrada sobre a bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 6538, com uma CIM de 1mg/mL e CLM maior que 1mg/mL. Para as demais cepas testadas, as CIM e CLM de ESFC e de BISA foram maiores que 1mg/mL. A partir dos resultados obtidos, foi realizada a avaliação da citotoxicidade do ESFC e do BISA. Neutrófilos humano foram isolados e receberam ESFC e BISA (1,5,10,50 e 100 μ g/mL), onde ESFC se mostrou citotóxico em todas as doses testadas, enquanto que o BISA só não apresentou atividade citotóxica na dose de 5 μ g/mL. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que ESFC e BISA possuem atividade gastroprotetora em lesões gástricas induzidas por etanol, onde o mecanismo de ação do BISA parece estar relacionado com a ativação dos canais K^{+}_{ATP} . Entretanto, não foi possível determinar a atividade antioxidante das duas drogas teste através do teste do DPPH. O melhor resultado para a atividade antimicrobiana do BISA foi demonstrada para a bactéria *S. aureus* ATCC 6538, com CIM de 1mg/mL, também sendo demonstrada atividade citotóxica para essa mesma substância.

Palavras-chave: *Matricaria recutita*, Camomila, Extrato seco das flores de camomila, Alfa-bisabolol, Gastroproteção, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

GASTROPROTECTIVE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *MATRICARIA RECUTITA* (CAMOMILA) FLOWER EXTRACT AND ALPHA-BISABOLOL: POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION. Suzana Barbosa Bezerra. Supervisor: Nádia Accioly Pinto Nogueira. Pos-graduation Program in Pharmaceuticals Science of the Pharmacy Departament, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, 2009.

Matricaria recutita, commonly known as chamomile, is a plant species used in medicine due to its sedative properties, anti-inflammatory and healing, among others. Alpha-bisabolol, a sesquiterpene present in essential oil, also has several pharmacological activities recognized. This work evaluated the gastroprotective activity, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities from chamomile dried flowers extract (ESFC) and alpha-bisabolol (BISA). Gastroprotective activity for ESFC at doses 100, 200 and 400 mg / kg, orally, significantly reduced in 78, 68 and 89% respectively ($p < 0.001$) gastric lesions induced by ethanol (1.0 mL / animal). BISA also inhibited the formation of ulcers induced by ethanol, but only at doses 50 and 100 mg / kg (87% and 96%, respectively). The mechanism of gastroprotective the BISA in gastric lesions induced by ethanol in rats was evaluated at a dose of 100 mg / kg. The pre-treatment with the antagonist of nitric oxide (L-NAME) or antagonist of prostaglandins (indomethacin) did not block effectively of BISA, but the pretreatment with glibenclamide, an inhibitor of K^{+}_{ATP} channels, reduced significantly ($p < 0.05$) the gastroprotective effect of BISA. These results indicate that BISA can reduce the damage of gastric mucosa induced by ethanol through the mechanism of activation of K^{+}_{ATP} channels. To evaluate the antioxidant potential measured by the DPPH test, both as ESFC and BISA showed no scavenging activity of free radicals. The method of agar diffusion was used to determine the antimicrobial potential of ESFC and BISA on microbial strains originating from ATCC and hospital origin. The ESFC was not able to inhibit the growth of any of the bacterial strains tested and required only a small inhibition for the yeast *C. albicans* at a concentration of 5 mg / mL. BISA inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 6538, *C. albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* at concentrations of 0,0625, 0,0625, 4 and 4 mg / mL, respectively. The highest antimicrobial activity of BISA was demonstrated against Gram-positive *S. aureus* ATCC 6538, with an MIC of 1mg/mL and MLC greater than 1mg/mL. For the other strains tested, the MIC and the CLM ESFC and BISA were greater than 1mg per mL. From the results obtained was performed to evaluate the cytotoxicity of ESFC and BISA. Human neutrophils were isolated and were ESFC and BISA (1,5,10,50 and 100 mg / mL), where ESFC proved cytotoxic at all doses tested, while the BISA not only showed cytotoxic activity at dose of 5 mg / mL. The results of this study suggest that ESFC and BISA have gastroprotective activity in gastric lesions induced by ethanol, where the mechanism of action of BISA seems to be related to activation of K^{+}_{ATP} channels. However, it was not possible to determine the antioxidant activity of two drugs test by the DPPH test. The best result for the antimicrobial activity of BISA was demonstrated for the bacteria *S. aureus* ATCC 6538, with MIC 1mg/mL also being demonstrated cytotoxic activity for that substance.

Keywords: *Matricaria recutita*, Chamomile, Chamomile dried flowers extract, Gastroprotection, Alpha-bisabolol, Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	Estrutura química do Isopreno	22
FIGURA 02	Flores da camomila (<i>Matricaria chamomilla</i>)	24
FIGURA 03	Estrutura química da apigenina	27
FIGURA 04	Estrutura química do alfa-bisabolol	29
FIGURA 05	Representação da área de mensuração do halo de inibição na placa de ensaio com meio sólido de Mueller-Hinton	51
FIGURA 06	Efeito do extrato das flores de camomila na lesão gástrica induzida por etanol	56
FIGURA 07	Efeito do alfa-bisabolol na lesão gástrica induzida por etanol	58
FIGURA 08	Aspectos macroscópicos de estômago de ratos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol	59
FIGURA 09	Papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	61
FIGURA 10	Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	63
FIGURA 11	Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}^+) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	65
FIGURA 12	Avaliação do efeito antioxidante do extrato seco das flores de camomila através do método DPPH	67
FIGURA 13	Avaliação do efeito antioxidante do alfa-bisabolol através do método DPPH	68
FIGURA 14	Avaliação do efeito tóxico do extrato seco das flores de camomila em neutrófilos humano, mensurado pela medida da atividade da enzima lactato desidrogenase	70
FIGURA 15	Avaliação do efeito tóxico do alfa- bisabolol em neutrófilos humanos mensurado pela medida da	71

atividade da enzima lactato desidrogenase

FIGURA 16	Potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila sobre a cepa de levedura <i>C. albicans</i> ATCC 10231 determinado pela técnica de difusão em ágar	74
FIGURA 17	Potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol sobre a cepa bacteriana <i>S. aureus</i> ATCC 6538 determinado pela técnica de difusão em ágar	76
FIGURA 18	Cinética da inibição do crescimento microbiano da espécie Gram-positiva <i>S. aureus</i> ATCC 6538, determinado pela ação do alfa-bisabolol	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	Efeito do ESFC no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.	55
TABELA 02	Efeito do BISA no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.	57
TABELA 03	Papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.	60
TABELA 04	Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.	62
TABELA 05	Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K^+ _{ATP}) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.	64
TABELA 06	Potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila (ESFC) sobre cepas microbianas originárias da ATCC determinado pela técnica de difusão em ágar.	73
TABELA 07	Potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias da ATCC determinado pela técnica de difusão em ágar.	75
TABELA 08	Padrão de multirresistência a antibióticos de cepas de bactérias de origem hospitalar, isoladas de espécimes clínicos.	78
TABELA 09	Potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol sobre cepas de bactérias de origem hospitalar, isoladas de espécimes clínicos e com padrão de multirresistência, determinado pela técnica de difusão em ágar.	79
TABELA 10	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias da <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC) e cepas bacterianas multirresistentes de origem hospitalar, determinado pela técnica da microdiluição em caldo de cultura (CLSI, 2003) e de plaqueamento em meio sólido.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Percentagem
° C	Grau Centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Abs	Absorbância
Abs	Absoluto
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BISA	Alfa-bisabolol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
COX	Ciclooxygenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
G	Grama
H ⁺	Hidrogênio
H ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de prótons
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>

HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
IL-2	Interleucina 2
i.p.	Intraperitoneal
K ⁺ _{ATP}	Canais de potássio dependentes de ATP
Kg	quilograma
L-NAME	L-nitro-arginina
LTC-4	Leucotrieno C4
Min	Minuto
MRSA	<i>Meticilin Resistant Staphylococcus aureus</i>
ml	Mililitro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NO	Óxido nítrico
nm	Nanômetro
PGE-2	Prostaglandinas
PGs	Prostaglandinas
PMNs	Polimorfonucleares
TGI	Trato gastrintestinal
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Produtos Naturais	21
1.2. Terpenos e suas atividades biológicas	22
1.3. Camomila (<i>Matricaria recutita</i>)	25
1.4. Alfa-bisabolol, um sesquiterpeno presente nas flores de camomila (<i>Matricaria recutita</i>)	29
1.5. Úlcera péptica	31
1.6. Atividade antimicrobiana	37
1.7. Resistência microbiana	38
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivos gerais	44
2.2. Objetivos específicos	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Materiais	46
3.1.1. Material de estudo	46
3.1.2. Animais	46
3.1.3. Cepas microbianas	46
3.2. Aspectos éticos	47
3.3. Métodos	47
3.3.1. Avaliação da atividade gastroprotetora	47
3.3.1.1. Lesão gástrica induzida por etanol	47
3.3.2. Avaliação do mecanismo de ação do efeito gastroprotetor na lesão gástrica induzida por etanol em ratos	48
3.3.2.1. Papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	48
3.3.2.2. Papel das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor do BISA em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	49
3.3.2.3. Papel dos canais de potássio dependentes de ATP no efeito gastroprotetor do BISA em modelos de lesões gástricas	49

induzidas por etanol em ratos	
3.3.3. Atividade antioxidante: método do radical DPPH	50
3.3.4. Avaliação da citotoxicidade em neutrófilos: alterações na permeabilidade celular	50
3.3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana	51
3.3.5.1. Determinação do potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol e do extrato seco de camomila sobre cepas microbianas	51
3.3.5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima	52
3.3.5.4. Determinação da Concentração Letal Mínima	53
4. ESTATÍSTICA	54
5. RESULTADOS	55
5.1. Atividade gastroprotetora	56
5.1.1. Efeito do ESFC nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	56
5.1.2. Efeito do BISA nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	58
5.1.3. Papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	61
5.1.4. Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	63
5.1.5. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K^+_{ATP}), no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	65
5.2. Atividade antioxidante	67
5.2.1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol através do teste DPPH	67

5.3. Atividade citotóxica	70
5.3.1. Avaliação da citotoxicidade do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol em neutrófilos humano	70
5.4. Atividade antimicrobiana	73
5.4.1. Potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias da <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)	73
5.4.2. Potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas bacterianas multirresistentes de origem hospitalar isoladas de espécimes clínicos	77
5.4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias da <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC) e sobre cepas bacterianas multirresistentes de origem hospitalar isoladas de espécimes clínicos	80
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÃO	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXOS	114

INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tal a sua complexidade. Calcula-se a existência de mais de dois milhões de espécies, entre plantas, animais e microorganismos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (SIMÕES, 2003). A exploração deste recurso vegetal pode levar a identificação de metabólitos secundários valiosos que podem servir como fitofármacos ou conduzir ao desenvolvimento de novos fármacos semi-sintéticos ou sintéticos.

Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. O mercado mundial desse grupo de drogas atinge vários bilhões de dólares. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Somente no período entre 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais. Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos naturais. No caso das drogas anticancerígenas e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70% (CALIXTO, 2003).

Existem, todavia, problemas que dificultam o aproveitamento da biodiversidade para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre alguns fatores, podemos citar: falta de leis específicas para o acesso a biodiversidade; grande complexidade das moléculas isoladas a partir de produtos naturais, que às vezes dificulta sua síntese; o tempo necessário para o descobrimento de moléculas líderes às vezes é longo; a descoberta pode ser dispendiosa; poucas bibliotecas de compostos naturais estão disponíveis; existem poucas informações com relação à estrutura-atividade desses compostos; freqüentemente, moléculas já conhecidas com pouco interesse, são isoladas de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

As plantas medicinais são um dos poucos recursos terapêuticos disponíveis para a maioria da população latino-americana, que as utiliza para tratar as mais diferentes patologias (LAPA & LIMA, 1997). O interesse em plantas medicinais cresceu bastante, fazendo com que indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa tenham como alvo as plantas, na busca de novos fármacos (EVANS, 1996). Assim, o interesse e consequentemente os investimentos da indústria farmacêutica têm crescido de maneira expressiva nesta área (BORRIS, 1996; TURNER, 1996). Isto é devido em parte ao reconhecimento do valor das farmacopéias tradicionais e indígenas e à incorporação de alguns derivados de plantas na terapêutica (ELVIN-LEWIS, 2001).

Os produtos naturais são considerados uma fonte de inovação na busca de novas drogas. Desempenham um importante papel no entendimento e descoberta das vias metabólicas celulares, o que é essencial no processo de descoberta de novos fármacos. Muitas vezes, substâncias que tem origem natural são precursoras de compostos que podem ser utilizadas como drogas ou como ferramentas bioquímicas no entendimento da fisiopatologia das doenças (GULLO *et al.*, 2006) .

A descoberta de novos fármacos, ou de fármacos acessíveis, pode determinar a melhoria da qualidade de vida de portadores de doenças crônicas ou, até mesmo, a própria sobrevivência desses pacientes. Socialmente, a descoberta de fontes naturais de compostos químicos usualmente importados e/ou o desenvolvimento de fitoterápicos de fabricação nacional, podem ter consequências econômicas significativas, além de possibilitar a autonomia de cada país no gerenciamento de suas políticas de saúde.

1.2. Terpenos e suas atividades biológicas

Os terpenos distribuem-se amplamente na natureza, sendo encontrados em abundância nas plantas superiores. Além dos vegetais, alguns fungos e organismos marinhos são também uma fonte desses compostos. São produtos naturais, onde sua estrutura pode ser dividida em unidades de isopreno (Figura 01), por isso também podem ser conhecidos como isoprenóides.

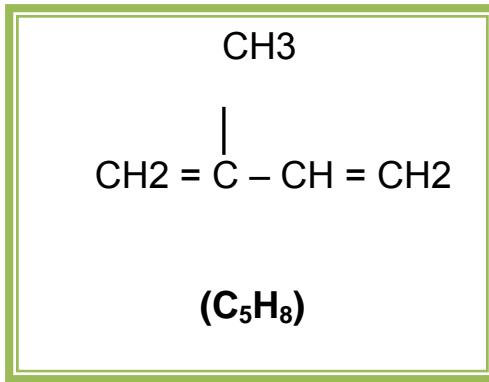


Figura 01: Estrutura química do Isopreno

A classificação dos terpenos é feita pelo número de ligações de unidades de isopreno, onde o número de unidades incorporadas em determinado terpenóide hidrocarbonado insaturado serve de base para esta classificação. Os monoterpenos são compostos de duas unidades, tem a fórmula molecular C₁₀H₁₆. Os sesquiterpenos contêm três unidades e sua fórmula molecular é C₁₅H₂₄ (ROBBERS *et al.*, 1997).

As funções biológicas dos terpenos ainda não foram completamente investigadas. Muitas plantas produzem terpenos voláteis para atrair insetos para polinização e por outro lado para afastar certos animais que utilizam essas plantas como alimento. Terpenos menos voláteis, mas com forte sabor amargo também protegem as plantas de servirem como alimentos para os animais. Por último, os terpenos tem um papel importante como compostos sinalizadores ou fatores de crescimento (fitormônios) de plantas (BREITMAIER, 2007).

A atividade antiinflamatória dos terpenos tem sido demonstrada em alguns estudos. De acordo com Talhouk *et al.*, (2007), o extrato metanólico das raízes de *Taraxacum officinale* contém sesquiterpenos que inibem o leucotrieno B4, formado pela estimulação de neutrófilos humano. O triptolide, um diterpeno isolado da *Tripterygium wilfordii*, inibe a ativação de linfócitos, transcrição de IL-2 em células T e a atividade de NF-κB.

Vários terpenos foram isolados e avaliados quanto à sua toxicidade frente aos insetos. Os monoterpenos de estrutura relativamente simples como o limoneno, mirceno e a 1,2-epóxi-pulegona exercem funções de proteção às plantas que os produzem. Aparentemente essa ação inseticida seria decorrente da inibição da acetilcolinesterase nos insetos. A grande maioria dos trabalhos na literatura que se referem a terpenóides superiores, fazem referências a observação de atividades como inibidores ou retardadores de crescimento, danos na maturação, redução da capacidade reprodutiva, supressores de apetite, podendo levar os insetos à morte por inanição ou toxicidade direta (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Togashi *et al.*, (2008) sugerem que as atividades atividade antinflamatória e amplo espectro de atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* estão associadas a presença de terpinen-4-ol, que é seu principal constituinte. O terpeno farnesol, também presente nessa espécie, possui atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, cujo mecanismo de ação envolve danos na membrana celular desta bactéria. Eles mostraram que o farnesol, em associação com dois terpenos, geraniol e geranilgeraniol, tem um efeito inibitório maior contra o microrganismo do que quando utilizado sozinho

Os sesquiterpenos têm grande distribuição na natureza, formando a maior classe dos terpenos. Entre os primeiros sesquiterpenos isolados de fontes naturais estão o β -cadineno (do óleo essencial de zimbro *Juniperus communis* L.) e o β -cariofileno (do óleo essencial de cravo-da-índia, *Syzygium aromaticum*). Alguns sesquiterpenos já foram estudados e suas atividades farmacológicas são reconhecidas. A valeriana (*Valeriana officinalis*), por exemplo, possui em sua composição os sesquiterpenos ácido valerêmico, ácido valerenólico e ácido acetoxivalerenólico, que juntamente com outras classes de compostos, podem ser responsáveis por suas atividades ansiolítica e sonífera (ROBBERS *et al.*, 1997).

As atividades farmacológicas da *Matricaria chamomilla* são devidas à presença de vários grupos de substâncias ativas, entre elas, os terpenos, que possuem uma grande importância. Nessa espécie, o camazuleno e o bisabolol são exemplos de terpenos responsáveis principalmente pela atividade antiinflamatória da planta, mas também, as atividades antialérgica, antiespasmódica, antibacteriana, antipirética, antiúlcera e

antifúngica. A atividade espasmolítica da camomila é atribuída aos óxidos de bisabolol (SZOKE *et al.*, 2004; SRIVASTAVA; GUPTA, 2007).

1.3. Camomila (*Matricaria recutita*)

Matricaria recutita L. (*Matricaria chamomilla*, *Chamomilla chamomilla* e *Matricaria suaveolens*), popularmente conhecida como camomila alemã ou camomila, é uma erva popular, aromática, pertencente à família Asteraceae (SHIVANANDA *et al.*, 2007; SRIVASTAVA & GUPTA, 2007), de crescimento anual, podendo chegar até 1 metro de altura. Suas flores (Figura 02) apresentam-se em capítulos agrupados, sendo centrais tubulosos amarelos e os laterais ligulados. É comum a ocorrência desta espécie na Europa e em algumas regiões da Ásia. No Brasil, é cultivada nos estados do centro-sul (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2008). Os capítulos florais são as partes da planta usadas para fins terapêuticos (Figura 02), que são secos ao ar e conservados ao abrigo da luz para manter suas propriedades (MATOS, 2007).



Figura 02: Flores da camomila (*Matricaria chamomilla*)

Fonte: www.wildflowers.co.il/images/320-pics/371.jpg, acessado em 02.06.2009.

A camomila é utilizada há séculos na medicina tradicional como sedativo, espasmolítico, antiinflamatório, hepatoprotetora e cicatrizante. É usada comumente na forma de chá, ingerido por via oral, sendo utilizada para mal-estar no estômago, má-digestão e nervosismo. Pode ser usada externamente para tratar hemorróidas, feridas na mucosa da boca e cicatrizes na pele (O'HARA *et al.*, 1998; BABENKO; SHAKHOVA, 2005).

Diferentes espécies vegetais de uso medicinal são denominadas popularmente de camomila (FETROW; AVILA, 2000; KUHN; WINSTON, 2000; ROTBLATT; ZIMENT, 2002). Entre estas, destaca-se a camomila verdadeira ou camomila-dos-alemães, farmacognosticamente definida como sendo constituída pelas inflorescências de *Matricaria recutita* L., Asteraceae (FETROW; AVILA, 2000; KUHN; WINSTON, 2000; NEWALL, ANDERSON, PHILLIPSON, 2002; ROTBLATT; ZIMENT, 2002). Freqüentemente, essa herbácea anual é referida pela sinonímia científica, ou seja, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert e *Matricaria chamomilla* L. (LORENZI; MATOS, 2002; NEWALL, ANDERSON, PHILLIPSON, 2002), e pode ser enquadrada na família Compositae, quando adotado o sistema de Engler (BARROSO, 1991).

Devido à sua importância terapêutica, a camomila consta em diferentes farmacopéias, a exemplo da BRITISH Herbal Pharmacopoeia (1983, 1996), BRITISH Herbal Compendium (1992), EUROPEAN Pharmacopoeia (1992), PHARMACOPOEIA Helvética (1993) e FARMACOPÉIA Brasileira (1996), as quais apresentam caracterização organoléptica, descrição morfológica, análise qualitativa e quantitativa dos constituintes químicos, ensaios de pureza e doseamento de óleo essencial para avaliação farmacognóstica da matéria-prima e suas produtos derivados (DUARTE; LIMA, 2003).

O Ministério da Saúde elaborou uma lista com 71 espécies vegetais com potencial terapêutico para a orientação de pesquisas com plantas medicinais. A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Renisus) apresenta plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS, onde a *Matricaria recutita* faz parte desta listagem oficial (BRASIL, 2009).

No Brasil, a *Matricaria recutita* L. foi introduzida pelos europeus há mais de 100 anos. É uma planta medicinal com maior área de cultivo e com maior envolvimento de pequenos produtores rurais. No país produz-se o suficiente para o consumo interno, cerca de 150 toneladas de capítulos florais por ano, e se a produção aumentar e os capítulos florais forem de boa qualidade, é possível exportar esse produto, principalmente para a Europa, onde é grande o seu consumo (RAMOS *et al.*, 2004).

Em um estudo feito por Brandão *et al* (1998), 28 amostras comerciais de camomila foram analisadas para verificar se estão de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (4^a edição). Nessa análise, apenas na metade das amostras foram detectados os constituintes ativos do óleo essencial. A ausência destas substâncias nas amostras comerciais pode decorrer de processos de produção e armazenagem inadequados. De todas as amostras analisadas, somente uma, de origem finlandesa, apresentou-se dentro dos padrões de qualidade exigidos pelos códigos oficiais e pela literatura. A falta de padronização e qualidade das amostras brasileiras comprometem a importância que as plantas medicinais possam representar na saúde pública brasileira e confirmam a necessidade urgente da vigilância de fitoterápicos.

Vários estudos com a camomila mostraram suas propriedades antiinflamatórias, anti-mutagênica, diminuição dos níveis de colesterol (SRIVASTAVA; GUPTA, 2007), atividade estrogênica, inibem aftas de estomatite e úlceras orais induzidas por metotrexato, efeito antipruriginoso e anti-ulcerogênico (SHIVANANDA *et al.*, 2007). Previne a hiperglicemia e complicações do diabetes (KATO *et al.*, 2008). Em estudo desenvolvido por ASOLINI *et al.* (2006), os extratos aquosos e etanólicos do chá de camomila apresentaram atividade antioxidante no modelo de descoloração do β -caroteno.

As flores da camomila possuem de 0,24 a 2,0% de óleo essencial que possui coloração azul. O óleo essencial contém dois constituintes principais: o alfa-bisabolol e o camazuleno, que correspondem a 50-65% do total de sua composição. Outros componentes do óleo incluem os óxidos do bisabolol, farneseno, germacreno e outros sesquiterpenos (CERUELOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2002). O camazuleno, responsável pela cor azul do óleo, é formado a partir da matricina durante o processo de destilação. A camomila também contém em torno de 8% de glicosídeos flavônicos (apigenina, apigenina 7-glicosídeo e seus derivados) e de flavonóis (luteolina, quercetina, isohamnetina); 10% de

mucilagens polissacarídicas; 0,3% de colina e aproximadamente 0,1% de cumarinas (umbeliferona e herniarina). Os níveis de taninos são menores que 1% (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2008).

Os terpenos, bisabolol e camazuleno apresentam atividade antiinflamatória, antialérgica, antiespasmódica, antibacteriana, antipirética, antiulcerogênica e antifúngica. Em estudos *in vitro*, o óleo essencial atua como antibacteriano sobre algumas espécies de *Staphylococcus* e *Candida* (O'HARA *et al.*, 1998).

A análise em HPLC dos extratos aquoso e metanólico das flores secas da camomila confirmam a apigenina 7-glicosídeo como os seus maiores constituintes. É demonstrada atividade anticancerígena em células cancerosas de próstata para esta substância (SRIVASTAVA; GUPTA, 2007). Apigenina 7-glicosídeo (Figura 03) tem efeito dose-dependente, inibe a irritação da pele e é protetora de úlceras gástricas induzidas por medicação, estresse e álcool. Possui atividade ansiolítica e efeito sedativo em camundongos e relaxante em espasmos intestinais (O'HARA *et al.*, 1998).

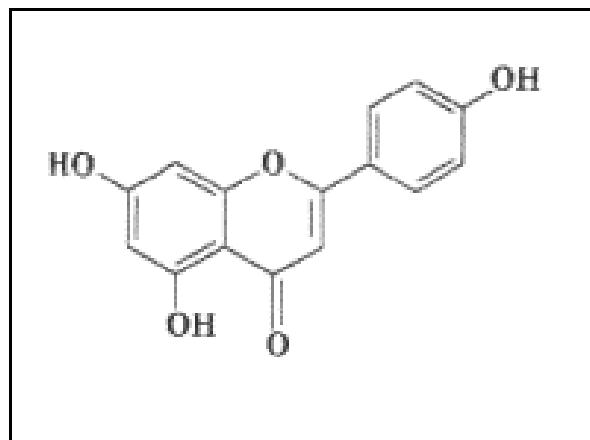


Figura 03: Estrutura química da apigenina

Fonte: MARCUCCI *et al.*, 2007

A *Matricaria recutita* L. é uma das mais representativas plantas medicinais. É cultivada em vários países porque há um grande interesse na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos. Os capítulos florais de odor aromático são drogas antigas que

tem sido utilizada em terapias desde o século V a.C. (SÁRIC *et al.*, 1997). Infusões e óleo essencial dos capítulos dessecado ou fresco tem propriedades aromática, flavorizante e corante. Ambos são utilizados em uma variedade de produtos comerciais, incluindo sabonetes, detergentes, xampus, perfumes, loções, óleos, chás e outros (MATOS, 2007; MCKAY; BLUMBERG, 2006; SCALIA *et al.*, 1999).

Óleos essenciais que possuem em sua composição o azuleno, como por exemplo, a óleo essencial da camomila, possuem atividade antiinflamatória conhecida. β -pineno, cariofileno, α -bisabolol e compostos sesquiterpênicos, que estão presentes nos óleos de *Bupleurum fruticosces*, *Vanillosmopsis arborea* e *Copaifera reticulata* também possuem atividade antiinflamatória (AMARAL, 2004).

A camomila (*Matricaria recutita*) também possui em sua composição sesquiterpenos, sendo o mais conhecido o alfa-bisabolol, que possui atividade farmacológica reconhecida e é utilizado como antiinflamatório (ROBBERS *et al.*, 1997).

1.4. Alfa-bisabolol, um sesquiterpeno presente nas flores de camomila (*Matricaria recutita*)

O alfa-bisabolol (Figura 04) é um álcool sesquiterpeno encontrado no óleo essencial da camomila (*Matricaria recutita*) e de outras plantas, tais como: candeeiro (*Vanillosmopsis arborea* Baker), arnica (*Arnica amplexicaulis* e *Arnica chamissonis*), sálvia (*Salvia stenophylla*) (LEITE *et al.*, 2009; GOMES-CARNEIRO *et al.*, 2005). Tem sido utilizado numa grande variedade de produtos dermatológicos e preparações cosméticas, como loções corporais, cremes pós-barba, produtos pós-sol e cremes para bebês, devido às suas propriedades cicatrizantes, anti-irritante, antiinflamatória e antimicrobiana (DARRA *et al.*, 2004).

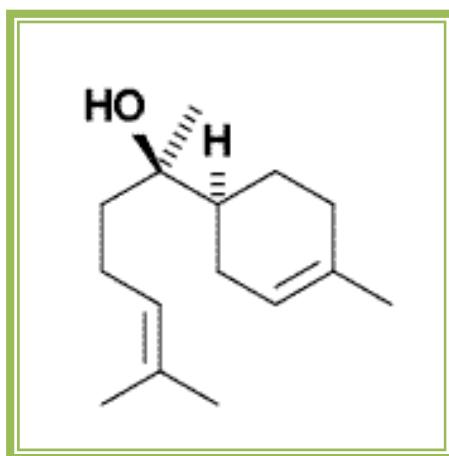


Figura 04: Estrutura química do Alfa-bisabolol

Fonte: CAVALIERI *et al.*, 2004

Diversos estudos demonstram várias atividades biológicas para o alfa-bisabolol: atividade mutagênica/antimutagênica (GOMES-CARNEIRO *et al.*, 2005), inibição do sistema P450 humano (GANZERA, SCHNEIDER, STUPPNER, 2006), indução da apoptose em células de glioma (CAVALIERI *et al.*, 2004), atividade cicatrizante (VILLEGAS *et al.*, 2002, ANDERSEN *et al.*, 2006), proteção à toxicidade gástrica induzida por ácido acetilsalicílico (TORRADO *et al.*, 1995), atividade antibacteriana (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003), inibição da degranulação de mastócitos (MILLER *et al.*, 1996) e atividade antiinflamatória (JAKOVLEV; VON SCHLICHTEGROLL, 1969).

Cavalieri *et al.*, (2004) demonstraram que o alfa-bisabolol tem efeito citotóxico dose-dependente nas células de glioma de ratos e humanos e não induz a citotoxicidade em células da astroglia normais, mesmo em condições drásticas de tratamento. Estudos mostram a ação apoptótica seletiva do alfa-bisabolol sobre células malignas humanas e células de glioblastoma. O alfa-bisabolol também foi capaz de promover a rápida morte, através da via mitocondrial, de um dos tumores malignos mais importantes, o carcinoma pancreático. A baixa citotoxicidade do alfa-bisabolol frente aos fibroblastos sugere que no futuro, possam ser obtidos compostos derivados dele, úteis na quimioterapia (DARRA *et al.*, 2008).

Entre os antifúngicos naturais, o alfa-bisabolol é considerado como uma possível escolha, pois é um inibidor não-tóxico da biossíntese do ergosterol. Podendo ser usado como agente antifúngico na sua forma pura e também como precursor no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (PAULI, 2006).

Estudos *in vitro* com o alfa-bisabolol indicam a inibição de úlceras gástricas induzidas por indometacina, etanol e estresse. A administração oral de extrato de camomila em ratos, cujas doses utilizadas atingiam uma concentração na faixa de 0,8 a 80 mg/kg de bisabolol, demonstram efeito protetor em úlceras gástricas induzidas por ácido acetilsalicílico (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2008).

1.5. Úlcera péptica

Úlcera é uma lesão benigna da mucosa gástrica ou duodenal quando há exposição do epitélio ao ácido gástrico ou pepsina. Tanto as úlceras do estômago quanto do duodeno são consideradas úlceras pépticas. A incidência das úlceras pépticas é maior nos homens do que nas mulheres (1,3:1), onde as úlceras duodenais ocorrem com maior frequência em pessoas na faixa de 30-55 anos e as úlceras gástricas na faixa de 50-70 anos (OLINDA *et al.*, 2008).

A úlcera péptica e dispepsia gástrica associada ao uso de antiinflamatórios não-esteroidais (DAINES) e agentes anti-câncer são as duas maiores causas de adversidades que afetam a qualidade de vida (LEITE *et al.*, 2009). A supressão da síntese de prostaglandinas através de DAINES, como a indometacina, ocasiona o aumento do dano da mucosa e úlceras pépticas (BATISTA *et al.*, 2004).

A proteção da mucosa gástrica envolve alguns fatores como: a secreção de pepsina, atividade das células parietais, fluxo sanguíneo, regeneração celular e a presença de agentes protetores endógenos, como as prostaglandinas (BATISTA *et al.*, 2004). Fatores como estresse, fumo, má nutrição e uso de antiinflamatórios não-esteroidais (DAINES) predispõem e aumenta a incidência de úlceras gástricas. (BARROS *et al.*, 2007).

Evidências clínicas e resultados experimentais mostram que o estresse oxidativo está envolvido na maioria das patologias gastrintestinais, incluindo as úlceras gástricas. Frutas e vegetais contém constituintes químicos bioativos capazes reduzir o estresse oxidativo, remover radicais livres e oferecer gastroproteção (OLINDA *et al.*, 2008). As espécies reativas de oxigênio geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico, plaquetas, macrófagos e células do músculo liso podem contribuir também para o dano na mucosa (REPETTO; LLESUY, 2002).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produtos gerados pelo metabolismo aeróbico e sabe-se que o seu acúmulo é um fator negativo, que aumenta devido ao estresse e também pode ser visto como um mensageiro envolvido nas vias de transdução de sinal. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é o principal e a mais importante forma estável de EROS, sendo formado através de diferentes mecanismos em diversos compartimentos celulares (KOVACIK *et al.*, 2009).

As espécies reativas de oxigênio são geradas por vários processos de oxiredução que normalmente ocorrem no metabolismo de células aeróbicas. Estas espécies são altamente reativas e danosas para as células. Se não eliminadas, podem causar danos em moléculas importantes, como proteínas, DNA e lipídios. O excesso destas espécies está ligado ao desenvolvimento de várias doenças crônicas, como o câncer, aterosclerose, doenças do coração, reumatismo e desenvolvimento de doenças degenerativas, como o mal de Alzheimer e Parkinson. Por conta disto, o interessa na busca de antioxidantes naturais presentes em plantas e alimentos, que podem atuar removendo os radicais livres e inibindo a peroxidação lipídica (REPETTO; LLESUY, 2002; TADIC *et al.*, 2008)

As ulcerações ocorrem quando há um desequilíbrio causado por aumento dos fatores agressores ou por diminuição da resistência gástrica (SAIRAM *et al.*, 2002). Atualmente, o uso de agentes anti-secretórios como os inibidores da bomba de prótons representa uma opção efetiva na terapia das úlceras (LEITE *et al.*, 2009).

No estômago, o álcool interfere na secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado por histamina e gastrina. A mucosa gástrica é a principal barreira contra o ácido gástrico e o etanol em altas concentrações, que promove aumento da

permeabilidade epitelial como consequência de mudanças do potencial celular, causando re-difusão de íons H⁺ (DAVENPORT, 1967; DAVENPORT, 1969).

Um dos maiores problemas no tratamento da úlcera gástrica é o elevado índice de recorrência da doença, o qual está entre 40 e 80%, além do que a maioria das drogas utilizadas produz reações adversas. Por isso, a necessidade da busca de novos agentes antiúlceras (BARROS *et al.*, 2006).

A terapia da úlcera utiliza drogas anticolinérgicas, antagonistas dos receptores H₂ da histamina e mais recentemente, inibidores da bomba de prótons. Nos últimos anos, tem havido crescimento no interesse em terapias alternativas e uso de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas. Os extratos de plantas são uma das principais fontes de novas drogas e mostram resultados promissores no tratamento da úlcera gástrica (FALCÃO *et al.*, 2008).

Muitos produtos derivados de plantas têm mostrado resultados promissores no tratamento da úlcera gástrica, seja como fonte no desenvolvimento de novas substâncias com atividades farmacológicas ou como um produto adjuvante no tratamento desta doença (ARRIETA *et al.* 2003). Alguns compostos das plantas, como os flavonóides, triterpenos e taninos são reconhecidos como possíveis agentes contra a úlcera gástrica, atuando como fator protetor ou aumentando a atividade antioxidante (REPETTO; LLESUY, 2002).

Apesar da flora mundial não estar completamente explorada no sentido de ações farmacológicas reconhecidas, algumas espécies são utilizadas na medicina popular. *Momordica charantia*, *Angelica archangelica*, *Carum carvi*, *Chelidonium majus*, *Iberis amara*, *Matricaria recutita*, *Melissa officinalis*, *Mentha piperita*, *Silybum Marianum*, *Anthemis nobilis*, *Brassica oleracea*, *Matricaria chamomilla*, *Maytenus aquifolium*, *Symphytum officinalis*, *Sorocea blomplandii*, *Zolernia ilicifolia* e *Glycyrrhiza glabra* são usadas no tratamento de úlceras gástricas e possuem atividade antiulcerogênica dose-dependente, associada com redução ácida e aumento da secreção de mucina, além de produzirem um aumento na liberação de PGE2 e diminuição dos leucotrienos (REPETTO; LLESUY, 2002).

Além do uso popular, algumas plantas possuem suas propriedades farmacológicas antiulcerogênicas reconhecidas. *Baccharis illinita* DC, uma planta conhecida no Brasil como “chá-ventura” ou “erva milagrosa”, possui atividade contra úlcera gástrica através dos fatores de proteção e redução da secreção do ácido gástrico. Os extratos hexânico e metanólico das folhas de *Austroplenckia populnea* (Reiss.). Lund, uma planta do Cerrado do Brasil, pertencente à família Celatraceae, reduziram significantemente as lesões gástricas induzidas por etanol na dose de 1000 mg/kg. *Quassia amara* L. foi testada no tratamento da úlcera gástrica e apresentou resultados satisfatórios, e seu mecanismo de ação parece estar relacionando aos fatores de citoproteção, como o muco e as prostaglandinas (FALCÃO *et al.*, 2008).

Os modelos animais desempenham importante papel na busca de novas drogas com propriedades gastroprotetoras. As lesões da mucosa gástrica podem ser induzidas por diferentes modelos experimentais, cada um com seu próprio mecanismo. O mecanismo envolvido na formação das lesões gástricas tem sido estudado por vários pesquisadores, utilizando diferentes modelos animais. Um dos mecanismos estudados é o do envolvimento das prostaglandinas nas lesões gástricas, onde a ação protetora das prostaglandinas é medida pelo aumento da produção de muco e secreção de bicarbonato, modulação da secreção de ácido gástrico, inibição da liberação de mediadores mastocitários e manutenção do fluxo sanguíneo durante a exposição a estes agentes (SAMONINA *et al.*, 2004).

Os modelos experimentais que utilizam o sistema digestivo, ou parte dele, são de grande importância na busca de novas drogas. Modelos experimentais de úlcera gástrica e de secreção estomacal têm custo relativamente baixo, necessitando somente de animais e algumas drogas (CAMPOS, 2008).

A lesão gástrica por etanol é um modelo extensivamente utilizado para a avaliação de drogas antiulcerogênicas. Nesse modelo, as lesões ocorrem predominantemente na parte glandular do estômago com formação de leucotrienos C4 (LTC4), espécies reativas de oxigênio, produtos secretados pelos mastócitos, depleção de grupamentos sulfidríticos e diminuição do muco, resultando em danos à mucosa gástrica (CAMPOS, 2008).

Outro modelo bastante utilizado é a lesão induzida por indometacina. A administração da indometacina reduz de forma significativa a secreção de prostaglandinas (PG'S), bicarbonato e o fluxo sanguíneo em animais. A diminuição das PG's predispõe o estômago e o duodeno a danos na mucosa, enquanto que a presença das PG's exerce um papel de proteção (CAMPOS, 2008).

Dentre os vários mecanismos de defesa da mucosa gástrica pode-se destacar a presença dos grupos sulfidrílicos não-protéicos, a ativação de neurônios sensoriais aferentes, a ativação da síntese de prostaglandinas pelas ciclooxigenases (COXs), a presença de óxido nítrico pela ativação do óxido nítrico sintetase (ONs) constitutiva e ativação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) (JUNQUEIRA JÚNIOR, 2008).

No estômago, o óxido nítrico (ON) possui um papel importante na prevenção e reparo de injúrias no trato gastrintestinal, participando no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato no trato gastrintestinal, na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrintestinal, além de atuar como agente citoprotetor, antiinflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (MEDEIROS, 2006). MATSUDA *et al.* (1995) verificaram também que o ON reduz efetivamente a injúria na mucosa gástrica provocada por agentes químicos, como o etanol, além de facilitar a cicatrização do tecido lesado. A presença de ON em baixas concentrações está associada a efeitos benéficos no TGI, enquanto que o ON em altas concentrações pode induzir a formação de radicais derivados de nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens de células (MEDEIROS, 2006).

Também foi demonstrado que a administração de L-NAME, (L-nitro-arginina), um inibidor da ONs, acentua as lesões gástricas induzidas por etanol e aumenta a atividade da $H^+,K^+ATPase$, enquanto doadores de ON (nitroprussiato) reparam as lesões induzidas por etanol e inibem a atividade ATPásica em ratos (BULUT *et al.*, 1999).

As prostaglandinas, especialmente a PGE2, possuem efeitos citoprotetores da mucosa gástrica como consequência de vários mecanismos indiretos, como o aumento da produção de muco e bicarbonato que recobrem as células epiteliais, a inibição da motilidade gástrica, a inibição da secreção ácida gástrica, a manutenção do fluxo sanguíneo

gástrico, a inibição da apoptose, a inibição da ativação de mastócitos, e a diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular (ATAY *et al.*, 2000).

Em 1979, o termo "citoproteção" foi introduzido por Robert e colaboradores, que descreveram que as prostaglandinas, o produto principal do metabolismo do ácido araquidônico através da atividade da ciclooxigenase possui um papel crucial na manutenção da integridade da mucosa gástrica. Evidências experimentais mostram que as PGs exibem atividade na prevenção de danos na mucosa induzidas por substâncias necrosantes, como etanol, ácios, bases e soluções hipermolares. O mecanismo de citoproteção das PG's ainda é desconhecido, mas sabe-se que é devido à estimulação de produção de muco e secreção de bicarbonato, aumento na microcirculação da mucosa e a presença dos compostos sulfidrílicos na mucosa podem explicar esse fenômeno (BRZOZOWSKI *et al.*, 2005).

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria espiralada, móvel, Gram-negativa, responsável por uma das infecções mais difundidas no mundo, presente em aproximadamente 50% da população humana mundial. O *H. pylori* está associado à ocorrência de gastrite, úlcera duodenal ou gástrica e adenocarcinoma gástrica no último estágio e possui um papel crucial na patogênese da úlcera péptica e no câncer gástrico. A erradicação deste microrganismo resulta na cicatrização das lesões ulceradas, previne a recorrência de úlceras e pode reduzir a prevalência do câncer gástrico (ZAIDI *et al.*, 2009).

Vários fatores de risco foram identificados para a ocorrência de infecções pelo *H. pylori*, como baixo poder socioeconômico, etnia, idade e localização geográfica. A freqüência de infecção começou a decair nos países desenvolvidos, mas sua prevalência continua. O modo de transmissão deste patógeno pessoa-pessoa ainda é desconhecido, mas sabe-se que a bactéria pode ser transmitida via oral-oral ou oral-fecal (COLLINS *et al.*, 2006).

O *H. pylori* não só possui um mecanismo de sobrevivência em meio ácido, como também é capaz de alterar a secreção ácida. O mecanismo responsável por elevar a secreção ácida gástrica em pacientes infectados por *H. pylori* não está completamente elucidado, mas há evidências de ocorrência de alteração na liberação de gastrina e de somatostatina, quando essas bactérias colonizam o antró gástrico. A elevação da secreção

ácida, como resultado da infecção por *H. pylori*, pode contribuir na patogênese da úlcera duodenal (ALMEIDA, 2005).

Alem da relação do *H. pylori* com algumas doenças não-malignas que afetam o estômago (úlcera péptica, gastropatia induzida por DAINES, refluxo gastroesofágico e dispepsia) ser bastante complexa, ele continua sendo uma das causas mais comuns da úlcera péptica, de forma que o sucesso do tratamento da úlcera está associado à sua erradicação (COLLINS *et al.*, 2006).

O tratamento convencional do *H. pylori* se baseia em uma terapia tripla, que combina dois antibióticos e um inibidor da bomba de prótons. O sucesso deste tratamento está em torno de 80%, mas decai constantemente, devido o surgimento de cepas resistentes. Este tipo de tratamento, envolvendo diversas drogas, geralmente causa muitos efeitos colaterais e significa um custo elevado para o paciente, o que pode levar a uma falha na adesão ao tratamento. Estes fatores mostram a necessidade de encontrar novos agentes antibacterianos para o *H. pylori* (CASTILLO-JUÁREZ *et al.*, 2009).

1.6. Atividade antimicrobiana

A utilização de produtos naturais pelo homem é tão antiga quanto a sua própria história. Seu uso se dava tanto para fins nutricionais quanto para fins terapêuticos. O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças está associado à medicina popular de muitas partes do mundo, onde diferentes culturas dos mais distintos lugares conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças (CANDIDO, 2008).

Os produtos de origem natural, especialmente aqueles obtidos de plantas, são considerados uma fonte alternativa de medicação. A grande diversidade do território brasileiro tornou comum a prática da fitoterapia, despertando o interesse de muitos pesquisadores. As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas tradicionalmente no cuidado da saúde constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (BASTOS, 2007).

Muito antes da descoberta da existência dos microorganismos, as idéias de que certas plantas possuíam atividade cicatrizante e de que elas continham o que se podia caracterizar como *princípios antimicrobianos* eram muito bem aceitas. Desde a antiguidade, o homem utiliza as plantas para tratar doenças infecciosas e até hoje, algumas delas são incluídas como parte do tratamento de várias doenças (RIOS; RECIO, 2005).

Os principais produtos vegetais que possuem atividade antimicrobiana são os extratos, os óleos essenciais, as frações látex e as proteínas (MARQUES, 2007). O extrato alcoólico de própolis a 50% foi avaliado por Vargas *et al.* (2004) frente a 161 cepas de bactérias, sendo 81 Gram-positivas e 80 Gram-negativas, inibindo 67,7% das cepas, sendo mais efetivo contra as bactérias Gram-positivas. Nariman *et al.* (2004) constataram atividade antimicrobiana em extratos de plantas iranianas (*Glycyrrhiza aspera*, *Juglans regia*, *Ligustrum vulgare*, *Thymus kotschyanus*, *Trachyspermum copticum* e *Xantium brasiliicum*) sobre *H. pylori*.

A busca de substâncias vegetais com atividade antimicrobiana é de extrema importância, pois além de esclarecer o uso popular das plantas medicinais, proporciona a oportunidade de que sejam encontrados compostos com atividade antimicrobiana, muitas vezes superior aos fármacos atuais. Além do que, o aumento do número de cepas microbianas resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um grande desafio no tratamento das infecções, sendo notória a necessidade de se encontrar novas substâncias capazes de inibir ou matar estas cepas (PEREIRA *et al.* 2004).

1.7. Resistência microbiana

Nos últimos anos, a resistência microbiana aos quimioterápicos tem aumentado muito, representando, atualmente, um problema mundial.

Segundo TAVARES (2002), uma bactéria é dita resistente a um determinado antibiótico, quando capaz de crescer, *in vitro*, em presença da concentração inibitória que

essa droga atinge no sangue. De acordo com *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), um microrganismo é considerado resistente quando existe uma alta probabilidade de falha na terapêutica (MACGOWAN, 2008).

A resistência microbiana pode ser natural ou adquirida. A resistência natural, também conhecida como intrínseca, é uma característica biológica natural do microrganismo (ROSSI; ANDREAZZI, 2005) e é observada regularmente em uma determinada espécie bacteriana em relação a diferentes antimicrobianos. Essa forma de resistência é previsível e sua importância clínica é menor que a determinada pela resistência adquirida (TAVARES, 2002).

Resistência adquirida é aquela que surge em um microrganismo primitivamente sensível a um determinado antibiótico e pode estar relacionada aos fenômenos de mutação ou de recombinação genética (transformação, conjugação, transdução e transposição) (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A resistência dos microrganismos aos antimicrobianos pode variar entre os países e regiões e as cepas resistentes podem ser de origem hospitalar ou comunitária. Algumas espécies resistência estão amplamente difundidas em todo o mundo, como é o caso do *Staphylococcus aureus* (TORTORA, 2003; KONEMAN *et al.* 2001; TAVARES, 2001). A resistência de cepas de *S. aureus* à meticilina (MRSA) resulta de alterações genéticas, e foi descrita pela primeira vez no Reino Unido, em 1961, em um isolado de origem nosocomial. Desde então, MRSA tem se tornado um patógeno com alta prevalência na população (SICA; SPENCER, 2009) e as infecções causadas por essas cepas são responsável por cerca de um quinto de todas as infecções hospitalares, que custam em torno de 1 bilhão por ano para o Serviço de Saúde Nacional do Reino Unido (PESEWU *et al.*, 2008).

Em virtude do aumento da resistência aos antimicrobianos, a seleção de antibióticos na terapêutica tem se tornando uma tarefa difícil e desafiadora. No final da década de 90 e início dos anos 2000 evidenciou-se carência de novas drogas antimicrobianas aprovadas na América do Norte, resultando em uma limitação na terapia das doenças infecciosas. Em 2002, 89 drogas foram aprovadas nos EUA, mas não havia nenhum antimicrobiano. Em 2005, a *European Society of Clinical Microbiology and*

Infectious Diseases (ESCMID) manifestou preocupação no tratamento de várias doenças infecciosas, como tuberculose e pneumonia, devido à resistência dos microrganismos (LEE, 2008).

Muito antes da descoberta e desenvolvimento dos antibacterianos, as drogas de origem vegetal já eram as ferramentas de escolha mais comum no tratamento de diversas infecções. Muitas drogas frequentemente usadas no tratamento de doenças infecciosas foram isoladas de fontes de origem natural, como as plantas medicinais. Dessa forma, é possível se pensar nas plantas como fontes de novos agentes terapêuticos contra bactérias resistentes aos antimicrobianos (BUTTLER, 2006).

É conhecida a ação sinérgica de alguns extratos vegetais junto a antibacterianos normalmente utilizados na clínica, determinando uma diminuição na Concentração Inibitória Mínima do antibacteriano. No entanto, devido à complexidade estrutural das moléculas naturais, é difícil elucidar por quais mecanismos exercem suas atividades biológicas (BUTTLER, 2006).

Os principais produtos de origem vegetal com atividade antimicrobiana são os extratos, as frações látex, os óleos essenciais e as proteínas de origem vegetal. Os extratos são obtidos pelo tratamento do vegetal, com o solvente apropriado, e evaporação até atingir a consistência desejada. O uso de extratos vegetais no tratamento de doenças infecciosas é de grande importância e muitos estudos são realizados, em vários países, para comprovar a sua atividade antimicrobiana (CANDIDO, 2008).

Em um estudo realizado com 70 extratos de plantas originárias de Grécia e comercializadas e usadas popularmente nas enfermidades gástricas, incluindo as úlceras pépticas, foi verificado que os extratos de *Anthemis melanolepis*, *Cerastium candidissimum*, *Chamomilla recutita*, *Conyza albida*, *Dittrichia viscosa*, *Origanum vulgare*, *Stachys alopecuros* possuem atividade antimicrobiana sobre isolados clínicos de *H. pylori* (CANDIDO, 2008).

A existência de drogas antibacterianas de origem natural pode ser devida à evolução dos metabólitos secundários como substâncias ativas e que conferem vantagens aos organismos produtores. Esses produtos naturais parecem penetrar nas células e

interagir nos alvos protéicos, já que possuem uma complexidade estrutural que é comum em muitos alvos de antibacterianos (BUTLER, 2006).

O uso de antibióticos não é exclusivo ao tratamento de doenças infecciosas, mas também se estende a medidas profiláticas na população em geral e no processo de crescimento de animais. De forma que essas práticas acentuam a seleção de cepas microbianas resistentes, que podem chegar até ao homem através da cadeia alimentar (LIVERMORE, 2007). Assim, o rápido surgimento de cepas resistentes aos antibióticos faz com que diminua a efetividade do antimicrobiano, ao mesmo tempo em que se torna necessária a busca de novas drogas (BUTLER, 2006).

A efetividade dos antibióticos disponíveis atualmente diminui à medida que aumenta o número de bactérias resistentes causadoras de infecções e novos antimicrobianos serão necessários para a cura de infecções causadas por bactérias multiresistentes. (ROSSI & ANDREAZZI, 2006). De forma que a resistência microbiana aos antimicrobianos atuais vem sendo motivo de preocupação constante no tratamento das doenças infecciosas. Assim, nas últimas décadas a indústria farmacêutica tem produzido um grande número de novos antibióticos, no entanto o desenvolvimento de resistência a essas drogas vem ocorrendo rapidamente, o que torna impossível termos uma previsão segura de como, no futuro, os microrganismos reagirão aos novos antimicrobianos.

A busca de compostos vegetais com atividade antimicrobiana é de grande importância, pois possibilita uma nova opção para a farmacologia atual, onde os compostos vegetais muitas vezes possuem atividade antimicrobiana melhor que muitos fármacos utilizados comumente na terapêutica. Como a resistência aos antibióticos é uma preocupação crescente, torna-se necessário o estudo de novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microorganismos (BASTOS, 2007).

A biodiversidade brasileira e a busca de compostos biologicamente ativos faz crescer cada vez mais as pesquisas na área de produtos naturais. O uso de plantas medicinais é muito comum no Brasil para o tratamento de várias doenças, sendo que muitas vezes não existe uma comprovação científica de alguma atividade farmacológica. O

estudo das espécies vegetais contribui para o aumento no conhecimento das propriedades das espécies, além da importância sócio-econômica e uma promoção na formação de recursos humanos especializados.

A espécie vegetal *Matricaria recutita*, conhecida como camomila é usada na medicina popular e em cosméticos devidos ao conhecimento da existência de várias atividades farmacológicas. O alfa-bisabolol, um sesquiterpeno presente em seu óleo essencial, tem sua atividade antiinflamatória reconhecida, por isso, o interesse em avaliar o potencial farmacológico tanto da planta como da molécula isolada.

A alta prevalência de úlceras na população nos leva a testar alguns compostos para avaliar a existência da atividade de gastroproteção. Umas das principais causas de úlcera é a presença da bactéria *Helicobacter pylori*, o que nos levou a avaliar também a atividade antimicrobiana. A promoção do aumento do conhecimento sobre as plantas medicinais pode levar ao desenvolvimento de novas drogas, e assim, favorecer a população com seus usos.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as atividades gastroprotetora, antioxidante, citotóxica e antimicrobiana do extrato de camomila e do seu constituinte volátil, o alfa-bisabolol.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial gastroprotetor do extrato seco da camomila e do alfa-bisabolol;
- Verificar o papel do óxido nítrico, das prostaglandinas e dos canais de K^+ _{ATP} como possíveis mecanismos de ação da atividade gastroprotetora do alfa-bisabolol;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato seco da camomila e do alfa-bisabolol;
- Investigar a toxicidade do extrato seco da camomila e do alfa-bisabolol em neutrófilos humano;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato seco da camomila e do alfa-bisabolol sobre as cepas microbianas originárias da ATCC (*American Type Culture Collection*);
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato seco da camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas isoladas de espécimes clínicos apresentando perfil de multirresistência a antimicrobianos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais

3.1.1. Material de estudo

O extrato seco de *Matricaria recutita* foi produzido pela Gerbrás Química Farmacêutica (Brasil) e o alfa-bisabolol foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis-USA). O extrato seco foi padronizado em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Alliance Waters, USA), segundo método descrito na *United States Pharmacopoeia* (2006), que emprega a apigenina-7-glicosídio como marcador químico.

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia-Setor de Tecnologia de Produtos Naturais/Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação da Profa. Dra. Luiza Kalyne Almeida Moreira Leal.

3.1.2. Animais

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar (150 – 200 g), oriundos do biotério do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em gaiolas apropriadas e mantidos sob temperatura média de 26 ⁰C, em ciclos claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água “*ad libitum*”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos por 18 horas antes da realização cada experimento.

3.1.3. Cepas Microbianas

Cepas microbianas foram obtidas na *American Type Culture Colection* (ATCC), doadas pelo Laboratório de Materiais de Referência da Fiocruz: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

9027, *Salmonella choleraesuis* spp. *choleraesuis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231. Também foram utilizadas nesse estudo cepas microbianas isoladas de espécimes clínicos, com perfil de multirresistência a antimicrobianos.

3.2 Aspectos éticos

O projeto foi submetido à análise e aprovado junto ao Comitê de Ética de Pesquisa em Animais (CEPA), com o número do protocolo 38/08.

3.3. Métodos

3.3.1. Avaliação da atividade gastroprotetora

A avaliação da atividade gatroprotetora do extrato seco das flores de camomila (ESFC) e do alfa-bisabolol (BISA) foram feitos pelos modelos experimentais de lesão gástrica induzida por etanol.

3.3.1.1. Lesão gástrica induzida por etanol

Ratos machos (n=8/grupo), em jejum de sólidos por 18 horas, foram tratados, com 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) em água destilada, 10 mL/Kg, via oral (v.o.) (veículo), alfa-bisabolol (BISA) (25, 50 e 100 mg/Kg, v.o.) e extrato seco de flores de camomila (ESFC) (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.) Uma hora após os tratamentos, os animais receberam 1,0 mL de etanol absoluto e após 30 minutos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. O percentual de área gástrica lesionada foi determinado com o auxílio

de um programa de planimetria computadorizada (*Image J*). A área ulcerada foi expressa em termos de porcentagem em relação à área total do corpo gástrico (ROBERT *et al.*, 1979).

3.3.2. Avaliação dos mecanismos de ação do efeito gastroprotetor na lesão gástrica induzida por etanol em ratos.

Para avaliar o possível mecanismo de ação do BISA, foram utilizados os modelos animais experimentais para o estudo do envolvimento do óxido nítrico, das prostaglandinas e dos canais de K^{+}_{ATP} .

3.3.2.1. Papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.

Ratos machos (n=8/grupo), em jejum de sólidos por 18 h, foram tratados com BISA (100 mg/Kg, v.o), N^G -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), 10 mg/kg, via intraperitoneal, (i.p.) ou veículo (DMSO 5%; 10 mL/kg, v.o), 30 minutos ou 1h antes da administração do etanol_{abs} (1,0 mL/animal, v.o.). O envolvimento do óxido nítrico foi avaliado pela administração de L-NAME 30 minutos antes da administração do BISA. Após 30 minutos os animais receberam etanol_{abs} (1,0 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos da administração do etanol_{abs} os animais foram sacrificados e os estômagos analisados como descrito anteriormente (item 3.3.2.1) (MATSUDA *et al.*, 1999).

3.3.2.2. Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

Ratos machos (n=8/grupo), em jejum de sólidos por 18 h, foram tratados com BISA (100 mg/Kg, v.o), indometacina, inibidor da síntese de prostaglandinas (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (DMSO 5%; 10 mL/kg, v.o.) 30 min ou 1h antes da administração do etanol_{abs} (1,0 mL/animal, v.o.). O envolvimento das prostaglandinas foi avaliado pela administração de indometacina 2 h antes da administração do BISA. Após 30 minutos os animais receberam etanol_{abs} (1,0 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos da administração do etanol os animais foram sacrificados e os estômagos analisados como descrito anteriormente. (item 3.3.2.1) (BARGHAVA, 1973).

3.3.2.3. Papel dos canais de potássio dependentes de ATP em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

Ratos machos (n=8/grupo), em jejum de sólidos por 18 h, foram tratados com BISA (100 mg/Kg, v.o), glibenclamida, um inibidor dos canais de potássio, (5 mg/kg, i.p.) ou veículo (DMSO 5%, 10 mL/kg, v.o.) 30 minutos ou 1 h antes da administração do etanol_{abs} (1,0 mL/animal, v.o.). O envolvimento dos canais de K⁺_{ATP} foi avaliado pela administração de glibenclamida 30 minutos antes da administração do BISA. Após 30 minutos os animais receberam etanol (1,0 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos da administração do etanol_{abs} os animais foram sacrificados e os estômagos analisados como descrito anteriormente (item 3.3.2.1) (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

3.3.3. Atividade antioxidante: método do radical DPPH

O método (SAINT-CRICQ DE GAULEJAC *et al.*, 1999) baseia-se na capacidade de remoção de radicais livres através do radical do DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl). Alíquotas (0,1 mL) das drogas testes, ESFC ou BISA (10, 50 e 100 µg/mL), α -tocoferol (50 µg/mL, controle positivo) ou veículo (controle negativo) foram adicionadas a 3,9 mL de solução de DPPH (1:1 de metanol: etanol). Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Beckman Instruments Inc.) no comprimento de onda de 517 nm. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = [(A_o - A_c/A_o) \times 100]$$

Onde A_o é a absorbância do controle e A_c é a absorbância das drogas testes (ESFC e BISA). Todos os testes foram realizados em triplicata e os gráficos construídos a partir das médias desses valores.

3.3.4. Avaliação da citotoxicidade em neutrófilos - alterações na permeabilidade celular

Sangue humano (*Buffy Coat*) foi obtido no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Ceará (HEMOCE). As células polimorfonucleares foram isoladas pelo método descrito por LUCISANO; MANTOVANI, 1984. Alíquotas de 1 mL de PMNs (5×10^6 células/mL) foram incubadas por 15 minutos a 37° com *Hanks balanced salt solution* (HBSS-gel) (controle negativo), ESFC (100, 50, 10, 5 µg/mL), BISA (100, 50, 10, 5 µg/mL) e Triton X-100 (controle negativo). A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada com auxílio de espectrofotômetro (340 nm) de acordo com as instruções do fabricante (LabTeste), pela medida do decréscimo da absorção da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), em comprimento de onda de 340 nm,

realizada em espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU 640 Spectrophotometer). Os resultados foram expressos como a média \pm EPM de três experimentos realizados em triplicata em dias diferentes.

3.3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

As análises microbiológicas para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco de camomila e do alfa-bisabolol e do foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC.

3.3.5.1. Determinação do potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol e do extrato seco de camomila sobre cepas microbianas

Culturas microbianas puras, mantidas em ágar estoque sob refrigeração, foram repicadas para Caldo BHI (Brain-heart Infusion) (Merck) e incubadas a 35°C até atingirem uma turvação visivelmente equivalente à do tubo 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL). Com o auxílio de *swab* estéreis, essas suspensões foram semeadas na superfície do Ágar Mueller-Hinton (Merck) (para cepas bacterianas) ou Ágar Sabouraud-dextrose (Merck) (para cepas de leveduras). De acordo com a metodologia e para evitar resultados incorretos, a camada de ágar na placa de *Petri* deve ter de 3 a 4 mm de espessura e deve ser semeada em três direções, para que seja obtido um crescimento confluente e homogêneo. Após 5 minutos, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no ágar, utilizando-se para isso um perfurador estéril (VARDAR-ÜNLÜ *et al.*, 2003). Nesses poços foram aplicadas diferentes concentrações de alfa-bisabolol e do extrato seco das flores da camomila (Figura 05).

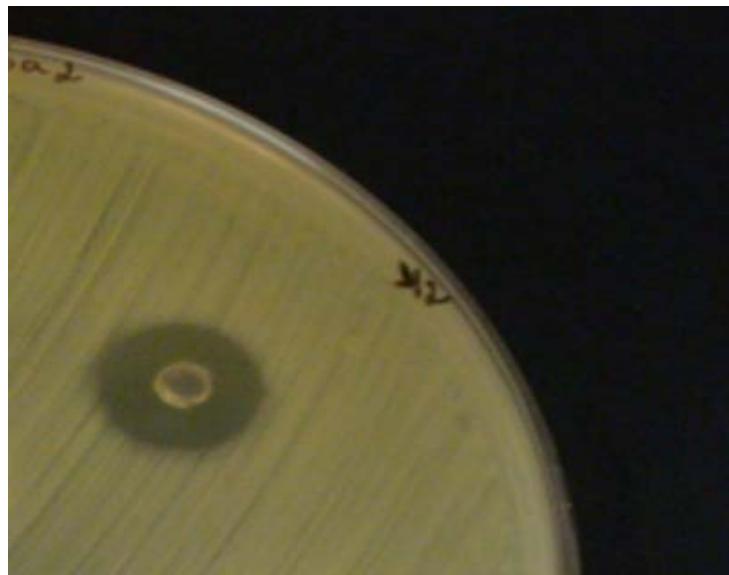


Figura 05. Representação da área de mensuração do halo de inibição na placa de ensaio com meio sólido de Mueller-Hinton.

O extrato seco das flores de camomila nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 mg/mL e o alfa-bisabolol foi testado nas concentrações de 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg/mL.

Após 30 minutos à temperatura ambiente, os meios de cultura semeados foram incubados a 35 °C/18 h. A medida dos halos de inibição foi realizada com auxílio de paquímetro e expressa em milímetro (mm). Os halos de inibição foram calculados pela média dos valores obtidos em três ensaios.

3.3.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

A determinação da CIM será realizada através da técnica de microdiluição em placas de acordo com a Norma M7-A6, Vol. 23 Nº 2, CLSI, 2003. Esse método envolve o uso de pequenos volumes de reagentes e a avaliação de grande número de bactérias, fornecendo informações quantitativas indisponíveis quando utilizado o método de difusão em ágar.

As culturas puras de bactérias e levedura foram repicadas para caldo infusão de cérebro e coração (caldo BHI) e caldo Sabouraud-dextrose 2%, respectivamente, incubadas

a 35°C por aproximadamente 6 horas e seu crescimento ajustado de acordo com a turvação visível do tubo 0.5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL) como descrito no item 4.2.5.1. As culturas microbianas foram diluídas 100 vezes (para aproximadamente 10^6 UFC/mL) em caldo BHI (bactérias) ou em caldo Sabouraud-dextrose 2% (levedura). Aliquotas das suspensões foram transferidas para placas de 96 poços (125µL/poço), contendo 25µL/poço, de diferentes concentrações (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562; 0,0781 e 0,0391mg/mL) do ESFC ou do BISA. Cada poço continha 100µL de caldo BHI (bactérias) ou de caldo Sabouraud-dextrose (levedura). Poços contendo meio de cultura, DMSO a 4% (para o BISA) e Tween 80 a 1% (para o ESFC) e inóculo do microorganismo em estudo serviram como controle negativo; já para controles positivos foram utilizados poços contendo meio de cultura, um agente antimicrobiano de uso comercial e o inóculo do microorganismo em estudo. As placas foram então incubadas a 35°C/24h e a inibição do crescimento microbiano foi determinada por inspeção visual e através da mensuração da absorbância a 490nm, em leitora de Elisa. A mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (ausência de turvação visível) foi considerada como CIM.

3.3.5.3. Determinação da Concentração Letal Mínima – CLM

A Concentração Letal Mínima (CLM), em contraste com a CIM, é a menor concentração de uma droga, expressa em µg/mL, que produz a morte de 99,9% das células microbianas avaliadas. A determinação da CLM será realizada pelo método de *Pour-Plate*, de acordo com a metodologia descrita por Baron *et al.* (1994). Essa técnica consiste na semeadura de inóculos microbianos na superfície de ágar *Plate-Count*.

Aliquotas de 25µL foram repicadas, de modo asséptico, dos poços que não apresentaram turvação visível, na determinação da CIM (item 3.2.5.1.) para Ágar *Plate-Count*. Após incubação durante 24h a 35°C foi realizada a contagem das colônias crescidas na superfície do meio. A concentração correspondente as placas onde o número de colônias crescidas foi $\leq 0,1\%$ ao inóculo adicionado inicialmente foram consideradas como a CLM, ou seja, a menor concentração de extrato de camomila ou de alfa-bisabolol com ação letal sobre a cepa testada.

4.Estatística

Os dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste de Student-Newman-Keuls e teste de Tukey. Para todas as análises será considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

5.1. Atividade gastroprotetora

5.1.1. Efeito do ESFC nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

Os efeitos do ESFC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol estão demonstrados na **Tabela 01** e **Figura 06**. Os animais que receberam apenas veículo mostraram, após a administração oral do etanol absoluto, extensa área de lesão da mucosa gástrica. O ESFC nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, v.o., reduziu de forma significativa (*p<0,001) o percentual de área ulcerada para 78, 68 e 89%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle.

Tabela 01- Efeito do ESFC no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (ROBERT *et al.*, 1979).

Grupos	Dose (mg/kg)	Área lesionada mm ²	(%) área lesionada	Inibição (%)
Controle	-	18,20 ± 3,74	100	-
	100	4,00 ± 1,70***	22	78
	200	6,40 ± 1,87***	32	68
	400	2,07 ± 1,20***	11	89

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área gástrica ulcerada. Veículo (2% DMSO, 10 ml/Kg, v.o.) e ESFC foram administrados, por via oral, 1 h antes da administração oral de etanol_{abs} (1,0 mL/animal). Os animais (n=8) foram sacrificados 30 min após a administração do etanol. ***p < 0,001 vs. Controle(ANOVA e teste de Student-Newman-Keul).

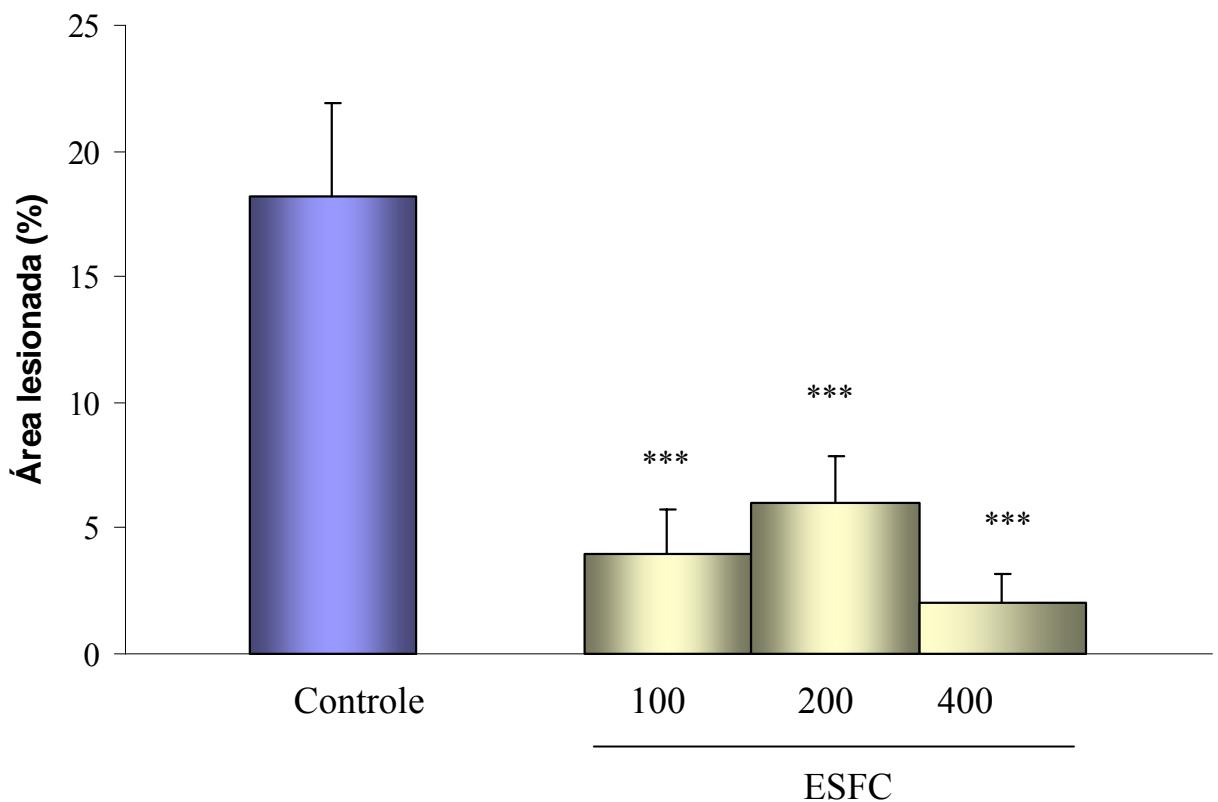


Figura 06: Efeito do extrato das flores de camomila na lesão gástrica induzida por etanol (ROBERT *et al.*, 1979).

Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada. *** $p<0,001$ vs Controle (ANOVA e teste de Student-Newman-Keul). Veículo (2% de DMSO, 10 mL/Kg, v.o.), ESFC (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes da administração de etanol absoluto (1,0 mL/animal, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo.

5.1.2. Efeito do BISA nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

Os animais que receberam apenas veículo (controle) mostraram, após a administração oral de etanol absoluto, extensa área de lesão da mucosa gástrica. BISA nas doses de 50 e 100 mg/Kg, v.o., reduziu de forma significativa ($p<0,001$) o percentual de área ulcerada para 87 e 96 %, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (**Tabela 02** e **Figura 07**).

Na **Figura 08** estão demonstradas fotos com os aspectos macroscópicos das lesões gástricas induzidas por etanol e inibição das mesmas após o tratamento com BISA 100mg/Kg.

Tabela 02 - Efeito do alfa-bisabolol no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (ROBERT *et al.*, 1979).

Grupos	Dose (mg/kg) mm ²	Área lesionada	(%)área lesionada	Inibição (%)
BISA	-	47,00 ± 0,69	100	-
	25	51,28 ± 1,31	109	- 9
	50	6,15 ± 0,04***	13	87
	100	1,90 ± 0,03***	4	96

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área gástrica ulcerada. *** $p < 0,001$ vs. Controle. (ANOVA e teste de Student Newman-Keul). Veículo (2% DMSO, 10 ml/Kg, v.o.) e α -bisabolol (BISA 25, 50 ou 100 mg/kg) foram administrados, por via oral, 1 h antes da administração oral de etanol_{abs} (1,0 mL/animal). Os animais (n=8) foram sacrificados 30 min após a administração do etanol.

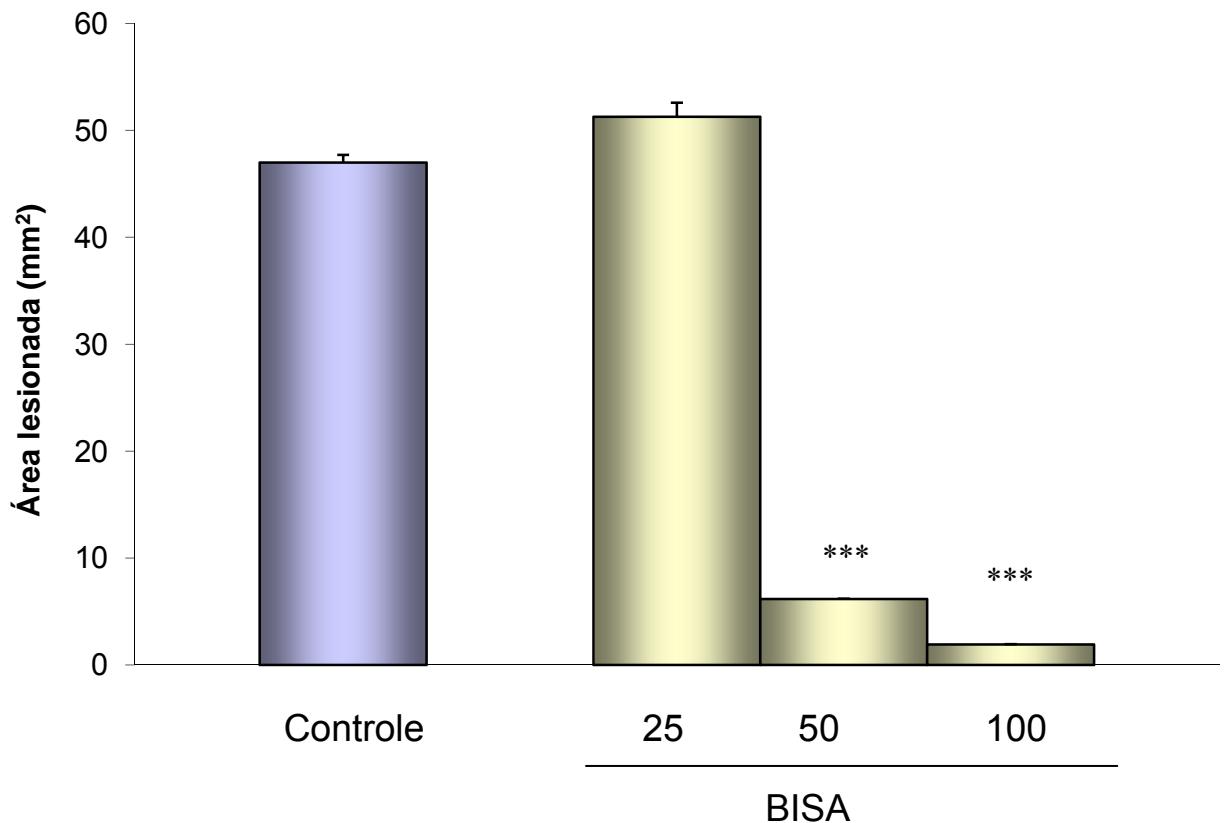


Figura 07: Efeito do alfa-bisabolol na lesão gástrica induzida por etanol (ROBERT *et al.*, 1979).

Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada. *** $p<0,001$ vs Controle. (ANOVA, teste Student-Newman-Keul). Veículo (2% DMSO, 10 mL/Kg, v.o.), α -bisabolol (BISA 25, 50 e 100 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes da administração de etanol_{abs} (1,0 mL/animal, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo.



FIGURA 08. Aspectos macroscópicos de estômago de ratos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol. (A) – Estômago aberto pela grande curvatura de um rato no qual foi administrado etanol_{abs} (1,0 mL/Kg, v.o.). (B) – Estômago aberto pela grande curvatura de um rato tratado α -bisabolol (50 mg/kg, v;o.), 1 h antes da administração oral de etanol_{abs}. (C) – Estômago aberto pela grande curvatura de um rato tratado com α -bisabolol (100 mg/Kg, v.o.), 1 h antes da administração oral de etanol_{abs}

5.1.3. Papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

Os animais que receberam apenas veículo mostraram, após a administração oral do etanol_{abs}, extensa área de lesão da mucosa gástrica. BISA (100 mg/Kg, v.o.) reduziu o percentual de lesão gástrica (46 %) em comparação com o grupo controle (100 %), o que corresponde a um percentual de inibição de 54 %. O efeito gastroprotetor do BISA (100 mg/Kg, v.o.) foi bloqueado (79 %) de forma significativa, com $p<0,05$ na presença do L-NAME (20 mg/Kg, i.p.). Os resultados obtidos com a avaliação do papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA, nesse modelo, podem ser observados na **Tabela 03** e **Figura 09**.

Tabela 03 - Papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (MATSUDA *et al.*, 1999).

Grupos	Dose (mg/kg)	Área lesionada mm ²	(%) área lesionada	Inibição (%)
Controle	-	45,50 ± 0,81	100	-
BISA	100	20,80 ± 1,17*	46	54
BISA + L-NAME	100 + 20	36,10 ± 1,80	79	21

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área gástrica ulcerada. *** $p < 0,001$ vs. Controle. (ANOVA e teste de Student Newman-Keul). Veículo (2% DMSO, 10 ml/Kg, v.o.) e α -bisabolol (BISA 100 mg/kg) foram administrados, por via oral, 1 h antes da administração oral de etanol_{abs} (1,0 mL/animal). L-NAME (20 mg/kg) foi administrado 30 minutos antes do BISA. Os animais (n=8) foram sacrificados 30 min após a administração do etanol

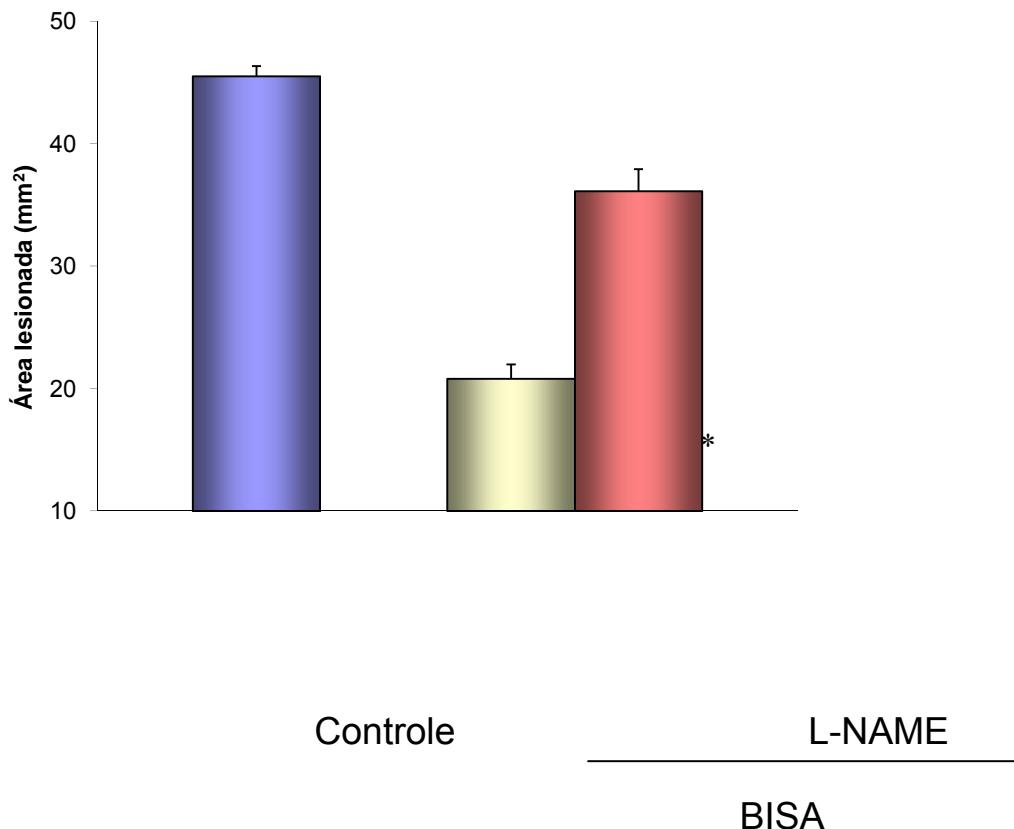


Figura 09. Papel do óxido nítrico (ON) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (MATSUDA *et al.*, 1999).

BISA (100 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes da administração de etanol absoluto (1,0 mL/animal, v.o.). L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) foi administrada 30 min antes do BISA. (Foram utilizados 8 animais por grupo). Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada.* $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA e teste de Student Newman-Keul).

5.1.4. Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

Os animais do grupo controle, os quais receberam apenas veículo antes da administração oral do etanol absoluto, apresentaram extenso percentual de área gástrica ulcerada. O efeito gastroprotetor do BISA (100 mg/Kg, v.o.) foi bloqueado de forma significativa ($p<0,05$) na presença de indometacina (10 mg/Kg, v.o.), um antiinflamatório não esteroidal (AINE) que atua inibindo as ações da enzima ciclooxygenase (COX). Os resultados obtidos com o modelo que avalia do papel das PG's no efeito gastroprotetor do BISA estão demonstrados na **Tabela 4** e **Figura 10**.

Tabela 04- Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (BARGHAVA, 1973).

Grupos	Dose (mg/kg)	Área lesionada mm ²	(%) área lesionada	Inibição (%)
Controle	-	$45,50 \pm 0,81$	100	-
BISA	100	$20,80 \pm 1,17^*$	46	54
BISA + INDO	100 + 10	$61,80 \pm 2,12$	136	- 36

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da área gástrica ulcerada. *** $p < 0,001$ vs. Controle. (ANOVA e teste de Student Newman-Keul). Veículo (2% DMSO, 10 ml/Kg, v.o.) e α -bisabolol (BISA 100 mg/kg) foram administrados, por via oral, 1 h antes da administração oral de etanol_{abs} (1,0 mL/animal). Indometacina (INDO) (10 mg/kg) foi administrado 30 minutos antes do BISA. Os animais (n=8) foram sacrificados 30 min após a administração do etanol.

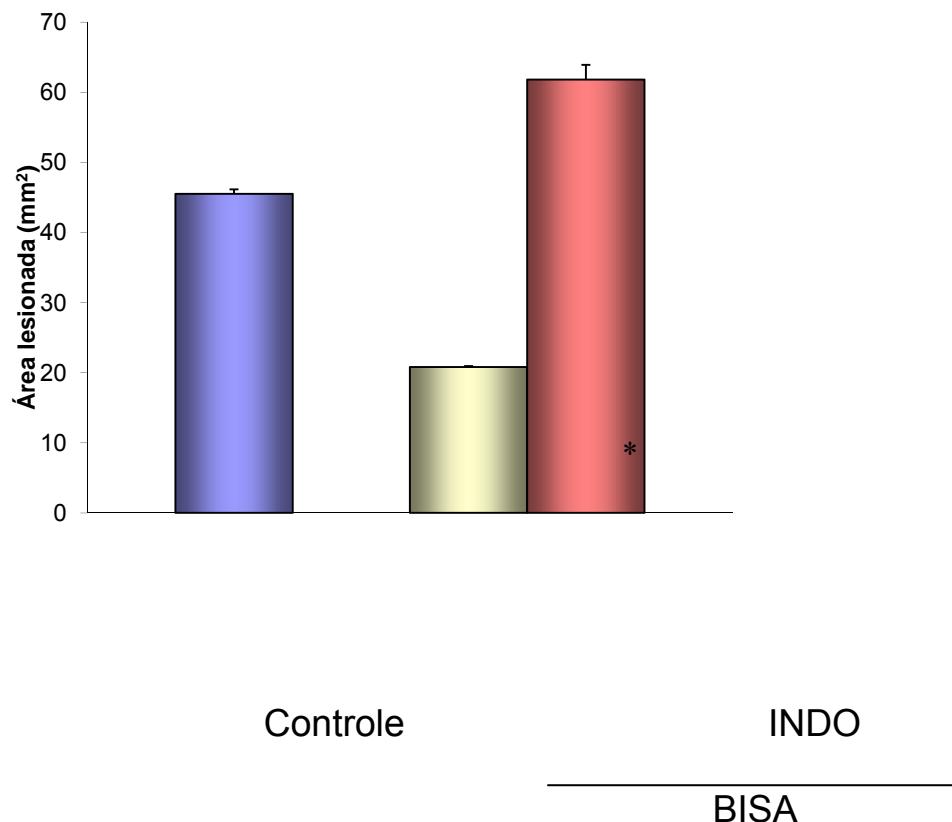


Figura 10. Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (BARGHAVA, 1973).

BISA (100 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes antes da administração de etanol absoluto (1,0 mL/animal, v.o.). Indometacina (10 mg/Kg, i.p.) foi administrada 30 min antes do BISA. (Foram utilizados 8 animais por grupo). Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada. * $p < 0,05$ vs. Controle. (ANOVA e teste de Student- Newman-Keul).

5.1.5. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K^+_{ATP}), no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos

Os resultados obtidos com a avaliação do papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K^+_{ATP}) no efeito gastroprotetor do BISA, neste modelo, podem ser observados na **Tabela 05** e **Figura 11**. O efeito gastroprotetor do BISA (100 mg/Kg, v.o.) foi bloqueado de forma significativa, com ($p<0,05$), na presença de glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.), um bloqueador dos canais de potássio ATP-dependentes.

Tabela 05- Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K^+_{ATP}) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (SEDLAK & LINDSAY, 1968).

Grupos	Dose (mg/kg)	Área lesionada mm ²	(%)área lesionada	Inibição (%)
Controle	-	$45,50 \pm 0,81$	100	-
BISA	100	$20,80 \pm 1,17^*$	46	54
BISA + GLIB	100 + 5	$145,6 \pm 6,68$	32	68

Veículo (2% DMSO, 10 ml/Kg, v.o.) e alfa-bisabolol (BISA 100 mg/kg) foram administrados, por via oral, 1 h antes da administração oral de etanol_{abs} (1,0 mL/animal). Glibenclamida (GLIB 5 mg/kg) foi administrado 30 minutos antes do BISA. Os animais (n=8) foram sacrificados 30 min após a administração do etanol. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área gástrica ulcerada. *** $p < 0,001$ vs. Controle. (ANOVA e teste de Student-Newman-Keul).

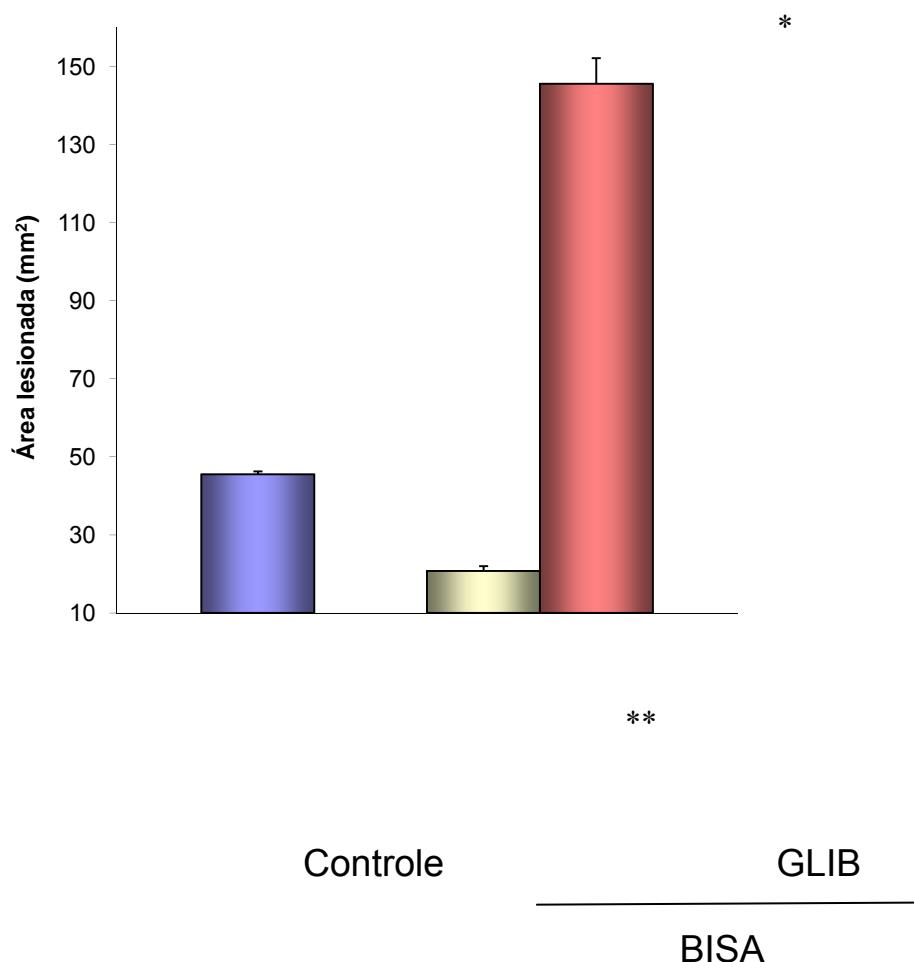


Figura 11. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K^{+}_{ATP}) no efeito gastroprotetor do BISA em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (SEDLAK & LINDSAY, 1968).

Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada. ** p < 0,01 vs. Controle. * p < 0,05 vs. BISA (ANOVA e teste de Student-Newman-Keul). BISA (100 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h antes da administração de etanol absoluto (1,0 mL/animal, v.o.). Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) foi administrada 30 min antes do BISA. (Foram utilizados 8 animais por grupo).

5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol através do método DPPH.

As figuras 12 e 13 mostram o resultado da atividade antioxidante do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol em diferentes concentrações em comparação com o alfa-tocoferol (vitamina E), que tem atividade antioxidante reconhecida, sendo utilizado no teste como controle positivo. Tanto o ESFC quanto o BISA não apresentaram um efeito antioxidante comparável com o da vitamina E (antioxidante padrão), que foi capaz de capturar cerca de 90% do radical DPPH.

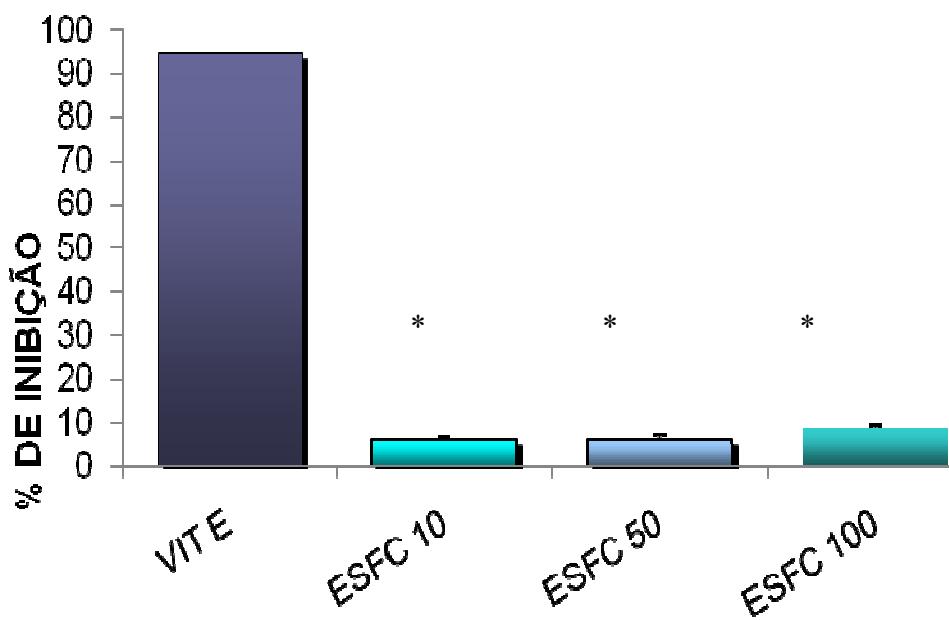


Figura 12. Avaliação do efeito antioxidante do extrato seco das flores de camomila através do método DPPH (SAINT-CRICQ DE GAULEJAC *et al.*, 1999).

O extrato seco das flores de camomila (ESFC nas concentrações de 10, 50 e 100 μ g/mL) e vitamina E (50 μ g/mL) foi adicionado à solução de DPPH e feita a leitura em espectrofotômetro. Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de inibição do potencial oxidante.* p<0,05 vs controle positivo (ANOVA, teste de Tukey).

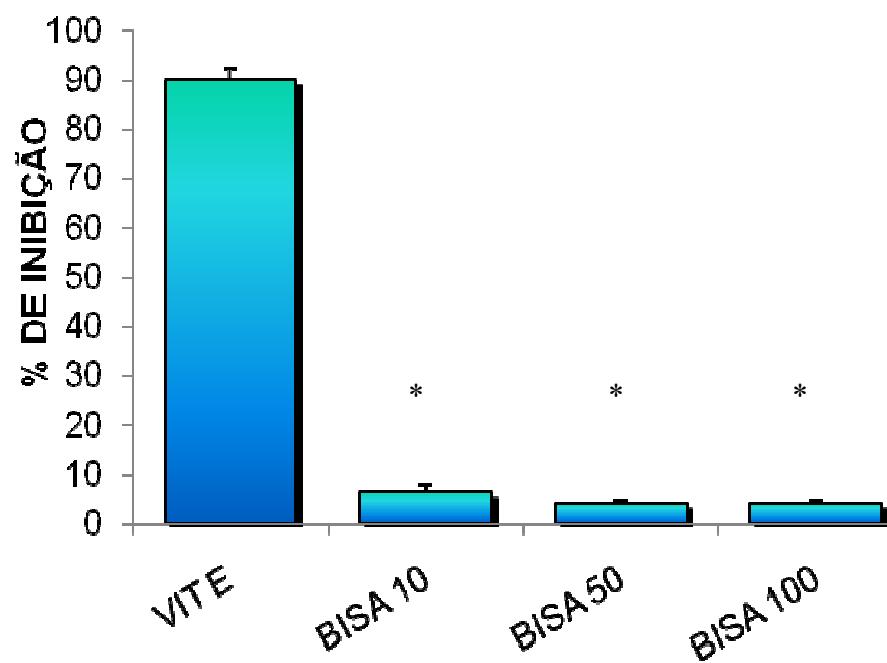


Figura 13. Avaliação do efeito antioxidante do alfa-bisabolol através do método DPPH (SAINT-CRICQ DE GAULEJAC *et al.*, 1999).

O alfa-bisabolol (BISA nas concentrações de 10, 50 e 100 μ g/mL) e vitamina E (50 μ g/mL) foi adicionado à solução de DPPH e feita a leitura em espectrofotômetro. Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de inibição do potencial oxidante.* $p<0,05$ vs controle positivo (ANOVA, teste de Tukey).

5.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA

5.3.1 Avaliação da citotoxicidade do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol em neutrófilos humano.

Foi avaliada a citotoxicidade do extrato seco da camomila e do alfa-bisabolol em células de neutrófilos humano.

Foram testadas as concentrações de 5, 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as duas drogas testes, Hanks gel como controle negativo e Triton X como controle positivo (lesão da célula com o aumento da atividade da enzima LDH no meio). O veículo utilizado nas amostras foi o DMSO a 4%, que no experimento mostrou não possuir atividade citotóxica. Foi verificado que o ESFC possui potencial citotóxico nas doses de 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 14**). O BISA mostrou atividade citotóxica nas doses testadas (ver **Figura 15**), entretanto, somente na dose de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não ocorre liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), ou seja, nessa dose não há citotoxicidade.

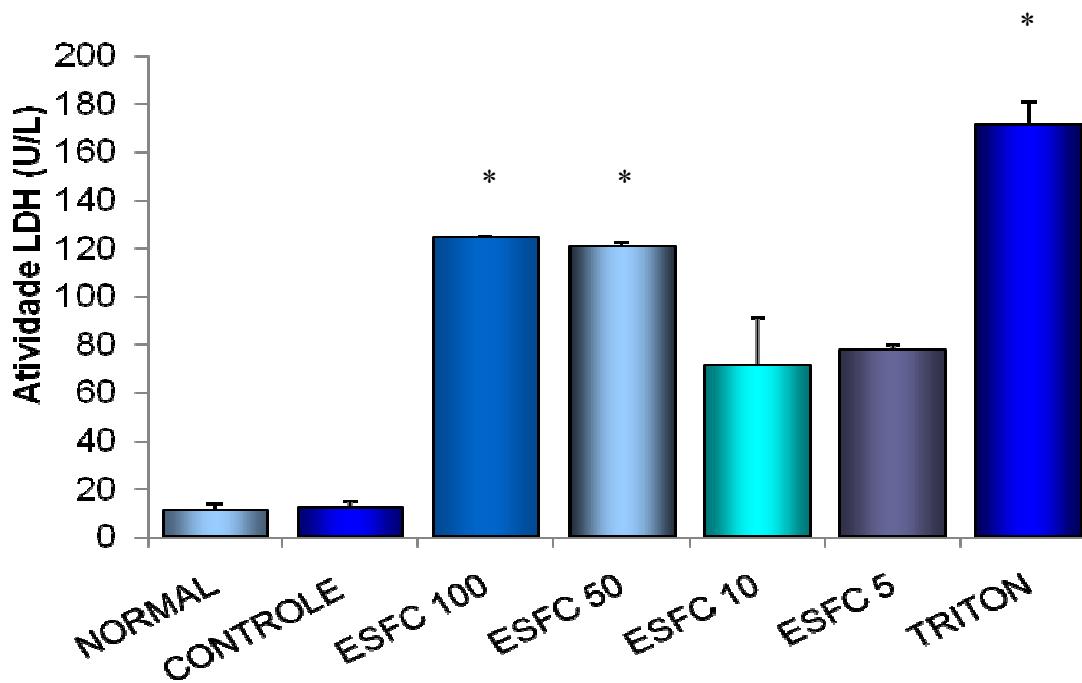


Figura 14. Avaliação da citotoxicidade do extrato seco das flores de camomila em neutrófilos humano, mensurado pela atividade da lactato desidrogenase.

O extrato seco das flores de camomila (ESFC), Triton X-100 0,2%, DMSO 4% (controle) ou HBSS (normal) foram adicionadas a suspensão de células (5×10^6 céls/mL) 15 minutos antes da determinação da lactato desidrogenase. Os resultados representam a média \pm EPM. * $p<0,05$ vs controle (ANOVA, teste de Tukey).

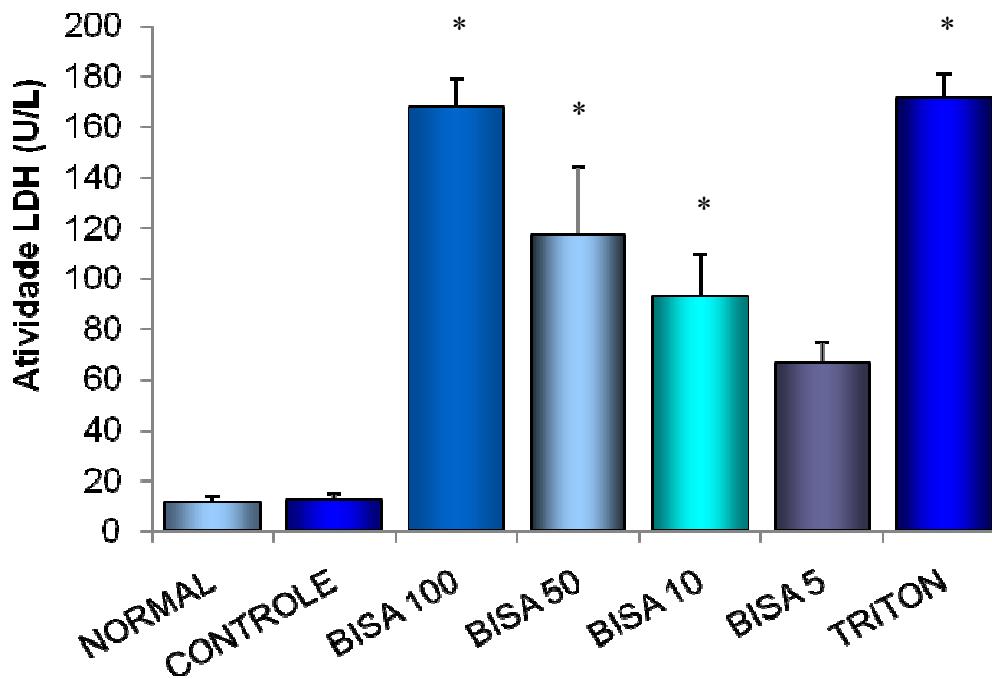


Figura 15. Avaliação da citotoxicidade do alfa-bisabolol em neutrófilos humano, mensurado pela atividade da lactato desidrogenase.

O alfa-bisabolol (BISA), Triton X-100 0,2%, DMSO 4% (controle) ou HBSS (normal) foram adicionadas a suspensão de células (5×10^6 céls/mL) 15 minutos antes da determinação da lactato desidrogenase. Os resultados representam a média \pm EPM. * $p<0,05$ vs controle (ANOVA, teste de Tukey).

5.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.4.1. Potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias da *American Type Culture Collection (ATCC)*

O potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol foi avaliado pela inibição do crescimento microbiano através o método de difusão em ágar (CLSI, 2003). Foram testadas as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* spp. *choleraesuis* ATCC 10708 e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231.

O ESFC inibiu o crescimento da levedura *C. albicans*, mas não teve nenhuma atividade sobre as cepas bacterianas testadas (**Tabela 06**), enquanto o BISA foi capaz de inibir o crescimento tanto da levedura *C. albicans* (**Tabela 07, Figura 16**) quanto da bactéria Gram-positiva *S. aureus* (**Tabela 07, Figura 17**).

Para o alfa-bisabolol foram testadas diluições menores, até a concentração 0,0039 mg/mL (3,90 µg/mL),sendo que somente até a concentração 0,0625 mg/mL foi possível encontrar halo de inibição de crescimento do microrganismo.

Tabela 06 – Potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila (ESFC) sobre cepas microbianas originárias da ATCC determinado pela técnica de difusão em ágar (CLSI, 2003).

ESFC (mg/mL)	Cepas Microbianas					Diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm)*
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E.coli</i> ATCC 10536	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>S.choleraesuis</i> s	<i>C.albicans</i> ATCC ATCC 10231	
5	-	-	-	-	-	9 ± 0,00
2,5	-	-	-	-	-	-
1,25	-	-	-	-	-	-
0,625	-	-	-	-	-	-
0,3125	-	-	-	-	-	-
0,15625	-	-	-	-	-	-
Controles						
Amicacina 1,2 mg/mL	20	25	23	26	NT	
Cetoconazol 2 mg/mL	nt	nt	nt	nt		22
Tween 80 1%	-	-	-	-	-	-

(-) Não inibição do crescimento microbiano

nt – Não testado

Controles positivos: Amicacina e Cetoconazol

Controle negativo: Tween 80 a 1%.

Volume de extrato seco das flores de camomila aplicado em cada poço = 25 µL

O halo de inibição de crescimento é representado em milímetros, incluindo os 6 mm de diâmetro do poço, e foram as medidas foram realizadas após 18h de incubação.

*Os valores representam média de dois ensaios independentes realizados em duplicita.

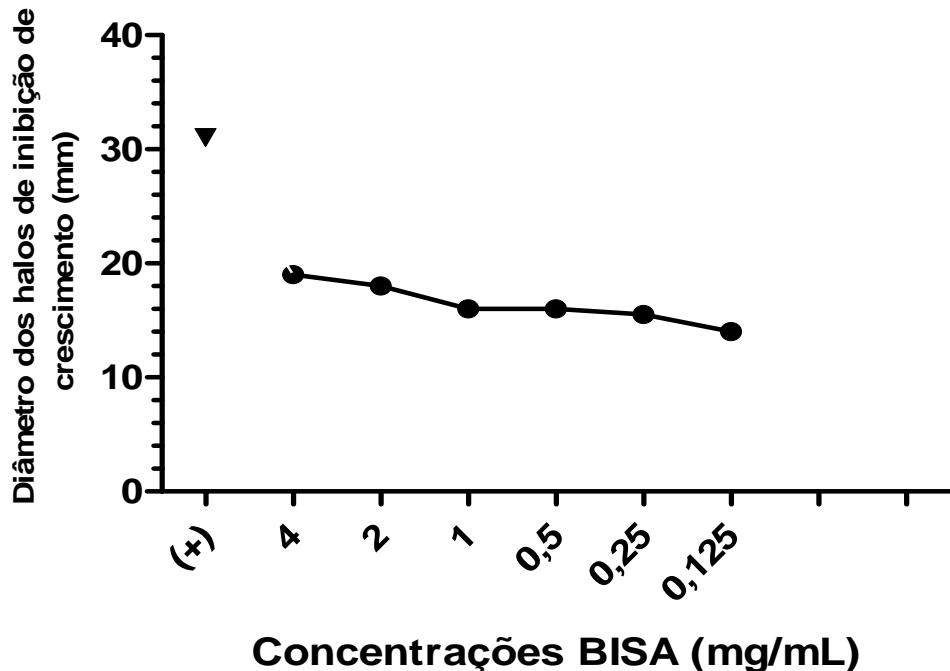


Figura 16: Potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol sobre a cepa de levedura *C. albicans* ATCC 10231 determinado pela técnica de difusão em ágar (CLSI, 2003).

Os halos de inibição de crescimento, após 18h de incubação, são representados em milímetro, incluindo os 6 mm de diâmetro do poço. (+) controle positivo: cetoconazol 2mg/mL. Os valores representam a média ± EPM de dois ensaios independentes realizados em duplicita.

Tabela 07 – Potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias da ATCC determinado pela técnica de difusão em ágar (CLSI, 2003).

BISA (mg/mL)	Cepas Microbianas				
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>C. albicans</i> ATCC
	Diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm)*				
4	10,0 ± 2,00	-	-	-	19,0 ± 1,00
2	9,0 ± 1,00	-	-	-	18,0 ± 0,00
1	8,0 ± 1,00	-	-	-	16,5 ± 1,00
0,5	9,0 ± 1,00	-	-	-	16,0 ± 0,50
0,25	10,0 ± 1,00	-	-	-	15,5 ± 0,00
0,125	11,0 ± 0,50	-	-	-	12,0 ± 0,50
0,0625	12,5 ± 1,50	-	-	-	12,5 ± 1,00
0,03125	-	-	-	-	-
0,015625	-	-	-	-	-
0,0078125	-	-	-	-	-
0,00390625	-	-	-	-	-
Controles					
Amicacina 1,2 mg/mL	23	27	29	28,5	nt
Cetoconazol 2 mg/mL	nt	nt	nt	nt	31
DMSO 4%	-	-	-	-	-

(-) Não inibição do crescimento microbiano

nt – Não testado

Controles positivos: Amicacina e Cetoconazol

Controle negativo: DMSO 4%.

Volume de alfa-bisabolol aplicado em cada poço = 25 µL

O halo de inibição de crescimento é representado em milímetros, incluindo os 6 mm de diâmetro do poço, e foram as medidas foram realizadas após 18h de incubação.

*Os valores representam média de dois ensaios independentes realizados em duplícata.

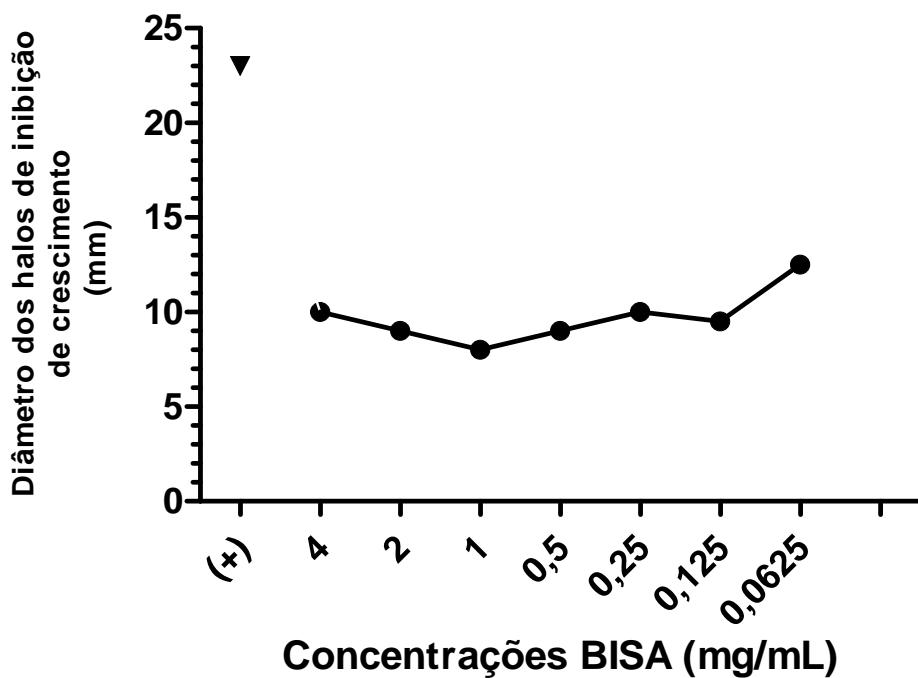


Figura 17: Potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol sobre a cepa bacteriana *S. aureus* ATCC 6538 determinado pela técnica de difusão em ágar (CLSI, 2003).

Os valores representam a média \pm EPM de dois ensaios independentes realizados em duplicata. O halo de inibição de crescimento é representado em milímetros, incluindo os 6 milímetros de diâmetro do poço, após 18h de incubação (+) controle positivo: amicacina 1,2 mg/mL.

5.4.2. Potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas bacterianas multirresistentes de origem hospitalar isoladas de espécimes clínicos

O potencial antimicrobiano do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas de bactérias de origem hospitalar, isoladas de espécimes clínicos e com padrão de multirresistência a antibióticos, foi avaliado pela inibição do crescimento microbiano através o método de difusão em ágar (CLSI, 2003). Foram testadas duas cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* 1 e *S. aureus* 2), duas cepas de *Acinetobacter* (*A. lwoffii* e *A. baumannii*), uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* e uma cepa de *Escherichia coli* (Tabela 08).

Tabela 08 – Padrão de multirresistência a antibióticos de cepas de bactérias de origem hospitalar, isoladas de espécimes clínicos.

Microrganismo	Origem da amostra	Antibióticos
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Líquido cefalorraquidiano (LCR)	AMI, ATM, CPM, CAZ, GEN, POL, TAC, TOB.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aspirado traqueal	AMI, ATM, CPM, CAZ, GEN, IPM, MPM, CIP, LEV, GAT, PIT
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	Urina	CLI, ERI, LNZ, NIT, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	Secreção cística	CLI, ERI, LNZ, NIT, NOR, PEN, SUT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aspirado traqueal	AMI, AMP, CFL, CFZ, CPM, CFO, CRO, CRX, CIP, NIT, NOR, PIT, TAC, SUT
<i>Escherichia coli</i>	Urina	AMP, CIP, GEN, NIT, NOR, TAC, SUT

AMI: amicacina; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; CFZ: cefazolina; CIP: ciprofloxacino; CLI: clindamicina CPM: cefepime; CRO: ceftriaxona; CRX: cefuroxima sódica; ERI: eritromicina; GAT: gatifloxacino; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; LEV: levofloxacina; LNZ: linezolid; MPM: meropenem; NIT: nitrofurantoína; NOR: norfloxacino; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; PIT: piperacilina; SUT: sulfametoxazol/Trimetoprim; TAC: ticarcilina; TOB: tobramicina.

O extrato seco das flores de camomila, até na concentração de 5 mg/mL não foi capaz de inibir o crescimento das cepas de bactérias resistentes testadas, enquanto o BISA foi capaz de inibir o crescimento das cepas *K. pneumoniae* e *A. balmanii*, quando na concentração de 4 mg/mL (**Tabela 09**).

Tabela 09 – Potencial antimicrobiano do alfa-bisabolol sobre cepas de bactérias de origem hospitalar, isoladas de espécimes clínicos e com padrão de multirresistência, determinado pela técnica de difusão em ágar (CLSI, 2003).

BISA (mg/mL)	Cepas Microbianas					
	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. balmanii</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> (1)	<i>S. aureus</i> (2)	<i>K. pneumoniae</i>
	Diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm)*					
4	-	7	-	-	-	7
2	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-
0,125	-	-	-	-	-	-
0,0625	-	-	-	-	-	-
Controles						
Ciprofloxacino 0,2 mg/mL	32	nt	nt	nt	nt	nt
PolimixinaB 1200 UI/MI	nt	12	nt	nt	nt	nt
Amicacina 1,2 mg/mL	nt	nt	20	nt	nt	nt
Vancomicina 1,2 mg/mL	nt	nt	nt	24	29	nt
Meropenem 0,4 mg/mL	nt	nt	nt	nt	nt	24
DMSO 4%	-	-	-	-	-	-

(-) Não inibição do crescimento microbiano

nt – Não testado

Controle negativo: DMSO 4%.

Volume de alfa-bisabolol aplicado em cada poço = 25 µL

O halo de inibição de crescimento é representado em milímetros, incluindo os 6 mm de diâmetro do poço, e foram as medidas foram realizadas após 18h de incubação.

*Os valores representam média de dois ensaios independentes realizados em duplicata.

5.4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias da *American Type Culture Collection* (ATCC) e sobre cepas bacterianas multirresistentes de origem hospitalar isoladas de espécimes clínicos.

Os valores para as CIM e CLM foram determinados pelo método da microdiluição em caldo de cultura (CLSI, 2003) e do plaqueamento em meio sólido (BARON *et al.*, 1994), respectivamente. O extrato seco de flores de camomila não apresentou nenhuma atividade sobre as cepas microbianas testadas até a concentração de 1mg/mL. A CIM de alfa-bisabolol para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 6538 foi de 1 mg/mL. Para todas as outras cepas microbianas testadas, a mais alta concentração de alfa-bisabolol utilizada (1mg/mL) não foi capaz de inibir o crescimento (**Tabela 10** e **Figura 18**).

Tabela 10- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cepas bacterianas multirresistentes de origem hospitalar, determinado pela técnica da microdiluição em caldo de cultura (CLSI, 2003) e de plaqueamento em meio sólido (BARON *et al.*, 1994).

Cepas Microbianas	CIM*	CLM**
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Salmonella cholerasuis</i> ATCC 10708	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Acinetobacter lwoffi</i>	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Acinetobacter baumannii</i>	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Staphylococcus .aureus</i> tipo 1	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> tipo 2	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL

*Menor concentração de BISA capaz de inibir visivelmente o crescimento.

** Menor concentração de BISA que determinou um crescimento microbiano na superfície do ágar $\leq 0,1\%$ de inoculo adicionado

Controle negativo: DMSO 4%

Volume de alfa-bisabolol aplicado em cada poço: 25 μ L

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima foi feita a inspeção visual da microplaca, observando se houve ou não crescimento microbiano. A leitura dos valores da absorbância em espectrofotômetro a 490 nm foi feita para determinar a cinética da inibição do crescimento microbiano. A mais baixa concentração que não apresentou turvação visível é a CIM da amostra testada. Na Figura 19 é possível observar a CIM do alfa-bisabolol para a concentração inicial de 1 mg/mL, sendo estatisticamente significativo em relação ao controle positivo (amicacina 1,2 mg/mL). A partir das diluições seguintes não houve inibição do crescimento bacteriano.

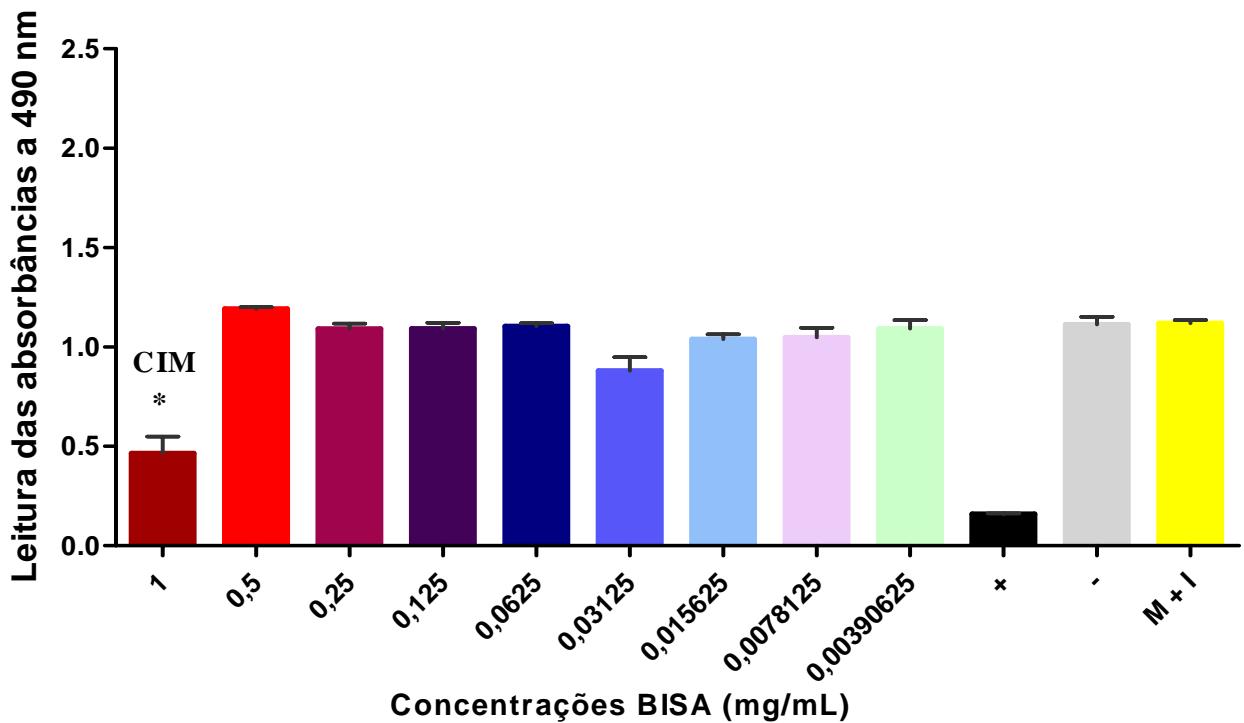


Figura 18: Cinética da inibição do crescimento microbiano da espécie Gram-positiva *S. aureus* ATCC 6538, determinado pela ação do alfa-bisabolol.

Os valores apresentados são as médias dos dois experimentos, realizados em triplicata. ANOVA, teste Tukey, com $p < 0,05$ vs controle positivo. (+): Controle positivo: Amicacina 1,2 mg/mL; (-): Controle negativo: DMSO 4%. Após incubação a 35°C, por 24 horas, foram realizadas as leituras de Absorbância a 490nm, em leitora de ELISA (Bio-Tek).

DISCUSSÃO

Os produtos naturais tem sido a principal fonte da diversidade química na descoberta de novos fármacos a partir do século passado. Estes e seus derivados sintéticos tem se mostrado bem sucedidos no tratamento de doenças em humanos na maioria das áreas. Os produtos naturais possuem um potencial enorme ainda a serem explorados, mostrando as vantagens e desvantagens de moléculas derivadas de produtos naturais como futuros fármacos a serem desenvolvidos (ASOLINI *et al.*, 2006).

Entre as várias espécies relatadas pelo seu uso na medicina popular, a *Matricaria recutita* é uma das mais utilizadas. Os constituintes mais importantes desta planta são os sesquiterpenos e os flavonóides, ambos relacionados às atividades farmacológicas relatadas à camomila. A camomila apresenta uma boa quantidade do flavonóide apigenina (0,84%), fazendo assim que esta substância seja um dos marcadores na padronização da qualidade do extrato da planta (QUEIROZ, 2008). O extrato de camomila utilizado no nosso trabalho foi padronizado empregando como marcador a apigenina, apresentando 5,2% de apigenina glicosilada. De acordo com Queiroz (2008), a proporção de apigenina-7-glicosídeo presente no extrato das flores de camomila deve estar na faixa de 3 a 9%, o que mostra que o extrato estudado no presente trabalho está dentro da concentração ideal do padrão.

O extrato aquoso da camomila tem sido utilizado para a cura de várias doenças, como insônia, ansiedade, distúrbios gastrintestinais, úlceras, entre outros (SRIVASTAVA; GUPTA, 2007). Mais de 100 metabólitos foram mencionados como componentes da planta e estudos farmacológicos mostram que o bisabolol, sesquiterpeno presente na sua composição, reduz inflamações, previne o desenvolvimento de úlceras gástricas e tem propriedades antibacterianas e antifúngicas (HERNÁNDEZ-CERUELOS *et al.*, 2002; SRIVASTAVA; GUPTA, 2007). A alta concentração de alfa-bisabolol presente no óleo de camomila parece estar relacionada com suas atividades farmacológicas, apresentando atividade antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória e anti-úlcera (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2008).

A alta concentração de alfa-bisabolol no óleo de camomila parece estar relacionada com as atividades farmacológicas relatadas ao óleo, apresentando atividade antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória e anti-úlcera (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2008).

Tendo em vista as ações farmacológicas atribuídas à camomila e ao alfa-bisabolol, assim como as atividades biológicas dos terpenos, este trabalho teve como objetivo avaliar algumas atividades, uma delas a atividade gastroprotetora e avaliar os possíveis mecanismos envolvidos, através de modelos experimentais clássicos de úlceras induzidas por etanol.

Uma das principais causas de formação de úlceras é o uso de etanol. É uma substância necrosante que causa danos na mucosa gástrica e sua ingestão excessiva pode resultar em gastrite, caracterizada por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias. O etanol absoluto rapidamente promove a formação de lesões hemorrágicas na mucosa gástrica, causada devido a uma reação inflamatória aguda que provoca um aumento na permeabilidade vascular (de OLINDA, 2008).

É relatado que o etanol em contato direto com a mucosa gástrica solubiliza o muco protetor, deixando assim, a mucosa indefesa à ação hidrolítica e proteolítica do ácido clorídrico e da pepsina, respectivamente. Esta substância pode induzir ainda um aumento da secreção do ácido gástrico e através do contato direto, alterar a rede de vascularização local e romper vasos sanguíneos que irrigam a mucosa gástrica, desencadeando processos necrotizantes no tecido. Deste modo, a hipersecreção gástrica juntamente com a fragilidade da rede vascular e a dissolução da camada muco-protetora gástrica constitui os principais fatores envolvidos na instalação da úlcera gástrica induzida por etanol (PAZZINI, 2007).

A formação de lesões na mucosa gástrica por agentes necrosantes como o ácido clorídrico e etanol envolvem vários mecanismos, que reduzem o fluxo sanguíneo da mucosa, o que contribui para hemorragia, necrose e a solubilização dos componentes do muco no estômago. Estas ações resultam no aumento de fluxo de Na^+ e K^+ , da secreção de pepsina e a diminuição de íons H^+ e histamina no lúmen (BATISTA *et al.*, 2004).

A habilidade da mucosa gástrica em resistir às injúrias pelas secreções endógenas (ácido, pepsina e bile) e pela ingestão de substâncias irritantes pode ser atribuída a vários fatores que promovem a defesa da mucosa. A formação de lesões gástricas por agente necrosantes está relacionada com a depressão dos mecanismos de defesa da mucosa. Além disso, a administração de etanol reduz a produção de muco, fluxo

sanguíneo da mucosa, secreção de bicarbonato, níveis de prostaglandinas e de glutatona. É capaz ainda de aumentar os níveis de histamina, o fluxo de íons cálcio, a geração de radicais livres e a produção de leucotrienos (BARROS *et al.*, 2006).

Tendo em vista a importância da pesquisa por novos compostos no tratamento das úlceras gástricas, o presente trabalho avaliou o potencial terapêutico do alfa-bisabol e do extrato de camomila frente às lesões gástricas induzidas por etanol. A administração oral de alfa-bisabolol nas doses de 50 e 100 mg/Kg preveniu o aparecimento de lesões na mucosa gástrica, inibindo 87 e 96%, o percentual de área gástrica ulcerada, respectivamente, em comparação com o grupo controle. O extrato de camomila também demonstrou atividade inibitória em úlceras induzidas por etanol. Nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, administrados por via oral, houve inibição de 78, 68 e 89%, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Moura Rocha *et al.* (2009), onde o BISA nas doses de 100 e 200 mg/Kg, via oral, foi capaz de proteger a mucosa gástrica de danos causados pelo etanol. Kloppel *et al* (2007) demonstraram um efeito gastroprotetor contra lesões gástricas induzidas por etanol do sesquiterpeno nerolidol administrado via oral nas doses 25, 50 e 250 mg/Kg, presente no óleo essencial de *Baccharis dracunculifoli*. Piezzi *et al.* (1995) demonstraram que estômagos de ratos pré-tratados com DHL (dehidroleucodina), um sesquiterpeno presente na espécie *Artemisia douglasiana* Besser, determinam a redução de lesões gástricas induzidas por etanol. Khayyal *et al.* (2001), ao estudarem o potencial antiulcerogênico do extrato etanólico da *Matricaria recutita* verificaram uma atividade antiulcerogênica dose-dependente associada à diminuição de secreção ácida e aumento da secreção de mucina, bem como aumento da liberação de prostaglandina E₂ e diminuição da liberação de leucotrienos. A atividade antiulcerogênica também foi confirmada histologicamente. Os autores sugerem que o efeito citoprotetor pode estar relacionado ao teor de flavonóides e seus efeitos antioxidantes.

Algumas substâncias originadas de plantas demonstram bons resultados na atenuação de lesões induzidas por etanol e estresse oxidativo através da ativação do óxido nítrico, das vias das prostaglandinas e aumento da microcirculação (LEITE, 2009).

A descoberta do óxido nítrico (ON) como um agente de sinalização celular foi um dos mais importantes acontecimentos na fisiologia humana dos anos 80-90. O ON é um gás de radical livre e não carregado que tem chamado a atenção pela sua participação na sinalização de inúmeros processos fisiológicos tais como: relaxamento do músculo liso e vasodilatação, neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação dos mecanismos pró e anti-apoptóticos, controle da pressão arterial e fluxo sanguíneo regional (RADOMSKI; MONCADA, 1993; KIM *et al.*, 2001). Além disso, a produção excessiva ou ação inadequada de ON pode estar envolvida em vários processos patológicos como doenças inflamatórias, câncer e doenças neurodegenerativas (RANG *et al.*, 2004).

No estômago o ON possui um importante papel na preservação e reparo de injúrias no trato gastrintestinal, participando no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato, na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrintestinal, além de atuar como agente citoprotetor, antiinflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas (WALLACE; GRANGER, 1996; MUSCARA; WALLACE, 1999). Estudos mostram que a presença de ON em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto que, em altas concentrações, pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, sendo estes compostos tóxicos para várias linhagens celulares (WALLACE; MILLER, 2000).

Em nosso trabalho, o envolvimento do óxido nítrico no efeito gastroprotetor do bisabolol no modelo de lesão de úlcera gástrica induzida por etanol foi avaliado utilizando o bloqueador L-NAME. Nossos resultados demonstraram que o óxido nítrico parece estar envolvido no mecanismo de gastroproteção do bisabolol, uma vez que ocorreu um aumento da percentagem de área ulcerada em comparação com o grupo tratado com bisabolol. Alguns autores mostraram que drogas que aumentam a liberação de ON constitutivo protegem a mucosa gástrica contra os AINES, além de aumentar a cicatrização da úlcera induzida por esses fármacos (CALATAYUD *et al.*, 1999; ELLIOTT *et al.*, 1995).

As prostaglandinas, no estômago, possuem um papel fundamental, em que estimulam a secreção de bicarbonato e muco, mantém o fluxo de sanguíneo da mucosa e regulam o reparo das suas células. A supressão da síntese de prostaglandinas através dos AINES, como a indometacina, resulta no aumento da suscetibilidade de injúrias na mucosa

e ulcerações gastroduodenais. A exposição a agentes irritantes aumentam a produção de prostaglandinas da mucosa gástrica como consequência da redução do pH do lúmen gástrico, provavelmente pela estimulação da secreção ácida (BATISTA *et al.*, 2004). A expressão da COX-2 tem um papel importante na cicatrização da úlcera gástrica e que derivados da PG a partir da COX-2 podem estar envolvidos na citoproteção adaptativa induzida por agentes irritantes moderados, quando uma grande área da mucosa é lesada (PAZZINI, 2007).

A fim de se verificar o envolvimento das prostaglandinas no mecanismo de gastroproteção causado pelo bisabolol, foi utilizada a indometacina, um inibidor não seletivo da cicloxigenase. Os resultados mostraram que o efeito gastroprotetor do bisabolol é vulnerável a indometacina, sugerindo um envolvimento das prostaglandinas na gastroproteção.

O óxido nítrico pode atuar complementando o efeito gastroprotetor promovido pelas prostaglandinas (SAKAI *et al.*, 1995; WALLACE; GRANGER, 1996; MUSCARA; WALLACE, 1999). Sabe-se também que o ON é capaz de aumentar a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (RANG *et al.*, 2004). Estudos mostram que existe uma modulação cooperativa na defesa da mucosa gastrintestinal promovida pelas PG's e o ON (WALLACE, 1996).

Ainda em relação aos possíveis mecanismos envolvidos na gastroproteção causada pelo bisabolol, foi avaliada a via de ativação dos canais de potássio dependentes de ATP. Para determinar a ativação destes canais na gastroproteção obtida pelo bisabolol, utilizamos a glibenclamida. Ela é um hipoglicemiante oral que estimula a secreção de insulina nas células beta pancreáticas através da inibição dos canais K^{+}_{ATP} (DUNNE; PETERSEN, 1991). A glibenclamida é capaz de aumentar as lesões gástricas, que pode ser explicado pela diminuição do fluxo sanguíneo gástrico (TOROUDI *et al.*, 1999).

Os canais K^{+}_{ATP} pertencem a uma grande família de proteínas de membrana. Estes canais regulados por ligantes são definidos tendo por base a sua sensibilidade ao ATP intracelular, que inibe sua atividade. Foram descobertos inicialmente no coração (NOMA, 1983) e posteriormente em outros tecidos como o pâncreas (ASHCROFT *et al.*, 1984), músculo esquelético (SPRUCE *et al.*, 1985), músculo liso (STANDEN *et al.*, 1989),

rim (HUNTER; GIEBSCH, 1988) e cérebro (ASHFORD *et al.*, 1988). O papel fisiológico dos canais K^{+}_{ATP} tem sido mais bem caracterizado nas células -pancreáticas. Nestas células, o aumento na concentração de ATP e do metabolismo da glicose fecha os canais K^{+}_{ATP} (COOK *et al.*, 1988). No sistema vascular, esses canais estão implicados no relaxamento do músculo liso vascular, possuindo um papel importante no controle da pressão sanguínea (NELSON; QUAYLE, 1995). Essa vasodilatação pode ser bloqueada pela glibenclamida, uma sulfonilréia que causa bloqueio dos canais K^{+}_{ATP} (BEECH *et al.*, 1993). Tem sido postulado que esses canais estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas do estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade do estômago (TOROUDI *et al.*, 1999).

Nos experimentos para avaliar a participação dos canais de K^{+}_{ATP} no efeito de gastroproteção do bisabolol em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos, o bisabolol (100 mg/Kg, v.o.) conseguiu reduzir o percentual de área ulcerada em comparação com o grupo controle. A glibenclamida conseguiu reverter o efeito gastroprotetor, sugerindo a hipótese da participação dos canais K^{+}_{ATP} no efeito do bisabolol.

A partir de todos os dados obtidos no presente estudo, podemos sugerir que o efeito gastroprotetor do bisabolol possui a participação do óxido nítrico e das prostaglandinas, podendo estar acoplada a um sistema de abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, com consequente relaxamento endotelial na vasculatura gástrica e aumento de fluxo sanguíneo da região afetada, impedindo assim, a formação das úlceras. Entretanto, no estudo de Moura Rocha *et al.*, (2009), a administração de glibenclamida (10 mg/Kg, i.p.), L-NAME (10 mg/Kg, i.p.) e indometacina (10 mg/Kg, i.p.) não foi capaz de reverter a gastroproteção promovida pelo bisabolol (200 mg/Kg, via oral).

De acordo com Lih-Brody *et al* (1996), o processo ulcerogênico está relacionado ao estresse oxidativo, que é considerado um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa do organismo (moléculas antioxidantes naturais como a glutatona), em relação ao número de substâncias oxidantes produzidas pelo agente indutor de lesão ou ainda por alterações bioquímicas do próprio organismo. Os antioxidantes, derivados dos compostos fenólicos, funcionam como seqüestradores de radicais livres e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão relacionadas à formação de lesões gástricas causadas por diferentes agentes, como: álcool, estresse, infecção por *H. pylori* e uso de DAIN (KWIĘCIEN *et al.*, 2002). Ito *et al* (1998) relataram que dentre os radicais livres envolvidos na patogênese da úlcera gástrica destacam-se os derivados do oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-).

A avaliação da atividade antioxidante do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol foi realizada *in vitro*, através da reação destes com o DPPH, um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta na mistura etanol/metanol (1:1). Na presença de substâncias antioxidantes, o DPPH é reduzido produzindo uma solução incolor (KITZBERGER *et al.*, 2007). O resultado da atividade antioxidante das amostras testadas em diferentes concentrações (% de inibição) em comparação com o alfa-tocoferol (vitamina E).

Nas concentrações testadas (10, 50 e 100 μ g/mL) o alfa-bisabolol não apresentou atividade antioxidante. De maneira semelhante foi testado o extrato seco das flores de camomila (10, 50 e 100 μ g/mL), onde se observou também que o mesmo não possui essa atividade. Um resultado semelhante foi encontrado por Moraes-de-Souza (2007), que avaliou a atividade antioxidante de infusões de 10 ervas selecionadas a partir da existência de compostos fenólicos. A camomila apresentou uma baixa quantidade de compostos fenólicos e através do teste do DPPH foi verificada uma baixa atividade antioxidante do extrato. A atividade antioxidante das espécies vegetais está normalmente relacionada à presença de compostos com estas características, sendo mais comuns os flavonóides. Vicentino & Menezes (2007) testaram a tintura-mãe da *Matricaria chamomilla* L. e encontraram que ela possui atividade antioxidante através do DPPH. Esta diferença pode estar relacionada pela obtenção deste produto, diferenciando tintura de extrato, o que pode mostrar concentrações diferentes das substâncias ativas, incluindo os flavonóides. Entretanto, Braga *et al.* (2009) avaliaram a atividade antioxidante do bisabolol (concentrações de 0,83 a 31 μ g/mL) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através do ensaio de LACL, onde os autores sugerem a possibilidade de uso do bisabolol como uma ferramenta antioxidante no tratamento do estresse oxidativo.

Com o intuito de investigar a possível citotoxicidade do alfa-bisabolol e do extrato seco da camomila, foi pesquisado seus efeitos sobre a permeabilidade da membrana celular, pela atividade da LDH (lactato desidrogenase), uma enzima que é indicativa de lesão celular e consequentemente, citotoxicidade. O uso de um tensoativo com elevada toxicidade, como o Triton X-100, leva ao rompimento da membrana celular e consequente liberação de LDH. O ESFC se mostrou citotóxico nas concentrações 100 e 50 µg/mL. Já o bisabolol quando testado nas mesmas concentrações mostrou citotoxicidade em todas as concentrações (100, 50 e 10 µg/mL), menos na concentração de 5 µg/mL.

Na literatura foi encontrado que o bisabolol não mostra sinais de toxicidade através da administração oral até a dose de 5g/kg (BHATIA *et al.*, 2008). Estudos de toxicidade com a camomila também mostram a sua segurança, onde a toxicidade aguda via oral e tópica é maior que 5g/kg. O FDA classifica tanto o óleo essencial quanto o extrato de camomila como substâncias seguras. As duas amostras demonstraram toxicidade *in vitro* em neutrófilos humano, mas é sabido que em alguns protocolos *in vivo* tanto a camomila quanto o bisabolol são seguros (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2008).

O uso de extratos de plantas e de produtos fitoquímicos, ambos com propriedades antimicrobianas conhecidas, podem ser de grande significado na terapia das doenças infecciosas. Muitas plantas têm sido usadas popularmente por possuírem atividade antimicrobiana associada aos seus compostos secundários, que em sua composição possuem substâncias ativas, como é o caso dos terpenos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

No presente estudo, foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato seco das flores de camomila e do alfa-bisabolol sobre cepas microbianas originárias de ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella choleraesuis* spp. *choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Candida albicans* ATCC 10231 e cepas bacterianas de origem hospitalar, isoladas de espécimes clínicos e com perfil de multirresistência a diferentes antibióticos (*Staphylococcus aureus* 1, *Staphylococcus aureus* 2, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwofii* e *Klebsiella pneumoniae*). Foi constatada a atividade antimicrobiana do alfa-bisabolol sobre a espécie Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, as espécies Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*

e a levedura *Candida albicans* ATCC 1023, quando testadas pelo método de difusão em ágar.

Entre todas as cepas testadas, apenas para a espécie Gram-positiva *S. aureus* ATCC 6538 foi possível determinar a CIM do alfa-bisabolol. As espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Candida albicans* ATCC 10231 não obtiveram inibição de crescimento visível no método da microdiluição, impossibilitando assim a determinação de suas CIMs. Esse fato pode demonstrar que as concentrações inibitórias mínimas para estas cepas são maiores que 1 mg/mL.

A avaliação da atividade antimicrobiana do alfa-bisabolol revelou que ele inibe o crescimento de fungos e leveduras, como também tem atividade fungicida contra *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (PAULI, 2003). Este mesmo trabalho relata que a atividade antimicrobiana do bisabolol parece estar relacionada como um possível inibidor seletivo da biossíntese do ergosterol, sendo usado como antifúngico em sua forma pura ou como componente principal no desenvolvimento de futuras drogas antifúngicas. Pauli (2006) fez uma avaliação dos dados obtidos a partir de substâncias que inibem o crescimento de *C. albicans*. Como resultado desta avaliação, foi identificado que todas as substâncias testadas possuem uma semelhança: uma subestrutura química em comum, o zimosterol, molécula capaz de interferir na biossíntese do ergosterol. O alfa-bisabolol é uma substância que possui uma estrutura química semelhante ao zimosterol, provavelmente responsável por sua atividade na inibição da *C. albicans*, o que pode servir como base para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

Oonmetta-aree *et al.* (2006) avaliaram o extrato seco de galangal (*Alpinia galanga* Linn.), uma espécie vegetal rica em compostos terpênicos e mostraram que este extrato possui atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, com CIM e CBM de 0,325 mg/ml e 1,3 mg/ml, respectivamente. Este mesmo extrato não mostrou atividade inibitória de crescimento para *Escherichia coli*. Esta ausência de inibição de crescimento para bactérias Gram-negativas pode ser explicada, de acordo com os autores, pela falta de penetração dos compostos através da membrana celular, composta por uma monocamada lipopolissacarídica, o que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos.

O extrato seco das flores de camomila, nas concentrações utilizadas (0,156 a 5 mg/mL) não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma das cepas bacterianas testadas, mas apresentou uma discreta atividade inibitória sobre o crescimento da levedura *C. albicans*, determinando um halo de inibição de crescimento de 9 milímetros de diâmetro, quando na maior concentração, 5mg/mL. Quando testado pelo método da microdiluição em caldo de cultura, o ESFC não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma das cepas microbianas estudadas, o que podemos concluir que sua concentração inibitória mínima é maior do que a concentração testada nesse trabalho.

Asolini *et al.*, (2006) avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos etanólico e aquoso das folhas de camomila (*Matricaria chamomilla*) sobre às cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* e encontraram que o extrato aquoso de camomila não apresentou nenhuma atividade inibitória sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, utilizadas no nosso trabalho. Já o extrato etanólico da camomila apresentou um halo de inibição de 2 mm contra *S. aureus* pelo método da difusão em disco.

No estudo conduzido por Brehm-Stecher & Johnson (2003), foi encontrado que em baixas concentrações (0,5 mM) o alfa-bisabolol modifica a permeabilidade da membrana do microrganismo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Eles sugerem que os sesquiterpenos nerolidol, farnesol, apritone e bisabolol podem romper a barreira das membranas celulares das bactérias, permitindo assim a entrada de soluções exógenas, como os antibióticos, por exemplo. Ao testarem esses sesquiterpenos nas concentrações 1 mM e 2 mM, pela técnica de difusão em ágar, constataram que eles promovem uma ação sinérgica do potencial antimicrobiano de alguns antibióticos (eritromicina, gentamicina e vancomicina), sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, sendo este fenômeno mais pronunciado em bactérias Gram-positivas, já que para a *Escherichia coli* não foi observada alguma alteração do potencial antimicrobiano dos antibióticos testados. O aumento da efetividade dos sesquiterpenos na penetração das membranas bacterianas pode estar relacionado com a semelhança das suas estruturas químicas com as membranas. Cornwell & Barry (1994) já haviam encontrado que o farnesol e o nerolidol são mais efetivos na penetração da membrana celular do que o bisabolol, propondo que longas cadeias carbônicas das moléculas possuem um papel importante na penetração das membranas bacterianas.

Os resultados sugerem que o extrato de camomila e o bisabolol possuem atividade gastroprotetora em úlceras induzidas por etanol, cujo mecanismo de ação do BISA parece estar relacionado com a ativação dos canais de K^{+}_{ATP} . As duas drogas não apresentaram atividade antioxidante satisfatória no método do DPPH e a avaliação das suas citotoxicidades mostra que o extrato seco das flores de camomila possui potencial citotóxico nas concentrações de 100 e 50 μ g/mL e enquanto que para o bisabolol somente na concentração de 5 μ g/mL não houve potencial citotóxico. O ESFC não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações usadas, mas o BISA mostra um potencial antimicrobiano principalmente frente a cepa de *S. aureus* ATCC 6538.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos levam as seguintes conclusões:

- ✓ Na avaliação preliminar dos efeitos tóxicos do ESFC e do alfa-bisabolol em células humanas (neutrófilos), estes mostraram um grau de citotoxicidade significante nas concentrações testadas. O ESFC mostrou citotoxicidade para as concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto que o alfa-bisabolol não apresentou citotoxicidade somente na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
- ✓ O ESFC, assim como o alfa-bisabolol, apresenta uma atividade gastroprotetora em lesões gástricas induzidas por etanol.
- ✓ É sugerido que o mecanismo de gastroproteção do alfa-bisabolol pode estar relacionado com a abertura dos canais de potássio dependentes de ATP;
- ✓ O ESFC e o bisabolol não apresentaram atividade antioxidante no método do DPPH;
- ✓ A atividade antimicrobiana do ESCF parece ser determinada pela presença do alfa-bisabolol em sua composição. O ESFC possui apenas uma discreta atividade antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231, enquanto o alfa-bisabolol é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e *C. albicans* originárias da ATCC e de bactérias hospitalares multirresistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. B. A. **Atividade antiulcerogenica e antiinflamatoria intestinal da *Arctium lappa*.** 2005. 167 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

Alternative Medicine Review., vol 13, number 1, 2008. Matricaria chamomilla (German chamomile). Monograph.

AMARAL, J. F. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg.** 2004. 152 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

ANDERSEN, F.; HEDEGAARD, K.; FULLERTON, A.; PETERSEN, T. K.; BINDSLEV-JENSEN, C.; ANDERSEN, K. E. The hairless guinea-pig as a model for treatment of acute irritation in humans. **Skin Research and Technology**, v. 12, n. 3, p. 183–189, Aug, 2006.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v. 69, p. 905–909, 2003.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.

ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. **Nature**; v. 312, p. 446-448, 1984.

ASHFORD, M.L.; STURGESSION, N.C.; TROUT, N.J.; GARDNER, N.J.; HALES, C.N. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurons. **Pflugers Arch.**; v. 412, p. 297-304, 1988.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DuBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 61, n. 3-4, p. 105-124, 2000.

BABENKO, N.A.; SHAKHOVA, E. G. Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 32–39, 2006.

BARON, E.J., PETERSON, L.R., FINEGOLD, S.M. **Diagnostic Microbiology**. 9.ed. Mosby, St. Louis: Bailey & Scott's, 1994.

BARROS, M. P., SOUSA, J. P. B., BASTOS, J. K., ANDRADE, S. F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 567-571, 2007.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa, Rio de Janeiro: Universidade Federal de Viçosa, p. 237-74, 1991.

BASTOS, G.M. **Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

BATISTA, L. M.; de ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; TOMA, W.; CALVO, T. M.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biological Pharmaceuticals Bulletin**, v. 37, p. 328-332, 2004.

BEECH, D.J.; ZHANG, H.; NAKAO, K.; BOLTON, T.B. Kchannel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**; v. 110, p. 573-582, 1993.

BHARGAVA, K.P.; GUPTA, M.B.; TANGRI, K. K.. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacina and oxyphenbutazone. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 191-195, 1973.

BHATIA, S. P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A.M. Fragrance material review on alpha-bisabolol. **Food Chem Toxicol**, v.46, n.11, p. 72-76, 2008.

BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**; v. 51, p. 29–38, 1996.

BRANDÃO, M. G. L.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES, C. D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, July/Sept, 1998.

BRASIL, Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2008. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2009b.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 47, p. 3357-3360, 2003.

BREITMAIER, E. Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis. **Terpenes**, v.1, p.19, 2006.

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**, v. 56, p. 33-55, 2005.

BULUT, R.; UNLUCERCI, Y.; BEKPINAR, S.; KUNTSAL, L. Nitric oxide-mediated regulation of gastric H⁺, K⁺ -ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanolinduced injury in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 7, p. 1417-1422, 1999.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products -The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 919-929, 2006.

CALATAYUD, S.; SANZ, M.J.; CANET, A.; BELLO, R.; DE ROJAS, F.D.; ESPLUGUES, J.V. Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1111-18, 1999.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v. 5, n. 3, July/ Sept, 2003.

CAMPOS, D. A. **Efeito gastroprotetor da 3,6-dimetoxi-6'', 6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-cromenoflavona isolada de *Lonchocarpus araripensis* Benthem em camundongos e possíveis mecanismos.** 2008. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CANDIDO, C.S. Estudo da atividade *in vitro* de componentes da dieta e de plantas medicinais do Nordeste brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. 2008.86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; SILVA, M. F. C.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S.; LIMA, R. M.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities prototype of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 62, p. 402-404, 1996.

CASTILLO-JUÁREZ, I.; GONZÁLEZ, V.; AGUILAR, H. J.; MARTÍNEZ, G.; LINARES, E., BYE, R.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 402–405, 2009.

CAVALIERI, E.; MARIOTTO, S.; FABRIZI, C.; DE PRATI, A. C.; GOTTARDO, R.; LEONE, S.; BERRA, L.V.; LAURO, G. M.; CIAMPA, A. R.; SUZUKI, H. Alpha-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, p. 589-594, 2004.

HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; MADRIGAL-BUJAIDAR, E.; de LA CRUZ, C. Inhibitory effect of chamomile essencial oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. **Toxicology Letter**, v.135, p.103-110, 2002.

CLINICAL AND A LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents.** Approved Guideline: M7-A6, v.23, n° 2, CLSI, 2003.

COLLINS, J.; ALI-IBRAHIM, A.; SMOOT, D.T. Antibiotic Therapy for *Helicobacter pylori*. **Medicinal Clinics of North America**, v. 90, p. 1125–1140, 2006.

COOK, D. L.; SATIN, L. S.; ASHFORD, M. L.; HALES, C. N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. **Sparechannelhypothesis Diabetes**; v. 37, p. 495-498, 1988.

CORNWELL, P. A.; BARRY, B.W. Determination of the mode of action of sesquiterpene skin penetration enhancers. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 43, p. 56, 1994.

DARRA, E.; ABDEL-AZEIM, S., MANARA, A., SHOJI, K., MARECHAL, J. D., MARIOTTO, S.; CAVALIERI, E.; PERBELLINI, L.; PIZZA, C.; PERAHIA, D.; CRIMI, M.; SUZUKI, H. Insight into the apoptosis-inducing action of alpha-bisabolol towards malignant tumor cells: involvement of lipid rafts and bid. **Biochemical and Biophysics**, v. 476, p.113-123, 2008.

DAVENPORT, H.W. Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**; v. 126, p. 657-662, 1967.

DAVENPORT, H.W. Gastric mucosal hemorrhage in dogs. Effects of acid, aspirin, and alcohol. **Gastroenterology**; v. 56, p. 439-449, 1969.

DUARTE, M. R.; LIMA, M. P. Análise Farmacopéica de amostras de camomila -*Matricaria Recutita* L., Asteraceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 89-92, 2003.

DUNNE, M.J.; PETERSEN, O.H. Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1071, p. 67, 1991.

ELVIN-LEWIS, M. J. Should we be concerned about herbal remedies? **Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141–164, 2001.

ELLIOTT, S.N.; MCKNIGHT, W.; CIRINO, G. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**; v. 109, p. 524- 530, 1995.

EVANS, C.W. **Pharmacognosy**. 14th ed. UK: WB Saunders Company Limited, 1996.

FALCÃO, H. S., MARIATH, I. R., DINIZ, M. F.; BATISTA, L. M., BARBOSA-FILHO, J. M. Plants of the American continent with antiulcer activity. **Phytomedicine**, v. 15, p. 132–146, 2008.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. RJ: Guanabara Koogan, 2000. p. 158-60.

GANZERA, M.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. **Life Science**, v. 78, p. 856-861, 2006.

GOMES CARNEIRO, M. R.; DIAS, D. M.; DE OLIVEIRA, A.C.; PAUMGARTTEN, F. J. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of alpha-bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. **Mutat. Research**, v.585, p. 105-112, 2005.

GULLO, V. P., MCALPINE, J., BAKER, L. D., PETERSON, F. Drug discovery from natural products. **Journal of Industry and Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 523-531, 2006.

HUNTER, M. GIEBISCH, G. Calcium-activated K-channels of *Amphiuma* early distal tubule: inhibition by ATP. **Pflugers Arch.**; v. 412, n. 3, p. 331-333, 1988.

JAKOVLEV, V.; VON SCHLICHTERGROLL, A. On the inflammation inhibitory effect of (-)-alpha-bisabolol, an essential component of chamomilla oil. **Arzneimittelforschung**, v. 19, n. 4, p. 615-616, 1969.

JUNQUEIRA JUNIOR, J. Efeito gastroprotetor da amifostina (ethyol®) na lesão gástrica induzida por etanol em ratos: papel dos grupos sulfidrilicos não-protéicos e neurônios sensoriais aferentes. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

KAMODA, O.; ANZAI, K.; MIZOGUCHI, J.; SHIOJIRI, M.; YANAGI, T.; NISHINO, T.; KAMIYA, S. In vitro activity of a novel antimicrobial agent, TG44, for treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3062-3069, 2006.

KATO, A.; MINOSHIMA, Y.; YAMAMOTO, J.; ADACHI, I.; WATSON, A.A.; NASH, R. J. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. **J Agric Food Chem.**, v. 56, n. 17, p. 8206-8211, 2008.

KHAYYAL, T.; EL-GHAZALY, M. A.; KENAWY, S.A.; SEIF-EL-NASR, M.; MAHRAN, L.G.; KAFAFI, Y.A.; OKPANYI, S.N. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinal acting plant extracts and their combination. **Arzneimittelforschung**, v. 51, p. 545-553, 2001.

KIM, P. K. M.; ZAMORA, R.; PETROSKO, P.; BILLIAR, T. R. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **International Immunopharmacology**; v. 1, p. 1421-1441, 2001.

KITZBERGER, C. S. G.; SMANIA JUNIOR, A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinulaedodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80 p. 631–638, 2007.

KLOPELL, F.C.; LEMOS, M.; SOUSA, J.P.; COMUNELLO, E.; MAISTRO, E.L.; BASTOS, J.K.; de ANDRADE, S.F. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Z Naturforsch**, v. 62, p.537-542, 2007.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Jr. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 2001.

KOVÁČIK, J., KLEJDUS, B., BAČKOR, M. Nitric oxide signals ROS scavenger-mediated enhancement of PAL activity in 3 nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* roots: side effects of scavengers. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 1686-1693, 2009.

KUBO, M.; MATSUDA, H.; TOMOHIRO, N.; YOSHIKAWA, M. Studies on *Alismatis rhizoma*. I. Anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from *Alismatis rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). **BioPharm Bulletin**, v. 20, p. 511-516, 1997.

KUHN, M. A.; WINSTON, D. **Herbal therapy & supplements – a scientific and traditional approach**. Philadelphia: Lippincott, p. 89-92, 2000.

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

LAPA, A.J.; LIMA, T.C.M. Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento/Rede Iberoamericana de Validação de Plantas Medicinais, 1997.

LEE, C. Therapeutic challenges in the era of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 197- 199, 2008.

LEITE, A. **Ação gastroprotetora do óleo essencial de Citrus lemon (Rutaceae), de seus componentes principais limoneno e beta-pineno e do óleo essencial**

da casca de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae). 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Institutp de Biociências de Botucatu. 2009.

LIH-BRODY, L.; POWELL, S. R.; COLLIER, K. P.; REDDY, G. M.; CERCHIA, R.; KAHN, E.; WEISSMAN. G. S.; KATZ, S.; FLOYD, R. A.; McKINLEY, M. J.; FISHER, S. E.; MULLIN, G. E. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defences in mucosa of inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, v.41, p.2078-2086, 1996.

LIVERMORE, D. M. Introduction: the challenge of multiresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 3,p. 1-7, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, p. 148-9, 2002.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 2015–2020, 1984.

MACGOWAN, P.A. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. **Jornal of antimicrobial chemoterapy**, v.62, p.105-114, 2008.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio da quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v.46, p.13-18,1998.

MASCOLO, N.; IZZO, A.; AUTORE, G.; MAIELLO, F.; DI CARLO, G.; CAPASSO F. Acetic acid-induced colitis in normal and essential fatty acid deficient rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 272, p. 469-475, 1995.

MASUDA, E.; KAWANOP, S.; NAGAN, K.; TSUJI, S.; TAKEI, Y.; TSUJI, M.; OSHITA, M.; MICHIDA, T.; KOBAYASHI, L.; NAKAMA, A.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Gastroenterology**, v.108, p. 58-64, 1995.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3 ed. Fortaleza, 2007.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotection of escins Ia, Ib, IIa, and IIb on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Eur J Pharmacol**, v.373, p. 63-70, 1999.

MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. **Trends in Biotechnology**, v.16, p. 349-355, 1998.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita L.*). **Phytotherapy Research**, v.20, n. 7, p. 519-530, 2006.

MCCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*. II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p.1243-1247, 1999.

MEDEIROS, J-V.R. **Efeito gastroprotetor do sildenafil (VIAGRA®) na lesão gástrica induzida por álcool em ratos: papel do óxido nítrico, GMPc e dos canais de potássio sensíveis ao ATP.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MILLER, T.; WITTSTOCK, U.; LINDEQUIST, U.; TEUSCHER, E. Effects of some components of the essential oil of chamomile, *Chamomilla recutita*, on histamine release from rat mast cells. **Planta Medica**, v. 62, n.1, p. 60–61, 1996.

MORAES-DE-SOUZA, R. A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusão de ervas consumida no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Agroindústria, Nutrição e Alimentos. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo, 2007.

MOURA ROCHA, N.F.; VENÂNCIO, E.T.; MOURA, B.A.; GOMES SILVA, M.I.; AQUINO NETO, M.R.; VASCONCELOS RIOS, E.R.; de SOUSA, D.P.; MENDES VASCONCELOS, S.M.; de FRANÇA FONTELES, M.M.; de SOUSA, F.C. Gastroprotective of (-)-alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 2009.

MUSCARA, M. N.; WALLACE, J. L. Nitric oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. J. Physiol.**; v. 276, p. 1313-1316, 1999.

NARIMAN, F.; EFTEKHAR, Z.; HABIBI, T.; FALSAFI. Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants, **Helicobacter**, v. 9, p. 146–151, 2004.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2000; 31: 247-256.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**; v. 268, n. 4 (Parte 1), p. 799-822, 1995.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Plantas medicinais – guia para profissional de saúde**. São Paulo: Premier, p. 59-63, , 2002.

NOMA, A. ATP-regulate K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature**; v. 305, n. 5930, p. 147- 148, 1983.

O'HARA, T.; DUNNE, A; BUTLER, J.; DENAVE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. **Pharm. Sci. Technol. Today**, v.1, n. 5, 214-223, 1998.

de OLINDA, T. M.; LEMOS, T.L.; MACHADO, L.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Quebrachitol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide and K⁺ ATP channels. **Phytomedicine**, v.15, n. 5, p.327-333, 2008.

OONMETTA-AREE, J.; SUZUKI,T.; GASALUCK,P.; EUMKEB,G. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. **LWT**, v. 39, p.1214–1220, 2006.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCOLI, C. M.; TOBUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier. 2000.

PAZZINI, D. **Estudo da indução de úlcera gástrica crônica e aguda: avaliação da atividade anti-ulcerogênica e anti-oxidativa de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) - Universidade Do Sagrado Coração, Bauru, S.P, 2007.

PAULI, A. α -bisabolol from Chamomile- A specific ergosterol biosynthesis inhibitor? **The International Journal of Aromatherapy**, v. 16, p. 21-25, 2006.

PAULI, A. Natural principles for growth inhibition of microorganisms. **International Journal of Aromatherapy**, v. 3, n.2, p. 143-146, 2003.

PEREIRA, E. M.; MACHADO, T. B.; LEAL, I. C. R.; JESUS, D. M.; DAMASO, C. R. A.; PINTO, A.V. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals Clin Microbiol Antimicrobial**, v. 5, n. 5, p. 1-7, 2006.

PESEWU, G. A.; CUTLER, R. R.; HUMBER, D. P. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p. 102–111, 2008.

PHONGPAICHIT, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; WATTANAPIROMSAKUL, C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. **Mycoses**, v. 48, p. 333-338, 2005

PIEZI, R.; GUZMÁN, J.; GUARDIA, T.; PESTCHANKER, M.; GUERREIRO, E.; GIORDANO, O. Dehydroleucodine prevents ethanol-induced necrosis in the mouse duodenal mucosa. A histological study. **Biocell**, v. 19, p. 27-33, 1995.

QUEIROZ, M.B.R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de Matricaria recutital (L.) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico.** 2008.121f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília,2008.

RADOMSKI, M.W.; MONCADA, S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. **Thromb. Haemostat.**; v. 70, p. 36-41, 1993.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Elsevier Editora. Tradução da 5^a edição americana, 2004.

RAMOS, M. B. M.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A.; SIQUEIRA, J. M.; ZIMIANINI, M. G. Produção de capítulos florais da camomila em função de populações de plantas e da incorporação ao solo de cama-de-aviário. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.3, p. 566-572, 2004.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res.**, v. 35, p. 523-534, 2002.

ROTBLATT, M.; ZIMENT, I. Evidence-based herbal medicine. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2002. p. 119-23.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E.. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Ed.Premier, 1997.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 761-767, 1979.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005.

SAIRAM, K.; RAO, C. H. V.; BABU, M. D.; KUMAR, K. V.; AGRAWAL, V. K.; GOEL, R. K. Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Emblica officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p.1-9, 2002.

SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N. S.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p. 425-431, 1999.

SAKAI, H.; KUMANO, E.; IKARI, A.; TAKEGUCHI, N. Agastric housekeeping Cl channel activated via prostaglandin EP3 receptor-mediated Ca₂ nitric oxide/ cGMP pathway. **J. Biol. Chem.**; v. 270, p. 18781-18785, 1995.

SAMONINA, G. E.; KOPYLOVA, G. N.; LUKJANZEVA, G. V.; ZHUYKOVA, S. E.; SMIRNOVA, S. E.; GERMAN, S. V.; GUSEVA, A. A. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology**, v. 11, n. 1, p.1- 6, 2004.

SANTOS, F. A.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; ARAÚJO, R. P.; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; RAO, V. S. N. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpenoid oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p.579-584, 2004.

SARIC, M. M.; STANIC, G.; MALES, Z.; SARIC, S. Application of numerical methods to thin-layer chromatographic investigation of the main components of chamomile [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] essential oil. **Journal of Chromatography**, v.776, p. 335-360, 1997.

SCALIA, S.; GIUFFREDA, L.; PALLADO, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical**, v. 21, p. 549-558, 1999.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryls groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v.25, p. 192-205, 1968.

SHIVANANDA, B.; RAJU, S.S.; RAO, A.V.C. Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract. **Journal of Wound Care**, v. 16, p. 298 – 302, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^aed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Ver Nutri**, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SPRUCE, A. E.; STANDEN, N. B.; STANFIELD, P. R. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. **Nature**; v. 316, n. 6030, p. 736-738, 1985.

SRIVASTAVA, J.K.; GUPTA, S. Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p. 9470–9478, 2007.

SICA, R. S.; SPENCER, J. M. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the setting of Dermatologic Surgery. **Dermatology Surgery**, v.35, p. 420–424, 2009.

STANDEN, N.B.; QUAYULE, J.M.; DAVIES, N.W.; BRAYDEN, J.E.; HUANG, Y.; NELSON, M.T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺channels in arterial smooth muscle. **Science**, v. 14, p. 177-180, 1989.

SZÓKE, E.; MÁDAYA, E.; TYIHÁK, E.; KUZOVKINA, I. N.; LEMBERKOVICS, C. E. New terpenoids in cultivated and wild chamomile (in vivo and in vitro). **Journal of Chromatography**, v. 800, p. 231–238, 2004.

TADIC, V. M., DOBRIC, S., MARKOVIC, G. M., ĐORDEVIC, S. M., ARSIC, I. A., MENKOVI, N. R., STEVIC, T. Anti-inflammatory, Gastroprotective, Free-Radical-Scavenging, and Antimicrobial Activities of Hawthorn Berries Ethanol Extract. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p.7700–7709, 2008.

TALHOUK, R. S.; KARAM, C.; FOSTOK, S.; EL-JOUNI, W.; BARBOUR, E. K. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 1-10, 2007.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos**. 2^a ed, São Paulo: Atheneu, 1996.

TOGASHI, N.; INOUE, Y.; HAMASHIMA, H.; TAKANO, A. Effects of two terpene alcohols on the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *Staphylococcus aureus*. **Molecules** ,v. 13, p. 3069-3076, 2008.

TOROUDI, H.P.; RAHGOZAR, M.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGIRI, B. Potassium channel modulators and indometacin-induced gastric ulceration in rats. Scand. **J. Gastroenterology**; v. 34, n. 10, p. 962-966, 1999.

TORRADO, S.; TORRADO, S.; AGIS, A.; JIMENEZ, M. E.; CADORNIGA, R. Effect of dissolution profile and (-)-alpha-bisabolol on the gastrototoxicity of acetylsalicylic acid. **Pharmazie**. v. 50, n. 2, p. 141-3, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

TURNER, D.M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p.39–43, 1996.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, NF-24, 2006.

VARDAR-ÜNLÜ, G.; CANDAN, F.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; DONMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var.

pectinatus (Lamiaceae). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.57, p.63-67, 2003.

VICENTINO, R.R.A. & MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.3, p. 384-387, 2007.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, no. 3, 390-400, 2003.

VILLEGAS, L. F.; MARCALO, A.; MARTIN, J.; FERNANDEZ, I.D.; MALDONADO, H.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G.B. (+)-epi-Alpha-bisabolol is the wound-healing principle of *Peperomia galloides*: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1357-1359, 2001.

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

WALLACE, J.L.; MILLER, M.J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**; v. 119, p. 512-520, 2000.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1A, p. 19S-23S, 2001.

ZAITER, L.; BOUHEROUM A. M.; BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F.; LEON, F.; BROUARD, I.; QUINTANA, J.; ESTEVEZ, F.; BERMEJO, F. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Matricaria chamomilla* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35,p. 533-538, 2007.

ZAID, S. F. H., YAMADA, K., KADOWAKI, M., USMANGHANI, K., SUGIYAMA, T. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal aliments, against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, 121, p. 286–291, 2009.

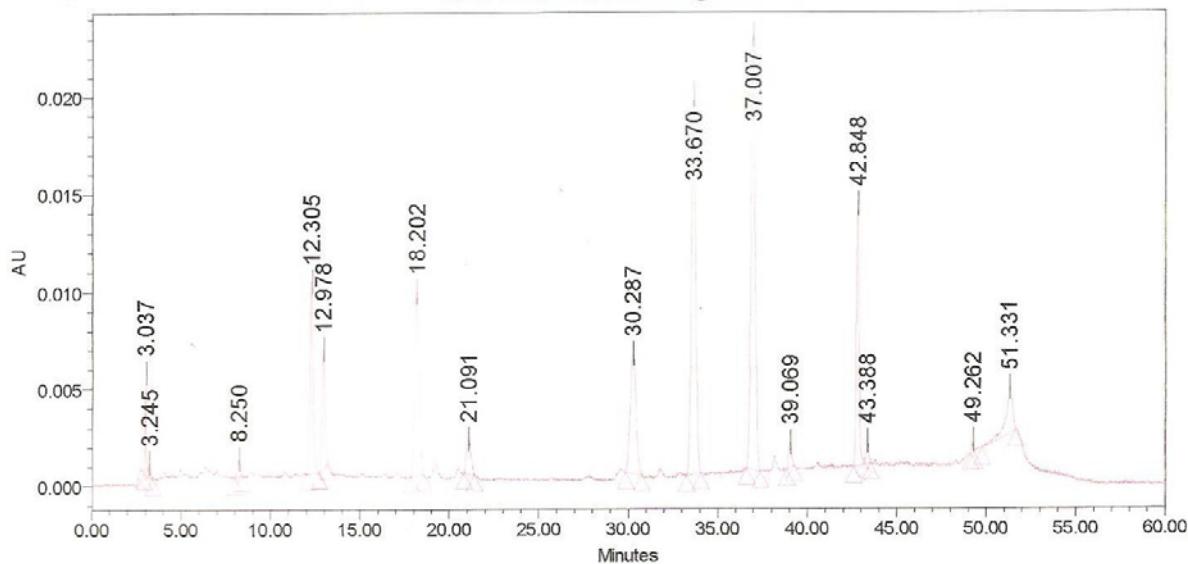
ANEXOS

ANEXO A – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato seco das flores de camomila.

S A M P L E I N F O R M A T I O N

Sample Name:	Extrato seco Camomila 3	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	10/16/2008 11:47:07 PM
Vial:	10	Acq. Method Set:	GRAD2 30_09_08
Injection #:	1	Date Processed:	10/17/2008 8:45:53 AM
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	gotas AC
Run Time:	60.0 Minutes	Channel Name:	340nm
Sample Set Name:	Teor de Apigenina 16_10_08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 340.0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



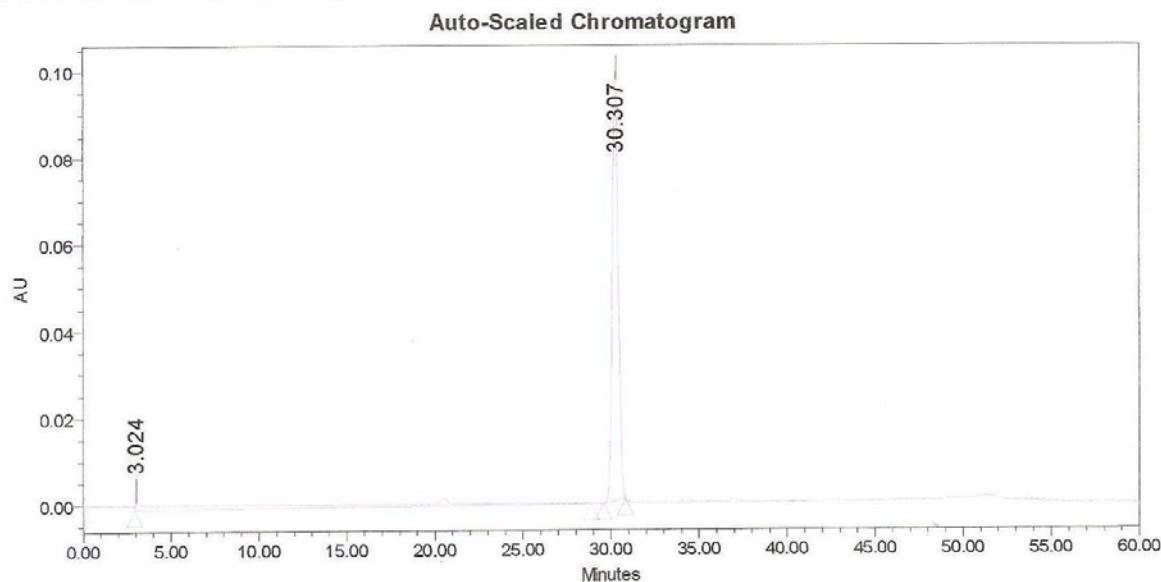
Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.037	19274	4697		
2		3.245	4236	645		
3		8.250	9274	880		
4		12.305	112303	9902		
5		12.978	68038	6147		
6		18.202	153063	9482		
7		21.091	31668	1773		
8		30.287	141276	6180		
9		33.670	325136	19533		
10		37.007	363178	22405		
11		39.069	14618	1283		
12		42.848	141239	13564		
13		43.388	12814	1214		

0,004063 mg de APG / mg de extrato.

ANEXO B- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da apigenina-7-glicosídeo.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	APG 0,044mg/ml	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	10/16/2008 2:35:30 PM
Vial:	1	Acq. Method Set:	GRAD2 30_09_08
Injection #:	3	Date Processed:	10/17/2008 8:14:08 AM
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	gotas AC
Run Time:	60.0 Minutes	Channel Name:	340nm
Sample Set Name:	Teor de Apigenina 16_10_08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 340.0 nm



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.024	940208	4161		
2		30.307	2339031	100172		

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1		3.024					
2		30.307					

ANEXO C- Artigo aceito para publicação.

JMF-2008-0290-Bezerra_1P.3D 10/09/09 5:42pm Page 1

JMF-2008-0290-Bezerra_1P
Type: short-communication

Short Communication

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD
J Med Food 12 (6) 2009, 1-4
Mary Ann Liebert, Inc. and Korean Society of Food Science and Nutrition
DOI: 10.1089=jmf.2008.0290

Bisabolol-Induced Gastroprotection Against Acute Gastric Lesions: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide, and K_{ATP} Channels

S.B. Bezerra,¹ L.K.A.M. Leal,¹ N.A.N. Pinto,² and A.R. Campos³

Departments of ¹Pharmacy and ²Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará;
and ³Vice-Rectory of Research and Post-Graduation, Fortaleza University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

ABSTRACT The effects of *Matricaria recutita* and a-bisabolol, a bioactive component from Chamomile species, were investigated against gastric damage induced by absolute ethanol (96%, 1 mL per animal) in rats. The effects of *M. recutita* extract and a-bisabolol on gastric mucosal damage were assessed by determination of changes in mean gastric lesion area. Mechanistic studies were carried out at with 100 mg/kg a-bisabolol. We further examined the possible participation of prostaglandins, nitric oxide, and K^{ATP} channels in its mechanism. *M. recutita* reduced gastric damage in all doses tested. a-Bisabolol at oral doses of 50 and 100 mg/kg markedly attenuated the gastric lesions induced by ethanol to the extent of 87% and 96%, respectively. Pretreatments with the nitric oxide antagonist N-nitro-L-arginine methyl ester (10mg/kg, i.p.) or with indomethacin, an inhibitor of cyclooxygenase, failed to block effectively the gastroprotective effect of a-bisabolol. Furthermore, the a-bisabolol effect was significantly reduced in rats pretreated with glibenclamide, an inhibitor of K^{ATP} channel activation. Thus we provide evidence that a-bisabolol reduces the gastric damage induced by ethanol, at least in part, by the mechanism of activation of K^{ATP} channels.

KEY WORDS: a-bisabolol, gastroprotection, mechanisms.

While tea is a part of dietary habits in many countries, evidence of medicinal properties has only been elucidated in the last 30 years. One of the most commonly consumed single-ingredient herbal teas is chamomile.¹ It was shown that chamomile oil extract inhibited the production of urease by *Helicobacter pylori*. In addition, it was found that the morphological and fermentative properties of *H. pylori* were affected by application of the *Matricaria recutita* oil extract.²

a-Bisabolol (BISA) is a sesquiterpene alcohol found in chamomile (*Matricaria* sp.) and other plants and has been widely used in dermatological and cosmetic formulations.³ Concerning the pharmacologic effects, previous studies showed that BISA demonstrated apoptosis-inducing action in malignant tumor cells,⁴ inhibition of the

activities of major human drug-metabolizing enzymes,⁵ and antimutagenic³ and anti-peptic⁶ properties.

Recent studies found that different substances from plant sources not only afford gastroprotection but also accelerate ulcer healing.⁷ Experimental and clinical evidence suggests that oxidative stress and increased acid secretion play a pivotal role in the etiopathology of gastric ulcer disease and that antioxidants and antacid agents can afford gastric cytoprotection.⁸ Previous studies conducted on the antiinflammatory,⁹ antimicrobial,² and antioxidant¹⁰ effects of chamomile extract led us to study the gastroprotective effects of *M. recutita* extract (MRE) and BISA, using the rat model of gastric damage induced by 96% ethanol to study the role of oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (weighing 150-160g) obtained from the Central Animal House of Federal University of Ceará, Ceará, Brazil, were used. They were housed in environmentally controlled conditions ($22\pm 28^{\circ}\text{C}$, 12-hour light-dark cycle), with free access to standard pellet diet (Purina do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) and water. Animals were kept in cages with raised floors to prevent coprophagy. They were fasted over a period of 15 hours and were habituated to the test environment for 2 hours before the experimentation. The experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the Federal University of Ceará in accordance with the ethical guidelines of National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

Chemical and drugs

The following drugs and chemicals were used: absolute ethanol from LabSynth (Diadema, Brazil), BISA, N-nitro-l-arginine methyl ester (L-NAME), and glibenclamide from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), indomethacin (Indocid) from Merck Sharp & Dohme (Campinas, Brazil), and extract of *M. recutita* flowers from Gerbrás (Anápolis, Brazil). BISA was first dissolved in dimethylsulfoxide and subsequently diluted in distilled water, and the resulting solutions of BISA did not exceed a concentration of dimethyl sulfoxide beyond 2%. Other drugs were dissolved in either physiological saline or distilled water. Drug concentrations were adjusted for treatment to give a volume of 10 mL/kg. In pilot studies 2% dimethylsulfoxide (vehicle) demonstrated by itself no effect or influence on the ulcerogenicity of ethanol.

Effect of MRE and BISA on ethanol-induced gastric damage

Acute gastric lesions were induced in rats (n=8/group) by intragastric administration of absolute ethanol 96% in a volume of 1mL using an orogastric metal tube. MRE and BISA dissolved in dimethylsulfoxide (2% in distilled water as vehicle) were administered at oral doses of 100, 200, and 400 mg/kg MRE and 25, 50, and 100mg/kg BISA, 60 minutes before ethanol application. The vehicle (10 mL/kg, p.o.) treated group was included as the negative control. Thirty minutes after ethanol administration, animals were killed by cervical dislocation, stomachs were removed and opened along the greater curvature, and ulcerative lesions were measured using a

computer planimetry program (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The lesion area in each animal was expressed as a percentage in relation to the total area of the corpus.

In mechanistic studies, separate experiments were performed to examine the role of prostaglandins, nitric oxide, and K^{ATP} channel activation on the gastroprotective effect of BISA (100mg/kg), using the appropriate antagonists indomethacin (10mg/kg, p.o.), L-NAME (10mg/kg, i.p.), and glibenclamide (5mg/kg, p.o.). The dose selection for these agonists and antagonists were based on our pilot experiments and on literature findings. In each case, animals were pretreated with the specific antagonist 15 minutes before the use of the corresponding agonist or BISA.

Data analysis

Data are mean \pm SEM values of eight animals per group, and the statistical significance between groups was analyzed by one-way analysis of variance followed by Student-Newman-Keul's test. The differences between groups were regarded as significant at $P<.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In recent past several reports documented the gastroprotective activity of phytochemical constituents that include flavonoids, oleo-resins, terpenes, xanthones, saponins, alkaloids, and tannins.¹¹ The present study found that BISA, a sesquiterpene isolated from many plant species, has a gastroprotective function. The effects of MRE and BISA on gastric lesions induced by absolute ethanol are shown in Figure 1. Ethanol induced intense gastric mucosal damage in the form of hemorrhagic streaks in the control group of rats that received vehicle alone but not MRE or BISA. Compared to controls that received vehicle, MRE- and BISA-treated groups of rats displayed marked protection against ethanol damage. MRE reduced gastric damage in all doses tested (78%, and 89%, respectively). At the BISA test doses of 50 and 100mg/kg, the reductions in gastric damage were in the order of 87% and 96%, respectively.

This finding is consistent with the studies of Klopell *et al.*¹² that report the protective effect of nerolidol against ethanol-induced gastric damage in rats. BISA is nontoxic, and acute oral administration to rats up to 5g/kg did not manifest signs of toxicity.¹³ In previous work, BISA was demonstrated to have an antioxidant activity,¹⁴ and in the current study it offered cytoprotection against gastric mucosal

damage induced by ethanol.

It has been firmly established that oxidative stress and impaired prostaglandin synthesis contribute to gastric mucosal damage in experimental models of gastric lesions induced by ethanol.¹⁵ Previous works showed that BISA¹⁴ and *M. recutita* aqueous extract¹⁰ demonstrated an antioxidant activity. And, in the current study, they offered cytoprotection against gastric mucosal damage induced by ethanol.

Cytoprotection in the stomach, consisting of mucus secretion, mucus circulation intensification and bicarbonate secretion to the gastric lumen, is highly dependent on the products of the arachidonic acid pathway and peroxidative antioxidative balance.¹¹ Several articles have demonstrated that oxygen free radicals are directly implicated in the pathogenesis of ethanol-induced lesions and that the hypoxia generated can increase the mucosal concentration of superoxide ions.¹⁶ These data suggest that antioxidant compounds could be active in this experimental model, producing an anti-ulcerogenic effect, because these substances are capable of settling on the membrane and counteracting lipid peroxide formation.¹⁷

Prostaglandins are of particular importance for the maintenance of gastric mucosal integrity when neuronal defense mechanisms are impaired.¹⁸ In order to verify the role of prostaglandins in the gastroprotection afforded by BISA; rats were pretreated with indomethacin, a non selective cyclooxygenase inhibitor. The results revealed that the gastroprotection by BISA against ethanol-induced mucosal injury is vulnerable to indomethacin, suggesting a role for endogenous prostaglandins in gastroprotection.

Nitric oxide is known as a potent vasorelaxing factor secreted from endothelial cells or the sensory nerve ending in the mucosa.¹⁹ Nitric oxide acts in gastric defense mechanisms by regulating the gastric mucosal blood flow, gastric mucus secretion, and increase in prostaglandin biosynthesis.²⁰ In the present study, treatment with L-NAME attenuated the protective effect of BISA. This finding suggests that nitric oxide is involved in the protective effect of BISA.

Because the protection afforded by BISA is partially indomethacin- and L-NAME-sensitive (Fig. 2), it is suggested that under these conditions endogenous prostaglandins and nitric oxide act as activators of K^{ATP} channels^{19,20} and that this mechanism, at least in part, mediates gastroprotection. The more effective blockade of BISA gastroprotection by the K^{ATP} channel blocker glibenclamida confirms this view.

In conclusion, the results of this study indicate a cytoprotective role for the MRE and the sesquiterpen BISA affording gastroprotection against mucosal damage induced by ethanol. The BISA gastroprotective mechanism is multifactorial and possibly involves endogenous prostaglandins, nitric oxide release, and activation of K^{ATP} channels.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to FUNCAP and CNPq for financial support.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. Kato A, Minoshima Y, Yamamoto J, Adachi I, Watson AA, Nash RJ: Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *J. Agric. Food. Chem.*, 2008; 56: 8206 - 8211.
2. Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Kvetnaya AS: Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 2008;22:252-253.
3. Gomes-Carneiro MR, Dias DM, De-Oliveira AC, Paumgartten FJ: Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of alpha-bisabolol in the *Salmonella*=microsome assay. *Mutat. Res* 2005;585:105-112.
4. Darra E, Abdel-Azeim S, Manara A, Shoji K, Marechal JD, Mariotto S, Cavalieri E, Perbellini L, Pizza C, Perahia D, Crimi M, Suzuki H: Insight into the apoptosis-inducing action of alphabisabolol towards malignant tumor cells: involvement of lipid rafts and Bids. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;476:113-123.
5. Ganzena M, Schneider P, Stuppner H: Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sci* 2006;78:856-861.
6. Isaac O, Thiemer K: Biochemical studies on camomile components. III. In vitro studies about the antipeptic activity of ()-alpha-bisabolol. *Arzneimittelforschung* 1975;25:1352-1354.
7. Zayachivska OS, Zayachivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, Konturek PC, Brzozowski T, Ghegotsky MR: Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *J. Physiol. Pharmacol* 2004;56:91:219-231.
8. Repetto MG, Llesuy SF: Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J. Med. Biol. Res.* 2002;35:523-534.
9. Mazokopakis EE, Vrentzos GE, Papadakis JA, Babalis DE, Ganotakis ES: Wild chamomile (*Matricaria recutita* L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis. *Phytomedicine* 2005;12:25-27.
10. Pereira RP, Fachinetto R, de Souza Prestes A, Puntel RL, Santosda Silva GN, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Burger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JB: Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria*

- recutita and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res* 2009;34:973-983.
11. de Olinda TM, Lemos TL, Machado LL, Rao VS, Santos FA: Quebrachitol inducedgastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide and K^{ATP} channels. *Phytomedicine* 2008;15:327-333.
 12. Klopell FC, Lemos M, Sousa JP, Comunello E, Maistro EL, Bastos JK, de Andrade SF: Nerolidol, an antiulcer constituentfrom the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Z Naturforsch [C]* 2007;62:537-542.
 13. Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS, Api AM: Fragrance material review on alpha-bisabolol. *Food Chem Toxicol* 2008;46(Suppl 11):S72-S76.
 14. Braga PC, Dal Sasso M, Fonti E, Culici M: Antioxidant activity of bisabolol: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. *Pharmacology* 2008;83: 110-115.
 15. Chattopadhyay I, Bandyopadhyay U, Biswas K, Maity P, Banerjee RK: Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1397-1408.
 16. Gonzalez FG, Di Stasi LC: Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine* 2002;9:125-134.
 17. Halliwell B: Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996;16:33-50.
 18. Evangelista S: Role of sensory neurons in estitation and healing of gastric ulcers. *Curr Pharm Des* 2006;12:2977-2984.
 19. Peskar BM, Ehrlich K, Peskar BA: Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:969-974.
 20. Pongpiriyadacha Y, Matsuda H, Morikawa T, Asao Y, Yoshikawa M: Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. *Biol Pharm Bull* 2003;26:651-657.

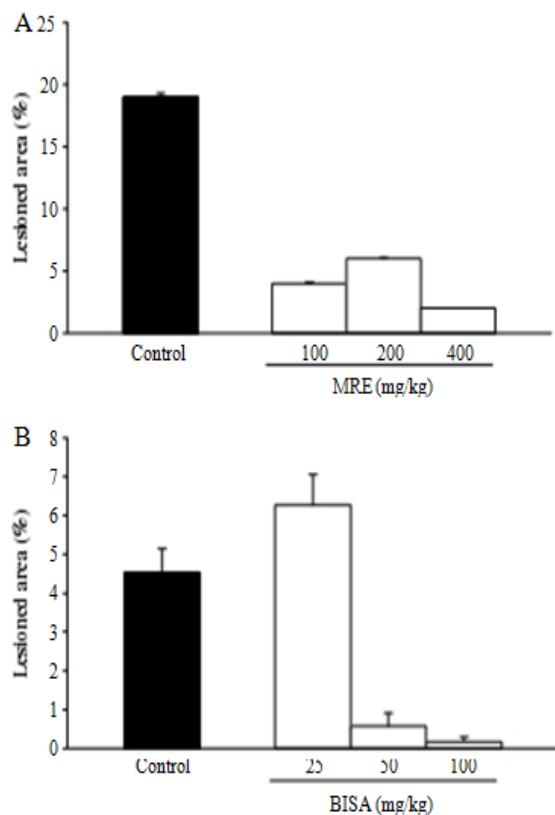


FIG. 1. Effect of (A) MRE and (B) BISA on gastric mucosal injury induced by absolute ethanol in rats. Data are mean SEM values for eight animals per group. ***P<.001 versus vehicle-treated controls (by analysis of variance and Student-Newman-Keul's test).

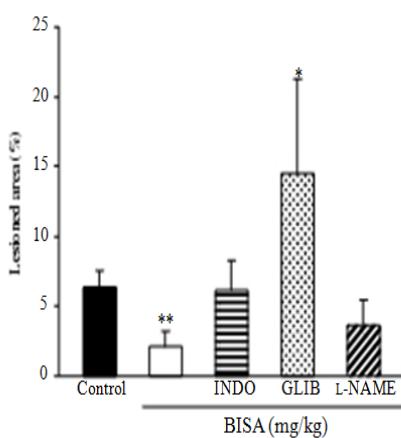


FIG. 2. Influence of indomethacin (INDO), glibenclamide (GLIB), and L-NAME on the gastroprotective effect of BISA in rats against gastric mucosal injury induced by absolute ethanol. Rats were treated perorally with BISA 60 minutes before 96% ethanol (1mL per rat, perorally). INDO (10mg/kg), GLIB (5mg/kg), and L-NAME(10mg/kg) were administered 15 or 30 minutes before BISA. Data are mean SEM values for eight animals per group. **P <.01 versus control group; *P <.05 versus BISA alone (by analysis of variance and Student-Newman-Keul's test).