

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA,
ANTIINFLAMATÓRIA INTESTINAL E ANTINOCICEPTIVA
VISCERAL DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA* BAILL.**

Luilma Albuquerque Gurgel

Fortaleza - Ceará
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Luilma Albuquerque Gurgel

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA,
ANTIINFLAMATÓRIA INTESTINAL E ANTINOCICEPTIVA
VISCERAL DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA* BAILL.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de doutor(a) em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Fortaleza - Ceará
2005

G987e Gurgel, Luilma Albuquerque

Estudo das atividades antifúngica, antiinflamatória intestinal e antinociceptiva visceral do látex do *Croton urucurana* Baill. / Luilma Albuquerque Gurgel. - Fortaleza, 2005.
xviii, 192 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Croton 2. Dermatomicoses 3. Inflamação 4. Dor

CDD 615.53

ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, ANTIINFLAMATÓRIA INTESTINAL E ANTINOCICEPTIVA VISCERAL DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA* BAILL.

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Doutor(a) em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética.

Tese aprovada em: 24 de junho de 2005.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao (UFC)
(Orientador)

Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins (UFMT)

Prof. Dr. Eduardo Augusto Torres da Silva (UFC)

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (UECE)

A Deus e meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades que tem me dado.

Aos meus pais, irmãos e amigos pelo apoio e compreensão durante o período do curso.

Ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao, pela orientação científica, dedicação e paciência durante a realização deste trabalho e principalmente por sua valiosa amizade.

*Ao Professor Domingos Tabajara de Oliveira Martins pelo fornecimento do látex do *Croton urucurana* e ao Professor Valdir Cechinel Filho pelo fornecimento das frações aquosa e acetona do látex e pela análise fitoquímica das mesmas.*

*Ao Professor José Júlio Costa Sidrim pela colaboração na realização do estudo da atividade antimicrobiana do látex do *Croton urucurana*.*

Às Professoras Emília Tomé de Sousa e Gerly Anne de Castro Brito pela contribuição na realização das avaliações histopatológicas.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação e do Laboratório de Produtos Naturais e a todos os professores e funcionários desta universidade que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro através da bolsa de doutorado.

“Duvida sempre de ti mesmo, até que os dados não deixem lugar para dúvidas”.

Louis Pasteur

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA

ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, ANTIINFLAMATÓRIA INTESTINAL E ANTINOCICEPTIVA VISCERAL DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA* BAILL. Luilma Albuquerque Gurgel. Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Depto. de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2005.

O látex vermelho (*Sangre de Grado*) extraído de algumas espécies de *Croton* é utilizado na medicina popular no tratamento de câncer, reumatismo, feridas, úlceras, diarreia, cólicas intestinais e no combate às infecções. O presente trabalho teve por objetivo investigar uma possível atividade antimicrobiana do látex do *Croton urucurana* Baill. (LCU) e seu potencial antiinflamatório intestinal e antinociceptivo visceral. Foram utilizados os modelos de colite induzida por ácido acético e lesão intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos; contorções abdominais induzidas por ácido acético, cistite induzida por ciclofosfamida e dor visceral induzida por capsaicina em camundongos; além de modelos, *in vitro*, avaliando as atividades antibacteriana e antifúngica do LCU. No modelo de colite induzida por ácido acético, o pré-tratamento com LCU (200 e 400 mg/kg, v.r.) reduziu ($p < 0,05$) a relação peso úmido/comprimento do cólon, a atividade das enzimas mieloperoxidase e catalase e a produção de nitrito em relação ao controle. No modelo de isquemia-reperfusão mesentérica o pré-tratamento com o LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.) preveniu ($p < 0,01$) o aumento das atividades da mieloperoxidase e catalase e o aumento dos níveis de nitrito associados à isquemia-reperfusão. O LCU (200 mg/kg) também preveniu ($p < 0,001$) a redução no nível de glutathiona reduzida neste modelo. Ambas as doses reduziram ($p < 0,05$) o número de contorções induzidas por ácido acético, o número de comportamentos nociceptivos induzidos pela capsaicina e o tempo de comportamentos relacionados a dor visceral na cistite induzida por ciclofosfamida. O pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) reverteu a atividade antinociceptiva do LCU (200 mg/kg, v.o.) no modelo de dor visceral induzida por capsaicina, contudo, a ioimbina (2 mg/kg, i.p.) não foi capaz de reverter tal efeito. A atividade antinociceptiva do LCU, neste modelo, não foi potencializada pela administração de L-nitro arginina metil éster (20 mg/kg, i.p.) ou vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.). O LCU não demonstrou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e as leveduras *Candida* sp., *Trichosporon* sp. e *Malassezia* sp., no entanto, apresentou atividade contra os dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum* no método de difusão em discos e demonstrou concentração inibitória mínima de 1,25 mg/mL para o *Trichophyton tonsurans* e 2,5 mg/mL para as demais espécies. Os resultados sugerem que o LCU apresenta atividade antiinflamatória intestinal, possivelmente por sua ação antioxidante, além de atividades antinociceptiva visceral e antifúngica. Sua atividade antinociceptiva não depende de mecanismo α_2 -adrenérgico, contudo parece haver envolvimento de mecanismo nitriérgico e opióide, assim como de receptores vanilóides. Estes resultados confirmam o uso popular do LCU e este pode ser explorado como alternativa para o tratamento das dermatofitoses, das doenças inflamatórias intestinais e dos distúrbios da função gastrointestinal.

Palavras-chave: *Croton urucurana*, dermatófitos, inflamação intestinal, nocicepção visceral.

RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA

The red sap (*Sangre de Grado*) extracted from some *Croton* species is used in folk medicine for the treatment of cancer, rheumatism, wounds, ulcers, diarrhoea, intestinal colics and to combat infections. The aim of this study was to evaluate a possible antimicrobial activity of the sap extracted from *Croton urucurana* Baill. (SCU) and its intestinal antiinflammatory and visceral antinociceptive potential. The experimental models used were acetic acid-induced colitis and mesenteric ischemia/reperfusion-induced intestinal injury in rats; acetic acid-induced writhing, cyclophosphamide-induced cystitis and capsaicin-induced visceral pain in mice; and *in vitro* models to evaluate the antibacterial and antifungal activities of SCU. In the acetic acid-induced colitis, the pretreatment with SCU (200 and 400 mg/kg, r.r.) reduced ($p < 0,05$) the wet weight/length ratio of colonic tissue, the myeloperoxidase and catalase activities and the nitrite production in comparison to control animals. In mesenteric ischemia/reperfusion model the pretreatment with SCU (200 and 400 mg/kg, p.o.) prevented ($p < 0,01$) the increase in the myeloperoxidase and catalase activities and the ischemia/reperfusion-associated increase in nitrite level. The SCU (200 mg/kg, p.o.) also prevented ($p < 0,001$) the depletion in reduced glutathione level in this model. Both doses reduced ($p < 0,05$) the number of acetic acid-induced writhing, the number of capsaicin-induced nociceptive behaviour and the time of visceral pain-related behaviour in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. The pretreatment with naloxone (5 mg/kg, i.p.) reverted the SCU (200 mg/kg, p.o.) antinociceptive activity in capsaicin-induced visceral pain model, however, ioimbine (2 mg/kg, i.p.) failed to mitigate in a significant manner, this antinociceptive effect. The SCU antinociceptive activity, in this model, was not potentiated by L-nitro-arginine-methyl ester (20 mg/kg, i.p.) or ruthenium red (3 mg/kg, s.c.). SCU failed to show activity against the bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) and yeasts tested (*Candida* sp., *Trichosporon* sp. and *Malassezia* sp.), although, presented activity against the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* and *Epidermophyton floccosum* in paper disk diffusion method and showed minimal inhibitory concentration of 1,25 mg/mL for *Trichophyton tonsurans* and 2,5 mg/mL for the others species. In conclusion, the results of this study suggest that the SCU presents intestinal antiinflammatory activity, possible because of its antioxidant action, visceral antinociceptive activity and antifungal activity against dermatophytes. Its antinociceptive effect is probable dependent of opioid and nitriergic mechanism, with a possible participation of vanilloid receptors without involvement of α_2 -adrenergic receptors. This results confirm its popular use, and it can be explored as an alternative treatment for dermatophytosis, inflammatory intestinal diseases and functional gastrointestinal disorders.

Key-words: *Croton urucurana*, dermatophytes, intestinal inflammation, visceral nociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Sangre de Grado</i> obtido do <i>Croton lechleri</i>	24
2	Coleta do <i>Sangre de Grado</i> obtido do <i>Croton lechleri</i>	25
3	<i>Croton urucurana</i> Baill.....	30
4	Folhas do <i>Croton urucurana</i> Baill.....	30
5	Flores e frutos do <i>Croton urucurana</i> Baill.....	30
6	Posicionamento dos discos contendo diferentes quantidades do látex do <i>Croton urucurana</i> no método de difusão em discos utilizando <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	83
7	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a relação peso úmido/comprimento do cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos.....	108
8	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a lesão tecidual microscópica no cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos.....	111
9	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa do cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos.....	112
10	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a atividade da catalase na mucosa do cólon dos animais no modelo de colite	

	induzida por ácido acético em ratos.....	113
11	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a concentração de nitrito na mucosa do cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos.....	114
12	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a lesão tecidual microscópica do íleo dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos.....	117
13	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa ileal dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos.....	118
14	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a atividade da catalase na mucosa ileal dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos.....	119
15	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a concentração de nitrito na mucosa ileal dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos.....	120
16	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a quantidade de grupos sulfidrílicos não protéicos (SH-NP) na mucosa ileal dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos.....	121
17	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o número de contorções no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	123

18	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o tempo de crises transitórias no modelo de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos.....	125
19	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o número de comportamentos nociceptivos no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos.....	129
20	Efeito da naloxona e do L-nitro arginina metil éster sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos.....	130
21	Efeito da ioimbina sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos.....	131
22	Efeito do vermelho de rutênio sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos.....	132
23	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	134
24	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a atividade motora espontânea de camundongos no teste do campo aberto.....	135
25	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o tempo de permanência dos animais no teste do “rotarod”.....	137

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o crescimento de dermatófitos no método de difusão em discos.....	103
2	Concentração inibitória mínima (CIM) do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) contra dermatófitos no método de diluição em tubos.....	104
3	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o escore de lesão macroscópica do cólon no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos.....	109
4	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o escore de lesão microscópica do cólon no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos.....	110
5	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o escore para comportamento nociceptivo no modelo de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
5-ASA	Ácido 5-aminossalicílico
Baill.	Baillon
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CL ₅₀	Concentração letal 50%
DFG	Distúrbio(s) da função gastrointestinal
DII	Doença(s) inflamatória(s) intestinal(is)
DL ₅₀	Dose letal para 50% dos animais
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSS	Dextrana sulfato de sódio
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
E.P.M.	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
LCU	Látex do <i>Croton urucurana</i> Baill.
L-NAME	L-Nitro arginina metil éster
M	Molar
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
N	Normal

NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
NF-κB	Fator nuclear-capa B
nm	Nanômetro(s)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
PAF	Fator ativador de plaquetas
pH	Potencial de hidrogênio
p.o.	Per os (via oral)
ppm	Partes por milhão
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
r.r.	Rectal route (via retal)
s.c.	Subcutâneo ou subcutaneous
SCU	Sap extracted from <i>Croton urucurana</i> (látex do <i>C. urucurana</i>)
-SH	Grupamento sulfidríla
SH-NP	Grupos sulfidrílicos não protéicos
SII	Síndrome do intestino irritável
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TNB	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF	Fator de necrose tumoral
UNIVALI	Universidade do Vale do Itajaí
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
v.r.	Via retal
VR1	Receptores vanilóides do tipo 1
μg	Micrograma(s)
μL	Microlitro(s)
μm	Micrômetro(s)

SUMÁRIO

Resumo na língua vernácula.....	07
Resumo em língua estrangeira.....	08
Lista de figuras.....	09
Lista de tabelas.....	12
Lista de abreviaturas.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 A FITOTERAPIA.....	18
1.2 O GÊNERO <i>CROTON</i>	22
1.3 O <i>CROTON URUCURANA</i> BAILLON.....	27
1.4 INFECÇÕES FÚNGICAS.....	31
1.4.1 Dermatofitoses.....	34
1.5 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS.....	38
1.5.1 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais.....	42
1.6 OXIDAÇÃO E ANTIOXIDANTES.....	45
1.6.1 Espécies reativas de oxigênio e as doenças inflamatórias intestinais..	50
1.7 DISTÚRBIOS DA FUNÇÃO GASTROINTESTINAL.....	53
1.7.1 Tratamento dos distúrbios da função gastrointestinal.....	57
1.8 LESÃO TECIDUAL POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....	60
1.9 DOR VISCERAL.....	63
1.10 OBJETIVOS.....	69
1.10.1 Objetivo geral.....	69
1.10.2 Objetivos específicos.....	70
2 MATERIAIS.....	71
2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	72
2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	72
2.3 BACTÉRIAS E FUNGOS UTILIZADOS.....	73
2.4 EQUIPAMENTOS.....	74

3 MÉTODOS.....	75
3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FRAÇÕES ACETONA E AQUOSA DO LÁTEX DO <i>CROTON URUCURANA</i>	76
3.1.1 Material vegetal.....	76
3.1.2 Preparação das frações.....	76
3.1.3 Análise cromatográfica.....	77
3.1.4 Separação e purificação dos compostos.....	77
3.1.5 Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados.....	77
3.2 TOXICIDADE SOBRE <i>ARTEMIA SALINA</i>	78
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	79
3.3.1 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	79
3.3.2 Atividade antifúngica <i>in vitro</i>	81
3.3.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima.....	84
3.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL.....	84
3.4.1 Colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos.....	84
3.4.2 Injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos.....	86
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	87
3.5.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase.....	87
3.5.2 Determinação da atividade da catalase.....	88
3.5.3 Dosagem de nitrito.....	89
3.5.4 Determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos.....	89
3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	90
3.7 MODELOS DE DOR VISCERAL.....	91
3.7.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	91
3.7.2 Cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos.....	92
3.7.3 Dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos.....	93
3.8 TEMPO DE SONO INDUZIDO POR PENTOBARBITAL EM CAMUNDONGOS.....	95
3.9 MODELOS DE ESTUDO DO DESEMPENHO MOTOR DOS ANIMAIS.....	96
3.9.1 Teste do campo aberto em camundongos.....	96

3.9.2 Teste do “rotarod” em camundongos.....	97
3.10 MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	97
4 RESULTADOS.....	99
4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FRAÇÕES ACETONA E AQUOSA DO LÁTEX DO <i>CROTON URUCURANA</i>	100
4.2 TOXICIDADE SOBRE <i>ARTEMIA SALINA</i>	101
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	101
4.3.1 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	101
4.3.2 Atividade antifúngica <i>in vitro</i>	102
4.3.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima.....	104
4.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL.....	105
4.4.1 Colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos.....	105
4.4.2 Injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos.....	115
4.5 MODELOS DE DOR VISCERAL.....	122
4.5.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	122
4.5.2 Cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos.....	124
4.5.3 Dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos.....	127
4.6 TEMPO DE SONO INDUZIDO POR PENTOBARBITAL EM CAMUNDONGOS.....	133
4.7 MODELOS DE ESTUDO DO DESEMPENHO MOTOR DOS ANIMAIS.....	133
4.7.1 Teste do campo aberto em camundongos.....	133
4.7.2 Teste do “rotarod” em camundongos.....	136
5 DISCUSSÃO.....	138
6 CONCLUSÕES.....	165
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FITOTERAPIA

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por um longo tempo, minerais, plantas e produtos animais foram as principais fontes de drogas (DE PASQUALE, 1984).

O documento médico mais antigo conhecido é sumeriano e data de 4.000 anos atrás. Este documento menciona remédios à base de plantas utilizados no tratamento de diversas doenças (KONG et al., 2003). O papiro de Ebers, espécie de farmacopéia faraônica, escrita em torno de 1.550 a.C., já se referia aos medicamentos de origem vegetal e mencionava cerca de 700 remédios, entre eles, o bulbo da cila, o óleo de rícino e a genciana.

Muitas plantas são atualmente utilizadas para uma variedade de problemas de saúde como ansiedade, artrite, febre, gripes, constipação, cefaléia, infecções, insônia, distúrbios intestinais, sintomas pré-menstruais, estresse, úlceras e indisposição (CRAIG, 1999).

As plantas medicinais são um importante elemento da medicina indígena. Na Amazônia, por exemplo, os indígenas usam pelo menos 1.300 espécies de plantas. No Sudeste da Ásia, os curadores tradicionais utilizam 6.500 plantas diferentes para tratar malária, úlceras de estômago, sífilis e outras doenças (KONG et al., 2003).

A importância dos produtos naturais é claramente percebida, mesmo se for considerado apenas o impacto do descobrimento da penicilina, obtida de microrganismos, no desenvolvimento da terapia anti-infecciosa. Cerca de 25% das drogas prescritas em todo o mundo são derivadas de plantas. Das 252 drogas consideradas como essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são originadas de plantas (RATES, 2001).

Tem-se observado um entusiasmo sem precedentes na imprensa brasileira quanto às potencialidades de exploração dos recursos naturais. No Brasil, o mercado para terapias à base de plantas medicinais movimenta hoje em torno de US\$ 500 milhões. Esta cifra é pequena, se comparada aos valores publicados para a Europa e EUA, no ano de 2000: US\$ 8,5 e 6,3 bilhões, respectivamente (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Esses valores indicam um mercado com potencial em expansão.

O contexto social moderno e a visão econômica dos serviços de saúde, a necessidade do mercado farmacêutico e o reconhecimento de que a pesquisa envolvendo plantas medicinais usadas na medicina popular representa um caminho para o desenvolvimento de novas drogas (CALIXTO, 1996; ELISABETSKY, 1987) têm proporcionado um aumento no número de publicações nesta área, e instituições privadas e governamentais estão financiando projetos de pesquisa em todo o mundo (RATES, 2001). Contudo, o potencial de uso das plantas como fontes de novas drogas ainda é pouco explorado. Das 250.000 a 500.000 espécies de plantas estimadas, apenas uma pequena percentagem foi investigada fitoquimicamente e uma percentagem ainda menor foi estudada em termos de suas propriedades farmacológicas (RATES, 2001).

Estima-se que no Brasil exista um total de 40 a 50 mil espécies vegetais; estes dados promovem o Brasil ao título: “o país que possui o maior número de espécies vegetais no mundo” (FARNSWORTH; SOEJARTO, 1991).

No segmento acadêmico, a convicção da importância dos recursos naturais para o desenvolvimento vem de longa data. Afinal, as plantas fazem parte da vida do homem desde seus primórdios e sua importância nos diversos estágios de desenvolvimento da sociedade é inegável.

Na área farmacêutica, as plantas e os extrativos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fármacos (que são as substâncias ativas isoladas), como para a obtenção de adjuvantes (produtos utilizados na formulação de medicamentos) ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais; os medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2001).

O Brasil possui uma das maiores bases universitárias das Américas, perdendo apenas para os EUA; nossos cientistas publicam em revistas de grande impacto; nosso sistema de pós-graduação é de excelente nível e serve de exemplo para vários outros países; muitas patentes que geraram medicamentos, hoje comercializados por empresas multinacionais, tiveram origem em universidades brasileiras; temos a maior biodiversidade do planeta; algumas universidades brasileiras possuem equipamentos analíticos equivalentes aos das grandes universidades estrangeiras. No entanto, os recursos para financiar pesquisas com o objetivo de identificar compostos de origem vegetal que possam ser utilizados no

desenvolvimento de fármacos ainda são insuficientes em volume e constância tendo em vista o alto custo do desenvolvimento destes produtos. Isto faz com que as pesquisas realizadas nas Instituições de Ensino Superior no Brasil não sejam competitivas (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

1.2 O GÊNERO *CROTON*

O gênero *Croton* pertence à família Euforbiaceae. Esta família é constituída por aproximadamente 300 gêneros e 7.500 espécies, de distribuição cosmopolita, mas com desenvolvimento mais acentuado nas regiões tropicais e subtropicais. O gênero com maior número de espécies é o *Euphorbia*, com aproximadamente 1.500 espécies encontradas em todas as partes do planeta. Outros gêneros com grande número de espécies são o *Croton* (750 espécies), *Phyllanthus* (400 espécies), *Acalypha* (400 espécies), *Macaranga* (250 espécies), *Antidesma* (150 espécies), *Dryptes* (150 espécies), *Tragia* (150 espécies), *Manihot* (150 espécies) e *Jatropha* (150 espécies) (CRONQUIST, 1981 apud MATTOS, 2001).

As Euforbiaceas geralmente são árvores, arbustos ou mais raramente ervas, algumas vezes trepadeiras, eventualmente suculentas, muito diferentes quimicamente e em morfologia vegetativa (CRONQUIST, 1981 apud MATTOS, 2001).

As 750 espécies pertencentes ao gênero *Croton* encontram-se distribuídas nas regiões tropicais do planeta. Algumas destas espécies, como o *Croton urucurana* Baillon, quando têm seu tronco cortado exsudam um látex de cor

vermelha (Figuras 1 e 2) conhecido como *Sangre de Grado* ou *Sangre de Drago* (em inglês *Dragon's Blood*) nomes espanhóis dados à planta pelos Europeus em sua chegada ao Novo Mundo, cinco séculos atrás. No Brasil, o látex é também conhecido como sangue de dragão, sangra d'água, sangue de água ou sangue de pau. A origem do nome *Sangre de Drago* vem de algumas espécies do gênero *Dracaena* da família *Agavaceae*. Algumas das 60 espécies desse gênero também produzem um látex de cor vermelha quando seu tronco é cortado ou sofre alguma injúria (dando origem ao nome *Dragon's Blood*). Uma destas espécies, a *Dracaena cinnabari* Balf., era provavelmente conhecida na antigüidade (UBILLAS et al., 1994).

O *Sangre de Grado* tem sido utilizado por séculos e continua a ser usado por uma grande diversidade de pessoas, especialmente na Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, México e América Central (UBILLAS et al., 1994). Ele é tão utilizado na medicina popular que as árvores das quais ele é obtido encontram-se em perigo de extinção devido à demanda excessiva em países como Peru e Equador (PHILLIPSON, 1995).

O látex é utilizado na medicina popular por via oral ou através de administração tópica. No primeiro caso, é utilizado no tratamento de câncer, reumatismo, hemorragias, gripes, tosses, úlceras estomacais, cólicas intestinais, diarreia e no combate a infecções. No tratamento de infecções herpéticas, logo após a extração de dentes e úlceras na boca, úlceras abertas na pele e feridas ele é aplicado topicamente (BETTOLO; SCARPATI, 1979; HARTWELL, 1969; ITOKAWA et al., 1991; PERDUE et al., 1979; UBILLAS et al., 1994). O látex também é utilizado diluído em água para o uso em banhos de assento, em casos de sangramento vaginal excessivo. Segundo Ubillas et al. (1994), não foram registrados efeitos colaterais após o uso interno.



FIGURA 1. Sangre de Grado obtido do *Croton lechleri*.



FIGURA 2. Coleta do *Sangre de Grado* obtido do *Croton lechleri*.

A dosagem, baseada no uso indígena e no uso popular em algumas regiões da América do Sul, é de 5 a 30 gotas do látex diluídas em água, leite ou bebida alcoólica, de uma a três vezes ao dia, por cinco dias. Este tratamento é geralmente repetido por um período de três semanas.

Muitos efeitos farmacológicos do *Sangre de Grado* foram descritos na literatura, dentre estes efeitos estão a atividade cicatrizante, antidiarréica, anticâncer, antiinflamatória e antibacteriana (CHEN; CAI; PHILLIPSON, 1994; GABRIEL et al., 1999; GURGEL et al., 2001; HOLODNIY et al., 1999; MILLER et al., 2000; PIETERS et al., 1995).

As atividades biológicas demonstradas por alguns compostos químicos isolados do *Sangre de Grado* são: atividade cicatrizante, antiinflamatória e antitumoral (ITAKAWA et al., 1991; PIETERS et al., 1995; VAISBERG et al., 1989) do alcalóide taspina (PERDUE et al., 1979); atividade antiviral, antidiarréica, antibacteriana e cicatrizante (CHEN; CAI; PHILLIPSON, 1994; UBILLAS et al., 1994) de compostos fenólicos como as proantocianidinas (catequina e galocatequina) e diterpenos (CAI et al., 1991; CAI; CHEN; PHILLIPSON, 1993b); atividade antiinflamatória da cajucarinolida e isocajucarinolida (ICHIHARA et al., 1992); atividade contra *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus* do composto sonderianina (CRAVEIRO et al., 1981; CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982); atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* das corberinas A e B (CAI; CHEN; PHILLIPSON, 1993a); atividade neurotóxica de um diterpeno isolado do látex do *Croton linearis* (ALEXANDRE et al., 1991) e atividade inibidora da proliferação celular da lignana dihidrobenzofurano 3',-4-O-dimetilcedrusina (PIETERS et al., 1993).

O composto SP-303, um oligômero heterogêneo, apresenta em sua composição (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina e (-)-galoepicatequina, com predomínio da (+)-galocatequina e da (-)-galoepicatequina (UBILLAS et al., 1994). Este composto mostrou atividade anti-secretória intestinal em modelos animais *in vivo* e *in vitro* (GABRIEL et al., 1999). O SP-303 também exibiu potente atividade antiviral e, após uma variedade de avaliações toxicológicas, demonstrou segurança, particularmente por via oral, o que era previsto, uma vez que os taninos condensados são um componente comum na dieta (UBILLAS et al., 1994).

Vale ressaltar que foi observado que existem variações na composição química entre amostras de *Sangre de Grado* obtidas de regiões diferentes (CAI; CHEN; PHILLIPSON, 1993b). Contudo, talvez exista uma grande quantidade de proantocianidinas no *Sangre de Grado*, uma vez que foi verificado que aproximadamente 90% do peso seco do látex obtido do *Croton lechleri* é relativo às proantocianidinas (CAI; CHEN; PHILLIPSON, 1993b).

Em resumo, as espécies de *Croton* conhecidas como *Sangre de Grado* desempenham um importante papel na medicina popular de muitos países da América Latina.

1.3 O CROTON URUCURANA BAILLON

O *Croton urucurana* Baill. mede de 7 a 14 metros de altura e seu tronco de 25 a 35 cm de diâmetro (Figura 3). A árvore tem folhas simples, prateadas na página inferior, de 9 a 18 cm de comprimento (Figura 4). É uma planta decídua (suas folhas

caem em certa época do ano), heliófita (necessita de luz solar direta para se desenvolver), pioneira (é uma das primeiras que aparece após a derrubada da mata), seletiva higrófila (vive em ambiente com elevado grau de umidade), característica de terrenos muito úmidos e brejosos, principalmente da floresta latifoliada (vegetação com abundância de espécies dotadas de folhas largas) semidecídua. Floresce durante um longo período do ano, iniciando-se em dezembro e prolongando-se até junho. A frutificação é quase simultânea (Figura 5). Seus nomes populares são muitos, dentre os quais encontramos *sangre de grado*, *sangre de drago*, *sangra d'água*, sangue-de-água, urucurana, lucurana, licurana, capixingui, tapexingui e tapixingui.

O *Croton urucurana* é uma árvore comumente encontrada no Paraguai, no Norte da Argentina, no Sul e no Centro Oeste do Brasil e no Uruguai. No Brasil, a árvore pode ser encontrada em Estados como Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul até Rio Grande do Sul (LORENZI, 1992 apud LUCHI, 2004).

Existem pouquíssimos estudos sobre a composição química da casca do tronco do *Croton urucurana*. Estes estudos descrevem a presença do ácido acetil aleurítico, catequina, galocatequina, sonderianina, β -sitosterol e seu glicosídeo, estigmasterol, campesterol (PERES et al., 1997; PERES et al., 1998a), e dois novos diterpenos clerodano (PERES et al., 1998b).

Estudo fitoquímico do látex do *Croton urucurana* revelou a presença de saponinas, esteróides, taninos pirogálicos, taninos catéquicos, catequinas, flavonóis, flavonas, antocianinas, antocianidinas e alcalóides, dentre os quais foi identificada a taspina (GURGEL, 2000; MATTOS, 2001). O principal polissacarídeo do látex do

Croton urucurana, o fucoarabinogalactano, foi isolado recentemente (MILO et al., 2002).

São escassos na literatura estudos sobre a bioatividade do *Croton urucurana*. Peres et al. (1997 e 1998a) demonstraram as atividades antimicrobiana (contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*) e antinociceptiva de alguns compostos isolados da casca do mesmo. Mais recentemente foi demonstrada a atividade antidiarréica do látex obtido do *Croton urucurana* em modelos animais de diarreia induzida por óleo de rícino, trânsito gastrintestinal, secreção intestinal induzida pela toxina da cólera e no modelo de contratilidade induzida por serotonina (5-HT) em jejuno isolado de rato *in vitro* (GURGEL, 2000; GURGEL et al., 2001). Também foi mostrado que a atividade inibitória do látex sobre o trânsito gastrintestinal não depende de mecanismo opióide, nitriérgico, α_2 -adrenérgico ou colinérgico (GURGEL, 2000). Mattos, em 2001, demonstrou as atividades antinociceptiva, antiinflamatória, antiespasmódica e cicatrizante do látex obtido do *Croton urucurana*. Neste estudo, Mattos verificou que a atividade antinociceptiva do látex envolve a interação com o sistema opióide, eicosanóides e neuropeptídeos (taquicininas e/ou peptídeos excitatórios) e seu efeito antiinflamatório envolve a inibição de mediadores da resposta inflamatória (prostaglandinas, 5-HT, histamina, substância P e leucotrienos) e inibição da migração celular.

Não foram encontrados estudos sobre a bioatividade do látex extraído do *Croton urucurana* contra fungos, inflamações intestinais ou dor visceral.



FIGURA 3. *Croton urucurana* Baill.



FIGURA 4. Folhas do *Croton urucurana* Baill.



FIGURA 5. Flores e frutos do *Croton urucurana* Baill.

1.4 INFECÇÕES FÚNGICAS

Os fungos são um grupo extremamente diversificado de organismos, com aproximadamente 250.000 espécies amplamente distribuídas em todos os ecossistemas (SELITRENNIKOFF, 2001). Os humanos e outros animais são expostos a fungos desde o momento do nascimento. Felizmente, apenas aproximadamente 200 espécies são patogênicas aos mamíferos, apesar de muitos fungos não patogênicos causarem sintomas de alergia (SELITRENNIKOFF, 2001).

As plantas também são expostas a um grande número de fungos patogênicos. Apesar delas não possuírem sistema imune, as plantas têm desenvolvido uma variedade de mecanismos potentes de defesa, incluindo a síntese de compostos de baixo peso molecular, proteínas e peptídeos que possuem atividade antifúngica (SELITRENNIKOFF, 2001).

Qualquer infecção de origem fúngica é chamada de micose. As micoses são classificadas, em cinco grupos, de acordo com o grau de envolvimento do tecido e modo de entrada no hospedeiro. São elas: sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial e oportunista (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

As micoses sistêmicas são normalmente causadas por fungos que vivem no solo, sendo a inalação dos esporos a rota de transmissão. São exemplos a histoplasmose e a coccidioidomicose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

As micoses subcutâneas são localizadas abaixo da pele. A infecção ocorre por implantação direta dos esporos ou fragmentos de micélios em uma ferida aberta na pele (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

As micoses cutâneas são causadas por um grupo de fungos chamados dermatófitos, que infectam apenas a epiderme, o cabelo e as unhas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Os fungos que causam micoses superficiais estão localizados ao longo dos fios de cabelos e em células epidérmicas superficiais. Estas infecções são prevalentes em climas tropicais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Um patógeno oportunista é geralmente inofensivo em seu habitat normal, mas pode tornar-se patogênico em um hospedeiro que se encontra debilitado ou traumatizado, ou em indivíduos sobre tratamento com antibióticos de amplo espectro, ou com o sistema imune comprometido por drogas ou por distúrbios imunes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Durante as duas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas em humanos, especialmente envolvendo pacientes com deficiência imune, tem aumentado dramaticamente (COX; PERFECT, 1993; FOX, 1993; HERBRECHT, 1996). Os fungos mais implicados nas infecções neste grupo de pacientes pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Acremonium*, *Fusarium* e ao grupo dos dermatófitos (LOEFFLER; STEVENS, 2003; PEREA; PATTERSON, 2002; WHEAT, 1995).

O aumento da incidência de infecções por fungos, juntamente à resistência que estes agentes têm desenvolvido aos antimicóticos, tem levado a uma busca constante por alternativas terapêuticas eficazes que possam oferecer melhores opções de tratamento aos doentes (CARRILLO-MUÑOZ; BRIO; QUINDÓS, 2001; GROLL; WALSH, 2002; ODDS; BROWN; GOW, 2003).

Estudos recentes revelaram que microrganismos, incluindo os fungos, são mais semelhantes aos mamíferos do que se imaginava. Possivelmente como consequência, muitas toxinas naturais que possuem atividade antimicrobiana também são tóxicas às células de mamíferos, o que torna difícil a descoberta de agentes antifúngicos livres de efeitos colaterais (CARDENAS et al., 1999).

A maior parte do sucesso da medicina no último século na prevenção e tratamento de doenças infecciosas é atribuída à introdução de vacinas, antibióticos e melhoria na qualidade da água e condições sanitárias (CARDENAS et al., 1999). No entanto, a lista de substâncias químicas com ação antifúngica é ainda muito restrita ao ser comparada com o número de drogas antibacterianas disponíveis. Como consequência das infecções por fungos representarem o parasitismo de um organismo eucariótico sobre um outro eucariótico (homem e animal), com diferenças fisiológicas muito pequenas, quando comparado a infecções bacterianas, é necessário que as drogas antifúngicas tenham aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais importantes (LACAZ; NEGRO, 1991).

As drogas antifúngicas exercem ações fungistáticas ou fungicidas, direta ou indiretamente. Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e/ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina e nistatina), excetuando-se a fluocitosina e a griseofulvina, que atuam na síntese do ácido nucleico (LACAZ; NEGRO, 1991).

1.4.1 Dermatofitoses

Infecções humanas, particularmente aquelas envolvendo pele e mucosa, constituem um sério problema, especialmente em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento. As dermatofitoses, infecções superficiais cutâneas produzidas por dermatófitos, são um exemplo de enfermidade infecciosa com elevada prevalência na América Latina (LACAZ, 2002).

Os dermatófitos crescem na queratina presente nos pêlos, nas unhas e na camada externa da epiderme. A infecção é transmitida de um indivíduo para outro ou a partir de um animal para o homem por contato direto ou por contato com cabelo infectado e células epidérmicas. Três gêneros de fungos são envolvidos nas micoses cutâneas. O *Trichophyton* pode infectar os cabelos, a pele ou as unhas; o *Microsporum* usualmente envolve somente os cabelos ou pele e o *Epidermophyton* afeta somente a pele e unhas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Quanto à distribuição geográfica, os dermatófitos são ubiqüitários, não havendo área ou grupo de pessoas que se encontrem isoladas destes fungos (PALÁCIO et al., 1999). A variada distribuição etiológica das dermatofitoses pode ser explicada por áreas onde condições geoclimáticas e sociais são extremamente diferenciadas, fatalmente influenciando nas espécies de dermatófitos isolados (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Os dermatófitos apresentam uma predileção ecológica no que diz respeito à sua adaptação ao meio ambiente, podendo ser divididos em 3 grandes grupos, em relação ao seu habitat, sendo classificados como geofílicos, zoofílicos e

antropofílicos (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Os dermatófitos antropofílicos causam micoses apenas no homem, estão entre eles: *Microsporum audouinii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Epidermophyton floccosum*, etc. Entre os dermatófitos zoofílicos, que causam micoses nos animais, a partir dos quais a infecção é transmitida ao homem, podemos citar: *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton equinum*, *Microsporum gallinae*, etc. Os geofílicos são espécies que se encontram no solo, são eles: *Microsporum gypseum*, *Microsporum fulvum*, *Microsporum nanum*, *Microsporum cookei*.

A epidemiologia é importante no controle das dermatofitoses. Os agentes predominantes da *tinea capitis* na América do Norte são o *Trichophyton tonsurans* e o *Microsporum canis*. O *Trichophyton tonsurans* é usualmente adquirido a partir de infecções humanas e vem causando uma epidemia progressiva de 40 anos de duração (BRONSON, 1983). O *Microsporum canis* é usualmente adquirido a partir de gatos e cães infectados (SHAH et al., 1988; SNIDER; LANDERS; LEVY, 1993). Ele é o agente predominante da *tinea capitis* nas áreas rurais e em algumas partes da Europa, do Mediterrâneo Oriental e da América do Sul (ALTERAS et al., 1986, SINSKI; FLOURAS, 1984).

Outras tinhas quando causadas por fungos antropofílicos tendem a estar associadas a adultos e adolescentes, apesar de que infecções em crianças também podem ocorrer (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). O *Trichophyton rubrum*, o *Epidermophyton floccosum* e o *Trichophyton mentagrophytes* antropofílico mostram um padrão comum de associação com a *tinea corporis*, *tinea cruris* e *tinea pedis*. Além disso, o *Trichophyton rubrum* e o *Trichophyton mentagrophytes* estão

associados com a *tinea manuum* e com as onicomicoses (SINSKI; FLOURAS, 1984). Parece que a exposição a estes dermatófitos é uma ocorrência comum (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Os dermatófitos zoofílicos, além da *tinea capitis*, causam mais comumente *tinea corporis* em indivíduos de qualquer faixa etária (SINSKI; FLOURAS, 1984).

Existem vários dermatófitos zoofílicos que ocasionam enfermidades em humanos, sendo o *Microsporum canis* e o *Trichophyton mentagrophytes* os de maior relevância médica por sua freqüência e aspectos clínicos característicos (SEGUNDO et al., 2004). Os dermatófitos zoofílicos constituem importantes agentes de dermatofitoses ou tinhas em humanos no mundo (CABAÑES, 2000).

Os dermatófitos zoofílicos e geofílicos em geral tendem a formar lesões que são mais inflamatórias que aquelas formadas por dermatófitos antropofílicos, mas que também tendem a uma cura espontânea mais facilmente (RIPON, 1988 apud WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). Este padrão é visto na *tinea capitis* causada por *Microsporum canis* (RIPON, 1988 apud WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Estima-se que 10 a 15% da população humana poderá ser infectada por estes microrganismos no decorrer de sua vida (RUBIO et al., 1999). Estudos epidemiológicos indicam que as dermatofitoses estão entre as doenças mais comuns do mundo, sendo consideradas o terceiro distúrbio de pele mais freqüente em crianças menores de 12 anos e o segundo em população adulta (GREER, 1994).

Vários motivos são aventados para explicar o aumento da incidência destas infecções nas últimas décadas, entre eles: o uso abusivo de antibióticos, drogas imunossupressoras e citostáticas, bem como o aparecimento de pacientes com

síndrome da imunodeficiência adquirida, os quais constituem alvo para o desenvolvimento das dermatofitoses (LACAZ, 2002; SIDRIM; MOREIRA, 1999). Aliado a esses fatores, os dermatófitos encontram nas condições de temperatura e umidade do clima tropical, o habitat ideal para sua disseminação.

As drogas tópicas disponíveis sem prescrição para as dermatofitoses incluem o miconazol e o clotrimazol, dentre outras. Um antibiótico oral, a griseofulvina, é freqüentemente útil nestas infecções, pois pode localizar-se no tecido queratinizado. O cetoconazol oral também pode ser prescrito. Quando as unhas estão infectadas, o itraconazol é a droga de escolha (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

As drogas utilizadas no tratamento das dermatofitoses exibem alguns efeitos colaterais e possuem eficácia limitada (CARAZO; LOSADA; SANJUAN, 1999; GUPTA et al., 1998). Por este motivo, existe a necessidade do descobrimento de uma droga antifúngica segura e de maior eficácia.

Nos últimos anos tem sido dada especial atenção aos fungicidas derivados de plantas, baseado no conhecimento de que as plantas possuem sua própria defesa contra fungos. Na presença de patógenos (fungos, bactérias e vírus) as plantas podem produzir compostos para se protegerem contra ataques. O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças de pele incluindo infecções fúngicas é uma prática antiga em muitas regiões do mundo (IROBI; DARAMBOLA, 1993). Este uso tem sido apoiado pelo isolamento de compostos com atividade antifúngica a partir de extratos de plantas (COSTA et al., 2000; PASSOS et al., 2002; SILVA et al., 2001; SOUZA et al., 2002). Pesquisas realizadas com plantas podem levar ao desenvolvimento de novas drogas efetivas contra fungos patogênicos humanos (ALI-SHTAYEH; ABU GHDEIB, 1999; KIM; CHOI; LEE, 2003; NAVARRO GARCIA et al.,

2003; NAVICKIENE et al., 2000; RAJENDRA PRASAD et al., 2004; SOUZA et al., 2003).

1.5 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

A doença inflamatória intestinal (DII) compreende um grupo de doenças idiopáticas do intestino caracterizadas por inflamação crônica do mesmo com períodos de exacerbação e remissão. Os sintomas iniciais são geralmente sangramento retal e diarreia. Suas características patológicas são a presença de ulceração na mucosa e a infiltração de neutrófilos e linfócitos na mesma. Também está presente hiperreatividade visceral (CAMILLERI; FORD, 1998).

As duas principais categorias de DII são a colite ulcerativa e a doença de Crohn, e cada uma delas é clinicamente e histologicamente distinta. O diagnóstico da colite ulcerativa e da doença de Crohn é baseado em características clínicas e achados endoscópicos e histológicos. Distinguir entre colite ulcerativa e doença de Crohn pode ser um desafio, em 10 a 20% dos pacientes não é possível fazer esta identificação (KNIGGE, 2002).

O surgimento da doença costuma ocorrer entre 15 e 25 anos ou entre 55 e 65 anos de idade (KNIGGE, 2002).

A incidência de DII é amplamente variável e depende de múltiplos fatores, incluindo antecedentes étnicos e localização geográfica. Apesar das DII ocorrerem em todo o mundo, a maior incidência é encontrada entre brancos na América do

Norte (KNIGGE, 2002). Desde a Segunda Guerra Mundial, a incidência de DII tem crescido dramaticamente em países em desenvolvimento (THOMPSON et al., 2000). Dados epidemiológicos sugerem que a incidência crescente de DII está associada com o desenvolvimento social, uma vez que fatores ambientais comuns em populações com baixo nível sócio-econômico estão ligados com uma baixa incidência de DII (BACH, 2002). A exposição a condições de higiene precárias na infância, por exemplo, reduz o risco futuro de desenvolvimento da doença de Crohn (GENT et al., 1994).

A etiologia exata das DII continua desconhecida, contudo parecem estar envolvidos fatores genéticos, ambientais e imunológicos. O papel preciso da genética na patogênese das DII ainda não foi bem identificado, mas algumas características da doença são conhecidas, por exemplo, uma história familiar de DII é encontrada em aproximadamente 10% dos pacientes com DII (KNIGGE, 2002).

Agentes infecciosos foram apontados como importantes na patogênese das DII. Pesquisas sugerem que infecções podem atravessar a barreira intestinal e iniciar uma seqüência de eventos que resultem em inflamação (KNIGGE, 2002). Existem ainda evidências que indicam um envolvimento da flora intestinal na resposta inflamatória da mucosa em indivíduos com DII (MARTEAU; SEKSIK; SHANAHAN, 2003). Alguns estudos mostram que a mucosa de pacientes com DII contém um número maior de bactérias quando comparada com a mucosa de indivíduos controle (SCHULTSZ et al., 1999; SWIDSINSKI et al., 2002). O papel deletério de alguns microrganismos presentes na flora intestinal foi estabelecido em modelos animais de DII (BHAN et al., 1999). Contudo, até agora, nenhum microrganismo específico foi diretamente associado com a patogênese desta doença (MARTEAU et al., 2004).

Fatores ambientais que parecem estar envolvidos na patogênese incluem: estresse psicossocial, tabagismo, dieta e drogas como antiinflamatórios não esteróides. Porém, até o momento, nenhum agente infeccioso isolado ou fator ambiental isolado foi identificado (KNIGGE, 2002).

Acredita-se também que a DII seja o resultado de uma resposta inadequada do sistema imune da mucosa intestinal dirigida contra a presença da flora normal presente na luz do intestino. Esta resposta inadequada pode ser facilitada por defeitos tanto na função de barreira do epitélio intestinal quanto no sistema imune da mucosa (KNIGGE, 2002).

Existem muitos estudos que sugerem a hipótese de que a DII possa resultar de um problema de imunorregulação em relação aos antígenos que comumente estão presentes na luz intestinal. No indivíduo normal parece haver um balanço entre os mediadores da inflamação (tanto os pró-inflamatórios quanto as citocinas antiinflamatórias) (KNIGGE, 2002). Nas DII, a tolerância imune à flora endógena pode ser aberrante, havendo um desequilíbrio entre as citocinas pró e antiinflamatórias. Conseqüentemente uma resposta imune inapropriada pode ocorrer e estimular uma inflamação crônica (KNIGGE, 2002).

A doença de Crohn é caracterizada por inflamação transmural envolvendo todas as camadas da parede de qualquer parte do trato gastrintestinal, podendo haver a formação de abscessos e fístulas. Também podem ser atingidos a boca, o esôfago, o apêndice, o reto e o ânus. A doença pode resultar em abscessos severos e recorrentes que freqüentemente resultam em incontinência e problemas psicossociais, além de obstrução intestinal. Dor abdominal, perda de peso e febre são comuns e pode haver diarreia (KNIGGE, 2002).

A apresentação clínica da doença de Crohn é amplamente variada e o nível de atividade flutua em termos de severidade. Os locais mais freqüentemente afetados incluem o intestino delgado (30% dos casos), o íleo em associação ao cólon (40% dos casos), o cólon (25% dos casos), e o estômago em associação ao duodeno (5% dos casos) (HANAUER; SANDBORN, 2001).

O impacto da doença de Crohn no estilo de vida do paciente é considerável. As crianças podem ter comprometimento permanente no desenvolvimento musculoesquelético, pela medicação ou por má nutrição. As perdas causadas pela doença na atividade sexual, no casamento e na vida familiar podem ser devastadoras (KEIGHLEY; STOCKBRUGGER, 2003).

A colite ulcerativa é caracterizada por inflamação crônica da mucosa do cólon. Os locais mais comumente envolvidos são: o reto e a região retosigmóide (30% dos casos), o reto, o sigmóide e o cólon descendente (40% dos casos), e o cólon em toda sua extensão (30% dos casos) (STENSON, 1995 apud KNIGGE, 2002). O grau de atividade da doença é altamente variável. O sangramento retal é o sintoma mais comum. Outros sintomas comuns incluem descargas mucopurulentas pelo reto, urgência fecal, tenesmo (sensação dolorosa na região anal com desejo contínuo de evacuar) e cólicas abdominais (KNIGGE, 2002). O risco de desenvolvimento de câncer de cólon é significativo. O paciente deve ser submetido a colonoscopia a cada três anos após o diagnóstico para acompanhamento da doença (KEIGHLEY; STOCKBRUGGER, 2003).

Estudos realizados em humanos mostraram que pacientes com colite ulcerativa apresentam hiperreatividade visceral mesmo quando a doença encontra-se em período de remissão (RAO et al., 1987).

Uma variedade de manifestações extraintestinais está associada com as DII, podendo preceder ou acompanhar seus sintomas (HANAUER, 1996). Ocasionalmente as alterações extraintestinais dominam o quadro clínico. A causa destas condições é desconhecida, contudo, mecanismos imunológicos parecem estar envolvidos. Alguns tipos de artrite estão associados às DII e representam a manifestação extraintestinal mais comum (KNIGGE, 2002). Outras manifestações extraintestinais são: doenças oculares, anormalidades envolvendo o fígado e os ductos biliares e complicações tromboembólicas (KNIGGE, 2002).

1.5.1 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais

As metas do tratamento incluem alívio dos sintomas e manutenção da remissão da doença e da qualidade de vida.

A primeira classe de medicamentos utilizados no tratamento das DII inclui os aminossalicilatos, corticosteróides, imunomoduladores, antibióticos e agentes biológicos (ONUMA; DAS, 1998).

A sulfassalazina é um antibacteriano, do tipo sulfapiridina, ligado a um salicilato, o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA). O 5-ASA é efetivo no tratamento da DII de leve a moderada e possivelmente na manutenção da remissão da doença (HANAUER, 1996). Estudos sugerem que a eficácia da terapia atual das DII com o 5-ASA está relacionada a sua atividade antioxidante. O 5-ASA é um potente eliminador de espécies reativas de oxigênio (AHNFELT-RONN; NIELSSEN, 1987) e

reduz a peroxidação lipídica na doença de Crohn e na colite ulcerativa (AHNFELT-RONN et al., 1990).

Os corticosteróides são bastante efetivos no tratamento da DII aguda e são também utilizados no tratamento da DII moderada e severa (ONUMA; DAS, 1998). Não existem evidências de que os corticosteróides sejam efetivos na manutenção da remissão da doença (ONUMA; DAS, 1998).

Os imunomoduladores azatioprina e 6-mercaptopurina são efetivos no tratamento das DII. A lógica para o uso de imunomoduladores em pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn origina-se das observações apontando mecanismos imunológicos na patogênese das DII. Estes agentes podem causar toxicidade, como supressão da medula óssea, pancreatite, toxicidade hepática e infecções (ONUMA; DAS, 1998).

Sabe-se que a flora bacteriana desempenha importante papel na patogênese das DII. Antibióticos, como o metronidazol e a ciprofloxacina, são utilizados no tratamento da doença de Crohn com presença de fístulas. O mecanismo de ação dos antibióticos no tratamento das DII ainda não é conhecido, contudo pode envolver a modulação da resposta imune através de suas propriedades antibacterianas (ONUMA; DAS, 1998).

Os produtos de origem biológica representam um dos desenvolvimentos mais recentes no tratamento das DII. Avanços recentes em nossos conhecimentos sobre a patogênese das DII levaram a inúmeras novas terapias voltadas para os aspectos específicos das respostas imunes e os processos inflamatórios ocorridos nas DII, destacando-se o uso do anticorpo anti TNF- α (ONUMA; DAS, 1998).

Em alguns casos, além da terapia medicamentosa, é realizado tratamento cirúrgico. A proctocolectomia é curativa para a colite ulcerativa e elimina o risco de câncer de cólon. Na doença de Crohn a cirurgia é paliativa. Além disso, a doença de Crohn geralmente recorre após a ressecção do segmento do intestino envolvido (KNIGGE, 2002).

Os probióticos também têm sido utilizados no tratamento das DII. Acredita-se que os probióticos combatem os distúrbios na microflora intestinal e reduzem o risco de colonização por bactérias patogênicas (SULLIVAN; NORD, 2002). Muitos estudos clínicos têm sido desenvolvidos sobre a habilidade dos probióticos em prevenir ou tratar infecções gastrintestinais. Os resultados destes estudos sugerem que o *Lactobacillus* GG é uma das espécies mais promissoras na prevenção da diarreia (SULLIVAN; NORD, 2002).

As terapias convencionais utilizadas nas DII nem sempre resultam em sucesso na busca da remissão da sintomatologia ou na prevenção da reincidência desta, e podem causar efeitos colaterais sérios. Por estes motivos cerca de 50% dos pacientes procuram opções alternativas de tratamento (HILSDEN; MEDDINGS; VERHOEF, 1999; HILSDEN; SCOTT; VERHOEF, 1998).

Algumas pesquisas têm sido conduzidas no sentido de investigar produtos naturais que possam ser utilizados no tratamento das DII. O fruto da *Cordia myxa* demonstrou atividade antiinflamatória em modelo de colite induzida por ácido acético em ratos e parte deste efeito foi atribuída a sua atividade antioxidante (AL-AWADI et al., 2001).

A raiz da *Polygala tenuifolia*, uma planta medicinal bastante utilizada na China e no Japão, preveniu a colite induzida por TNB em camundongos (HONG et al., 2002).

O rutosídeo, um flavonóide com propriedade antioxidante, elevou os níveis de glutathiona no cólon de ratos com colite induzida por TNB, além de reduzir a lesão tecidual derivada do estresse oxidativo intestinal (CRUZ et al., 1998).

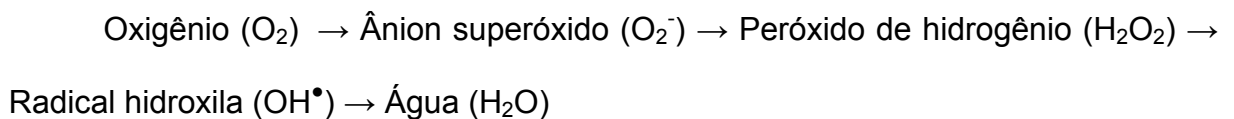
Um estudo realizado em pacientes com colite ulcerativa mostrou que o *Aloe vera* foi capaz de reduzir o dano histológico presente no cólon (LANGMEAD et al., 2004).

Muitos outros estudos utilizando extratos ou constituintes isolados de plantas foram realizados em modelos animais de colite experimental e alguns destes compostos utilizados demonstraram eficácia (AL-AWADI et al., 2001; CRESPO et al., 1999; HONG et al., 2002; ZHOU; MINESHITA, 2000). As pesquisas continuam em busca de extratos e compostos de origem vegetal promissores no tratamento das DII.

1.6 OXIDAÇÃO E ANTIOXIDANTES

O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas.

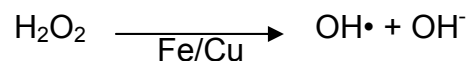
O oxigênio normalmente aceita quatro elétrons e é, então, convertido em água. Porém, a redução parcial de oxigênio ocorre nos sistemas biológicos gerando as espécies reativas de oxigênio (ERO), que são potencialmente lesivas a proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. A redução seqüencial do oxigênio até a formação de água é a seguinte:



O_2^- e OH^\bullet são radicais livres, contudo, o H_2O_2 não. Coletivamente são chamados de ERO.

O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (as primeiras espécies a serem geradas) são compostos relativamente não-danosos por não serem altamente reativos, sendo que o peróxido de hidrogênio é o produto final mais comum dos sistemas geradores das ERO. Porém, na presença de metais de transição, como ferro e cobre, eles são convertidos no radical hidroxila, que é extremamente lesivo por ser capaz de reagir com quase todas as substâncias orgânicas. Esta reação é chamada de oxidação catalisada por metais e está ilustrada a seguir (Reação 1).

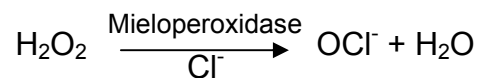
Reação 1:



O peróxido de hidrogênio também pode ser convertido, na presença de cloro, a ácido hipocloroso (HClO) ou hipoclorito (OCl^-) (Reação 2), que são potentes agentes oxidantes e contribuem com o mecanismo de defesa contra os agentes infecciosos, mas que também podem atuar sobre as células do hospedeiro, podendo causar muitos danos em enfermidades inflamatórias (KETTLE; WINTERBOURN,

1994). Esta conversão é realizada pela enzima mieloperoxidase, uma enzima amplamente distribuída no organismo, encontrada no interior de neutrófilos e, em menores concentrações, em monócitos e macrófagos (MATHESON; WONG; TRAVIS, 1981).

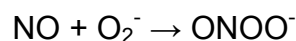
Reação 2:



O aumento da atividade da mieloperoxidase é relatado em vários processos patológicos e está associado com o aumento do estresse oxidativo, como no caso das enfermidades infecciosas, inflamatórias e na lesão por isquemia-reperfusão. Nestes casos se demonstrou um aumento significativo da atividade da mieloperoxidase, em proporção direta ao número de neutrófilos infiltrados no tecido, portanto, se pode utilizar sua atividade como índice de migração leucocitária e de estresse oxidativo (JUNGER et al., 1993; KOMATSU et al., 1992; NALINI; MATHAN; BALASUBRAMANIAN, 1993; VENGE, 1994).

O ânion superóxido pode reagir com o óxido nítrico (NO) (Reação 3), dando origem ao peroxinitrito, que é capaz de modificar resíduos de aminoácidos.

Reação 3:



A oxidação mediada pelas ERO de alguns resíduos de aminoácidos como a lisina, arginina e prolina, leva à formação de grupos carbonil (AMICI; LEVINE; STADTMAN, 1989; UCHIDA; KATO; KAWAKISHI, 1990). A oxidação de proteínas (medida pela formação dos grupos carbonil) está associada a situações de estresse

oxidativo, como isquemia-reperfusão (AYENE; AL-MEDI; FISHER, 1993; OLIVER et al., 1990). A peroxidação lipídica das membranas celulares e lipídios plasmáticos induz também a formação de grupos carbonil reativos como malonaldeído. Portanto, os métodos de dosagem da molécula malonaldeído são parâmetros para medir a peroxidação lipídica dos sistemas biológicos.

Alguns estudos apóiam fortemente a hipótese de que os oxidantes são importantes na produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) (KONO et al., 2000; WHEELER et al., 2001).

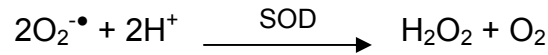
A geração de ERO é um processo normal na vida de organismos aeróbicos. Fatores ambientais podem aumentar a atividade dos sistemas geradores de ERO, como irradiação (raios-x, raios- γ , luz ultravioleta) e poluentes na atmosfera (ozônio, óxido nitroso- N_2O_2 , dióxido de nitrogênio- NO_2 , fumaça de cigarro). Sob condições fisiológicas, estas espécies deletérias são em sua maioria removidas pelo sistema antioxidante celular (BANERJEE et al., 2003).

O estado oxidativo é controlado, portanto, por antioxidantes endógenos que compõem nosso sistema de defesa antioxidante fisiológico, como a glutathiona reduzida (GSH) e as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e catalase, dentre outras, e por um amplo espectro de antioxidantes exógenos presentes na dieta como vitamina A, C e E (GUTTERIDGE, 1995; KAYATEKIN et al., 2002). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986).

A SOD nos sistemas eucariontes existe de duas formas, a forma SOD-cobre-zinco, presente principalmente no citosol, e a SOD-manganês, localizada

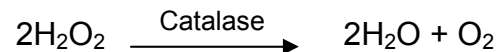
primariamente na mitocôndria. Esta enzima catalisa a dismutação do superóxido para formar H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (Reação 4).

Reação 4:



A catalase é uma enzima presente em células de plantas, animais e bactérias aeróbicas. Ela promove a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Reação 5) (HALLIWELL, 1988). A catalase é localizada em organelas chamadas peroxissomas. Os peroxissomas das células animais estão envolvidos na oxidação de ácidos graxos e na síntese de colesterol e ácidos biliares. O peróxido de hidrogênio é um produto da oxidação dos ácidos graxos. Portanto, a catalase previne possíveis danos causados pelo peróxido de hidrogênio à célula.

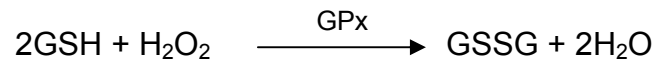
Reação 5:



A GSH é formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato. Ela está presente na maioria das células e é o componente principal do estoque endógeno de grupos sulfidrílicos não protéicos (SH-NP) no nosso organismo (BOYD; SASAME; BOYD, 1979 apud MEISTER; ANDERSON, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento sulfidrílico ($-\text{SH}$), presente na cisteína. Em estudos anteriores foi demonstrado que radicais livres citotóxicos e níveis baixos de compostos sulfidrílicos estão associados com danos teciduais gástricos (MILLER et al., 1985; PARMAR; TARIA; AGEEL, 1988).

A GPx catalisa a redução do H_2O_2 a água as custas da conversão da GSH a glutationa oxidada (GSSG) (Reação 6) (BENZI, 1993). Após a exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre, portanto, sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH a partir da GSSG é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT; MC LEAN, 1990). A GR depende da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH).

Reação 6:



O equilíbrio entre a geração de radicais livres e a atividade antioxidante é crítico na patogênese de muitas doenças. Radicais de oxigênio têm sido apontados como mediadores de uma variedade de eventos patológicos, como câncer, aterosclerose, diabetes, doença hepática, isquemia e no processo de envelhecimento (OMAR; MCCORD; DOWNEY, 1991; SPATZ, 1992).

1.6.1 Espécies reativas de oxigênio e as doenças inflamatórias intestinais

Nas doenças inflamatórias intestinais, ERO (como superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso) são produzidas em excesso pela mucosa inflamada (BABBS, 1992; GRISHAM, 1994; SIMMONDS et al., 1992). As fontes predominantes de ERO na mucosa inflamada são provavelmente leucócitos ativados (REPINE et al., 1979) e episódios de isquemia-reperfusão

(GRISHAM; GRANGER, 1988). O aumento no metabolismo do ácido araquidônico (HAWKEY; RAMPTON, 1985) também pode levar a um excesso nesta produção.

O estresse oxidativo resultante pode ultrapassar as defesas antioxidantes endógenas que regulam a produção de ERO durante o metabolismo normal, particularmente se existir no local baixo nível de antioxidantes endógenos, como é o caso da mucosa do cólon (GRISHAM; MACDERMOTT; DEITCH, 1990).

Pacientes com colite manifestam elevada produção gastrintestinal de uma variedade de citocinas e mediadores inflamatórios (PODOLSKY, 1991). Estudos anteriores revelaram que a produção de ERO tanto na colite ulcerativa (SIMMONDS et al., 1992) quanto na colite induzida por ácido acético (KESHAVARZIAN et al., 1990; KESHAVARZIAN et al., 1992) é significativamente mediada por neutrófilos.

As ERO são apontadas como mediadoras do dano à mucosa. Tem sido proposto que a excessiva produção de ERO pela mucosa inflamada contribui significativamente para o desenvolvimento da lesão tecidual na colite ulcerativa (BABBS, 1992). Compostos com atividade antioxidante devem ser investigados quanto ao seu efeito benéfico nas doenças inflamatórias intestinais.

Vários modelos animais de inflamação intestinal têm sido estabelecidos e a colite induzida por ácido acético é um dos modelos de doença inflamatória intestinal mais utilizados (MACPHERSON; PFEIFFER, 1978; NOA et al., 2000; SHARON; STENSON, 1985).

O NO é um radical livre com atividade moderada em relação a outras espécies. Ele é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintase (NOS). Existem duas isoformas

(neuronal e endotelial) chamadas de óxido nítrico sintase constitutiva (NOSc) e uma terceira isoforma que pode ser induzida por certas citocinas, micróbios e produtos de bactérias, chamada de óxido nítrico sintase induzida (NOSi) (KNOWLES; MONCADA, 1994).

Muitos estudos em modelos de inflamação intestinal demonstraram um aumento na atividade da enzima NOSi e na produção de NO (KANKURI et al., 1999; MIAMPAMBA; SHARKEY, 1999; RACHMILEWITZ et al., 1993; RIBBONS et al., 1995; YAMADA et al., 1993). Outros estudos têm comprovado o envolvimento do NO na patogênese das DII. Estes estudos confirmaram o aumento na produção de NO, assim com na expressão de NOSi na mucosa intestinal de indivíduos com DII ativa (DIJKSTRA et al., 1998; KIMURA et al., 1998; RACHMILEWITZ et al., 1998; SINGER et al., 1996). A expressão de NOSi também é intensa no epitélio do cólon inflamado na colite ulcerativa e na doença de Crohn (KIMURA et al., 1998; SINGER et al., 1996).

Nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) são metabólitos estáveis do NO e a determinação destes produtos nos fluidos biológicos tem sido utilizada para estimar a produção de NO em muitos modelos experimentais, inclusive de inflamação intestinal.

O aumento da liberação de NO pela indução da NOSi no cólon pode contribuir diretamente para o dano à mucosa causado por uma variedade de mecanismos incluindo a inibição da síntese de DNA e a inibição da função mitocondrial (DRAPIER; HIBBS, 1986; KWON; STUEHR; NATHAN, 1991). Contudo, o mecanismo de dano ainda não está claro, pois outro estudo utilizando um modelo experimental de colite crônica induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNB) em

ratos (PFEIFFER; QIU, 1995), mostrou resultados que demonstraram que a inibição da síntese de NO aumenta o dano à mucosa. Estes achados sugerem que deve existir um equilíbrio entre os efeitos citotóxicos e protetores do NO. É possível que pequenas quantidades de NO produzidas nas células epiteliais do cólon pela NOS_c preserve a integridade do intestino, enquanto grandes quantidades de NO produzidas como resultado da indução da NOS_i exerça um efeito pró-inflamatório causando injúria ao tecido (KOLIOS; PETOUMENOS; NAKOS, 1998).

1.7 DISTÚRBIOS DA FUNÇÃO GASTRINTESTINAL

O termo “distúrbios da função gastrointestinal” (DFG) é utilizado para definir algumas combinações variáveis de sintomas gastrointestinais crônicos e recorrentes que não possuem patofisiologia identificada.

Nestes últimos anos, tem surgido um interesse crescente na complexidade dos DFG. Estes distúrbios representam um espectro de condições que podem afetar qualquer parte do trato gastrointestinal e acompanham irregularidade na função e na sensação visceral aferente, além de possuírem uma associação forte com fatores emocionais e estresse (HUNT; TOUGAS, 2002).

Na ausência de qualquer alteração objetiva, a identificação e classificação dos DFG são feitas tendo como base os sintomas. A classificação mais utilizada é baseada no Consenso de Roma II, publicado em 1999, que classificou 24 DFG divididos em 6 subcategorias de acordo com regiões anatômicas. São eles: esofágicos, gastroduodenais, intestinais, biliares, anorretais e de dor abdominal.

Os DFG e doenças orgânicas podem coexistir ou um DFG pode persistir após a cura de uma doença orgânica.

Observações clínicas sugerem que os DFG tendem a ocorrer em famílias (CORAZZIARI, 2004).

A literatura indica a incidência significativa de DFG em todo o mundo. Os tipos que ocorrem mais freqüentemente e que são mais investigados são a síndrome do intestino irritável (SII), a dispepsia, a constipação e os distúrbios esofágicos (CORAZZIARI, 2004).

A SII é o distúrbio da função gastrointestinal mais comum, tem uma incidência na faixa de 5-25% e é responsável por 36% de todas as visitas aos gastroenterologistas (CHANG, 2004). Tem sido sugerido que a SII é uma desordem caracterizada por disfunção na atividade motora do trato gastrointestinal, na sensação visceral e/ou no processamento de informações pelo sistema nervoso central (SNC) (HEITKEMPER; JARRETT, 2000), onde está presente dor abdominal associada à constipação ou diarreia (HEITKEMPER; JARRETT, 2002). Muitos destes pacientes culpam a gastroenterite aguda ou a disenteria por todos os seus sintomas intestinais, e tem sido mostrado que as infecções intestinais desempenham um papel importante na patogênese da SII (SPILLER, 2003; WANG; FANG; PAN, 2002).

Si et al. (2004) verificaram, em um estudo utilizando 25 pacientes com SII, que o número de enterobactérias presentes nas fezes destes pacientes encontrava-se significativamente aumentado em comparação com amostras de fezes de indivíduos saudáveis. Outros estudos mostraram que de 4 a 32% dos pacientes com gastroenterite infecciosa desenvolvem a SII (GWEE et al., 1996; NEAL; BARKER; SPILLER, 2002; RODRIGUEZ; RUIGOMEZ, 1999). O mecanismo preciso deste tipo

de SII não é conhecido, contudo existem algumas possibilidades: o processo infeccioso pode causar lesão no sistema nervoso entérico; o processo infeccioso agudo pode afetar o número de linfócitos T no trato intestinal e/ou alterar sua função; a exposição a agentes infecciosos pode induzir um estado crônico de inflamação ou levar a alterações transitórias ou permanentes na motilidade gastrintestinal e na reatividade visceral; ou uma destruição tecidual local pode ocorrer com a liberação de mediadores químicos, alterando desta forma a função gastrintestinal (LACY; LEE, 2005).

Ao nível molecular, dois estudos demonstraram recentemente que existem anormalidades no sistema de recaptção da 5-HT em pacientes com SII (CAMILLERI et al., 2002; COATES et al., 2004). O trato gastrintestinal contém aproximadamente 90% a 95% do conteúdo de 5-HT presente no corpo humano, a maior parte localizada nas células enterocromafins revestindo a parede intestinal. A 5-HT age através de uma variedade de subtipos diferentes de receptores no intestino incluindo os receptores 5-HT₃ e 5-HT₄. A 5-HT é um neurotransmissor vital para a função gastrintestinal. Estudos têm mostrado que a 5-HT desempenha um papel importante na motilidade gastrintestinal, na reatividade visceral, na função imune gastrintestinal e no fluxo sangüíneo (LACY; LEE, 2005). Um outro estudo mostrou que as células enterocromafins podem estar em maior número nos pacientes com SII liberando quantidades anormais de 5-HT e desta forma alterando o peristaltismo e a reatividade visceral (SPILLER et al., 2000).

Outros estudos demonstraram que existem diferenças na forma de percepção do estímulo visceral pelo SNC nos pacientes com SII em comparação com voluntários saudáveis (SILVERMAN et al., 1997), sugerindo que os pacientes com SII processam a informação sensorial do trato gastrintestinal de forma diferente dos

indivíduos saudáveis. Muitos destes estudos demonstraram elevada reatividade visceral na SII (BERMAN et al., 2002; HU; TALLEY, 1996). Este aumento na reatividade visceral pode explicar o papel de substâncias específicas da dieta sobre os sintomas da SII. A intolerância à frutose e à lactose, por exemplo, é associada a uma produção elevada de gases e pode subseqüentemente deflagrar um desconforto abdominal secundário à distensão no lúmen intestinal.

Além destas evidências, pacientes com SII freqüentemente relatam que outros membros da família apresentam sintomas similares. Isto levanta o questionamento se a SII desenvolve-se em resposta a fatores genéticos ou em resposta a fatores ambientais (LACY; LEE, 2005).

Infelizmente, uma vez que a exata etiologia da SII permanece desconhecida, o tratamento é direcionado para o alívio dos sintomas.

Não apenas os pacientes com SII, mas muitos dos pacientes com DFG, independentemente da categoria de seus sintomas, apresentam hiperreatividade visceral (MEARIN et al., 1991; RICHTER; BARISH; CASTELL, 1986; VERNE; ROBINSON; PRICE, 2001), que pode ser interpretada como um transtorno na forma com que o SNC modula o sinal visceral aferente (MAYER; RAYBOULD, 1990).

Muitos pacientes apresentam dois ou mais DFG. A dispepsia funcional (dor ou desconforto na região epigástrica) está freqüentemente associada com distúrbios da função do intestino. A SII, por exemplo, está presente em 23-50% dos pacientes com dispepsia (AGREUS et al., 1995; CREAN et al., 1994; TALLEY et al., 1992; TALLEY et al., 1993).

Alguns estudos demonstraram redução na qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes com DFG. De acordo com estes estudos, em pacientes com SII, a qualidade de vida relacionada à saúde é menor que em pacientes com asma (FRANK et al., 2002) e semelhante àquela de pacientes com outras doenças crônicas, como *diabetes mellitus* ou doença renal em seu último estágio (GRALNEK et al., 2000).

1.7.1 Tratamento dos distúrbios da função gastrointestinal

O tratamento dos DFG visa o alívio dos sintomas como a diarreia ou constipação, náusea e dor abdominal.

Agentes que estimulam o trânsito gastrointestinal são utilizados nos casos de constipação. A 5-HT, por exemplo, é um importante mediador do trato gastrointestinal, onde sua farmacologia é complexa uma vez que ela atua em uma variedade de receptores. Alguns subtipos de receptores 5-HT parecem estar envolvidos na transmissão de sinais nociceptivos das vísceras ao cérebro. Agonistas e antagonistas atuando numa variedade de receptores 5-HT podem modular alguns eventos fisiológicos importantes envolvendo motilidade, secreção e mecanismos sensoriais (HUNT; TOUGAS, 2002).

Agonistas seletivos dos receptores 5-HT₄, por exemplo, aceleram o trânsito do intestino delgado e grosso em pacientes com SII com sintomas de constipação, e também existem relatos de que possuem propriedade antinociceptiva em alguns

modelos animais (HUNT; TOUGAS, 2002). Antagonistas dos receptores 5-HT₃ são efetivos no tratamento da hiperreatividade visceral e da diarreia.

Agonistas opióides são utilizados para inibir a dor através de sua ação nos receptores opióides no cérebro, na medula espinhal e na periferia.

Antagonistas colinérgicos não-seletivos são utilizados para reduzir a motilidade intestinal e a dor associada a esta.

A loperamida é utilizada para reduzir o trânsito intestinal em pacientes com diarreia. Drogas antidiarréicas são bastante utilizadas no controle da diarreia, contudo apresentam pouco efeito sobre a dor abdominal (HUNT; TOUGAS, 2002).

Os antidepressivos representam outra categoria de drogas utilizadas no tratamento dos DFG, em especial da SII. Acredita-se que estes agentes atuem reduzindo a hiperreatividade visceral ao nível das fibras viscerais aferentes. Os antidepressivos tricíclicos têm sido bastante utilizados em doses menores que aquelas utilizadas no tratamento da depressão por sua eficácia no controle da dor crônica (HUNT; TOUGAS, 2002).

Os papeis da substância P e das neurocininas A e B na nocicepção têm sido bastante estudados (PERNOW, 1983). A substância P está envolvida em doenças inflamatórias. Ela ativa a liberação de citocinas, por macrófagos, por exemplo, que por sua vez podem atuar em terminais nervosos sensoriais (PAYAN, 1989). Um aumento da expressão de receptores de substância P e neurocininas foi observado na medula espinhal de animais em modelos experimentais de estados hiperalgésicos (KRAUSE; DIMAGGIO; MCCARSON, 1995).

Os DFG, assim como as DII, são duas condições idiopáticas onde a alteração na microflora normal tem sido apontada como responsável pelo aparecimento da doença. Estas são duas áreas onde a utilização dos probióticos tem sido considerada promissora (SULLIVAN; NORD, 2005).

Outros estudos vêm sendo desenvolvidos com o propósito de descobrir novos tratamentos para os sintomas dos DFG.

Pouco é sabido sobre o uso da fitoterapia no tratamento dos DFG. O óleo de *Mentha piperita* e o óleo de alcaravia (*Carum carvi*) são freqüentemente utilizados para o alívio do desconforto e dor abdominal. Ambos reduzem o trânsito intestinal (GOERG; SPILKER, 2003). O óleo de pimenta é utilizado por muitos pacientes com SII para a redução da dor abdominal, apesar de estudos não confirmarem esta ação (PITTLER; ERNST, 1998). Um estudo com pacientes com SII tratados com formulações padrões da fitoterapia chinesa, utilizando 20 diferentes plantas, obteve melhora dos sintomas em relação aos pacientes tratados com placebo (BENSOUSSAN et al., 1998). Uma preparação Ayurvédica de duas diferentes plantas também demonstrou ser melhor que o tratamento com placebo em pacientes com SII e diarreia (YADAV et al., 1989).

O gengibre e a *Aloe vera* são bastante utilizados pelos pacientes com DFG, contudo não existem estudos que comprovem sua eficácia (LACY; LEE, 2005).

1.8 LESÃO TECIDUAL POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

A injúria por isquemia-reperfusão faz parte da patofisiologia do infarto do miocárdio, da isquemia cerebral, do choque hemorrágico e das complicações dos transplantes de órgãos, dentre outros. A interrupção do suprimento sanguíneo resulta em isquemia, que rapidamente causa lesão em tecidos metabolicamente ativos. Paradoxalmente, a restauração do fluxo sanguíneo inicia uma série de eventos que podem aumentar a lesão tecidual (ANAYA-PRADO et al., 2002).

Vários fatores contribuem para o mecanismo da injúria por isquemia-reperfusão. As ERO desempenham um papel importante na patogênese desta lesão.

O endotélio, depois de ter sofrido isquemia, é a principal fonte de radical superóxido (WINK; MITCHELL, 1998) na injúria por isquemia-reperfusão. Durante a isquemia o rendimento da cadeia respiratória mitocondrial é muito baixo, havendo baixa produção de ATP. A hipóxia persistente induz uma crise energética na bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ da membrana, com entrada de sódio e cálcio na célula, o que aumenta a pressão osmótica e o edema intracelular. O cálcio intracelular ativa a fosfolipase A_2 , enzima esta que converte a xantina-desidrogenase em xantina-oxidase (nas células endoteliais), fonte de ânions superóxido. A hipoxantina é o primeiro substrato para a oxidação pela xantina-oxidase, o que ocorre quando o segundo substrato, o oxigênio, é fornecido na reperfusão, formando as ERO. Além disso, a hipoxantina é acumulada à medida que os estoques de ATP são depletados na isquemia (BULKLEY, 1987). De forma indireta, o superóxido produzido pode ser responsável pela produção do radical hidroxila.

Durante condições normais os efeitos deletérios do superóxido são prevenidos pela SOD, que converte o superóxido em peróxido de hidrogênio (GRANGER, 1988). Contudo, durante a reperfusão de tecidos que sofreram isquemia esta defesa natural é sobrepujada e o peróxido de hidrogênio é convertido em radical hidroxila que por sua vez é capaz de danificar uma ampla variedade de moléculas biológicas incluindo aminoácidos, proteínas transportadoras de membrana, enzimas e ácidos nucléicos (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000).

O endotélio também é uma fonte importante de NO, um conhecido mediador/protetor da injúria causada pela isquemia-reperfusão tecidual. Alguns dos efeitos protetores do NO são a regulação fisiológica do tônus vascular, a inibição da agregação plaquetária, a atenuação da aderência dos leucócitos ao endotélio, a manutenção da permeabilidade vascular normal, a defesa imune e a estimulação da regeneração das células endoteliais (GUO et al., 1996). A isquemia-reperfusão resulta em disfunção severa do endotélio afetado caracterizada por uma redução na liberação de NO. Possivelmente devido à redução nos níveis de NOS (KANWAR et al., 1994). Imediatamente no início da reperfusão existe uma grande produção de oxidantes e uma redução nos níveis de NO. Assim, a vasodilatação mediada pelo NO deve ser reduzida (MA et al., 1993), o que pode contribuir para o fenômeno de ausência de refluxo que acompanha a isquemia-reperfusão.

A reperfusão também pode resultar em inibição da atividade da SOD e da catalase endógenas. Além disso, na ausência de NO, o superóxido produzido imediatamente após a reperfusão sofre dismutação espontânea e forma H_2O_2 . Este por sua vez pode promover a ativação da fosfolipase A_2 e resultar na geração de mediadores inflamatórios (ANAYA-PRADO et al., 2002).

Na injúria por isquemia-reperfusão também existe um acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (GRISHAM; HERNANDES; GRANDER, 1986), pois alguns mediadores liberados durante a isquemia-reperfusão exercem ação quimiotática. Estas substâncias incluem algumas citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , fator ativador de plaquetas (PAF) e leucotrienos liberados pelo endotélio após a isquemia. A estimulação destas células é acompanhada pela liberação de fosfolipase A₂ (GODFREY et al., 1987), PAF (WALLACE; WHITTLE, 1988) e ERO (FANTONE; WARD, 1982). A adesão de leucócitos ao endotélio é significativamente aumentada minutos após o início da reperfusão e permanece elevada por horas (HARRIS et al., 1996).

As etapas bioquímicas precisas que correlacionam a geração de radicais livres com a secreção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais ainda não estão bem estabelecidas. Contudo, está claro que o NO influencia a síntese de substâncias pró-inflamatórias e pode exercer seus efeitos por meio de fatores de transcrição. Um destes fatores é o fator nuclear-capa B (NF- κ B), que regula a expressão de vários genes envolvidos no processo inflamatório da isquemia-reperfusão. O NF- κ B induz a rápida expressão de TNF- α e β , algumas interleucinas, quimiocinas, enzimas (NOSi, ciclooxigenase) e moléculas de adesão (BARNES, 1997; BLACKWELL; CHRISTMAN, 1997). Parece que a reoxigenação age como estímulo para o NF- κ B. Alguns estudos sugerem que o NO inibe a ativação do NF- κ B, portanto, a redução na produção de NO que ocorre logo após a isquemia-reperfusão promove a síntese destas proteínas pró-inflamatórias (ANAYA-PRADO et al., 2002).

O intestino delgado é bastante sensível à injúria por isquemia-reperfusão, a qual é uma séria condição clínica com elevada mortalidade e morbidade. A

isquemia-reperfusão intestinal dispara uma resposta inflamatória complexa que inclui ativação do sistema complemento, agregação e marginação de neutrófilos polimorfonucleares e liberação de uma variedade de radicais livres derivados de oxigênio, que são responsáveis pela injúria tecidual (BALOGH et al., 2002; GRISHAM; HERNANDEZ; GRANGER, 1986; SCHWARZ et al., 1999; SIMPSON et al., 1993).

Os eventos moleculares que ocorrem durante a injúria da isquemia-reperfusão intestinal incluem dano a aminoácidos, proteínas transportadoras de membrana e ácidos nucleicos levando a lesões na mucosa, alteração na função intestinal e uma elevada absorção de bactérias e endotoxinas dando lugar a uma resposta inflamatória sistêmica (HALLIWELL; ZHAO; WHITEMAN, 2000).

Estudos realizados anteriormente demonstraram a eficácia de algumas plantas que possuem atividade antioxidante e antiinflamatória, como a *Ginkgo biloba*, a *Copaifera langsdorffii* e a *Artemisia vulgaris*, na atenuação da injúria à mucosa intestinal associada à isquemia-reperfusão (PAIVA et al., 2004; PEHLIVAN et al., 2002; TIGNO; GUMILA, 2000).

1.9 DOR VISCERAL

A dor abdominal crônica é uma das razões mais freqüentes de consulta nos serviços de clínica geral e gastroenterológica (KRAYCHETE; GUIMARAES, 2003).

A dor visceral é causada por alterações internas de órgãos ocos e cápsula de vísceras sólidas, tais como o estômago, rim, bexiga, vesícula biliar, cápsula hepática e intestinos, entre outros. Os principais fatores que estimulam as fibras nociceptivas viscerais são: estiramento (tensão) na parede muscular das vísceras ocas e cápsula das vísceras sólidas (anormalidades motoras intestinais que geram pressões intraluminais exageradas são causas comuns), processo inflamatório (colites, pancreatite, entre outras), isquemia e neoplasias (KRAYCHETE; GUIMARAES, 2003).

A dor visceral possui cinco características principais: (1) não é evocada por todas as vísceras (órgãos sólidos como fígado e parênquima pulmonar não são sensíveis à dor); (2) não está sempre associada à lesão visceral (um estímulo de baixo limiar pode provocar ativação de neurônios aferentes da víscera, como a pressão gasosa intraluminal); (3) é difusa e pobremente localizada devido à organização das vias nociceptivas viscerais no SNC, que ascendem conjuntamente com as de origem somática; (4) é referida em outros locais, provavelmente pela convergência das fibras nervosas viscerais e somáticas ao se conectarem no corno dorsal da medula espinhal e (5) é acompanhada de reflexos autonômicos e motores (CERVEJO; LAIRD, 1999).

Os neurônios aferentes que percebem a sensação dolorosa são os “nociceptores”. Eles podem ser de dois tipos diferentes, um que possui condução lenta com axônios amielinizados (fibras C) e outro com axônios mielinizados (fibras A δ). Os corpos destes neurônios nociceptivos aferentes somáticos e viscerais encontram-se localizados no gânglio da raiz dorsal da medula. Os estímulos nociceptivos são propagados através destas fibras primárias para neurônios no corno dorsal da medula espinhal. Após a integração na medula espinhal, a

informação nociceptiva é transmitida a estruturas talâmicas antes de atingir o córtex. Cada um destes níveis centrais possui mecanismos modulatórios.

Os receptores mecânicos ou mecanorreceptores existentes na musculatura lisa de todas as vísceras ocas são do tipo A δ e C, e respondem a estímulos mecânicos leves, tensão aplicada ao peritônio, contração e distensão da musculatura lisa (KRAYCHETE; GUIMARAES, 2003).

Na presença de inflamação, os nociceptores adquirem novas características ficando “sensibilizados”. Eles começam a disparar estímulos espontaneamente e seu limiar de ativação fica reduzido. Esta sensibilização pode ser produzida por: alterações físicas como pressão decorrente da formação de edema; alterações químicas como a síntese/liberação de prostaglandinas, 5-HT, bradicinina e aminoácidos excitatórios; e pela participação de citocinas.

As estimulações viscerais, tais como hipóxia e inflamação tecidual, resultam em sensibilização de receptores de alto limiar e de nociceptores “silenciosos” previamente não-responsivos os quais perfazem 40% a 45% da inervação visceral aferente do cólon. Estes nociceptores estão envolvidos na percepção da dor visceral crônica. A sensibilização desses receptores persiste mesmo após a cessação do estímulo nociceptivo, traduzida por alterações das funções motora e sensitiva (hiperalgesia visceral) (BUENO; FIORAMONT; GARCIA-VILLAR, 2000; CERVEJO, 2000; GEBHART, 2000).

Existe uma grande quantidade de mediadores periféricos (bradicinina, citocinas, prostaglandinas, 5-HT, ATP, prótons H⁺) que agem diretamente nos receptores nociceptivos gastrintestinais e iniciam a transmissão dolorosa. Na sensibilização periférica ocorre redução do limiar à despolarização neuronal e

aumento do número ou da amplitude de descarga neuronal, em resposta a certos estímulos químicos ou mecânicos (BUENO; FIORAMONT; GARCIA-VILLAR, 2000; CERVEJO, 2000).

As neurocininas estão presentes no tecido intestinal e mastócitos e são liberadas durante a degranulação mastocitária. Elas podem alterar a distribuição de nociceptores e o limiar de sensibilidade para os estímulos mecânicos e químicos. Em decorrência das fibras C intestinais possuem muitos “receptores silenciosos” para as neurocininas, essas substâncias possuem um papel importante na transmissão das mensagens nociceptivas do intestino (KRAYCHETE; GUIMARAES, 2003).

A sensibilização central é um processo resultante da atividade sustentada que acontece na fibra aferente primária, após a sensibilização periférica, favorecendo a liberação de neurotransmissores excitatórios. Estes aumentam a eficácia da transmissão sináptica entre os neurônios aferentes primários e os do corno dorsal, envolvendo, portanto, receptores pré e pós-sinápticos específicos (KRAYCHETE; GUIMARAES, 2003).

Embora o mecanismo de sensibilização visceral central não seja totalmente conhecido, acredita-se que alguns mediadores como a substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, aspartato, glutamato, neurocininas, somatostatina e peptídeo intestinal vasoativo estejam envolvidos no desenvolvimento e manutenção da sensibilização central induzida pela inflamação. A ação destes neuromediadores em receptores específicos ativa segundos mensageiros para a abertura de canais de cálcio e entrada dessas substâncias para o interior das membranas celulares. Ocorre então produção de outros mediadores

(como NO e metabólitos do ácido araquidônico) que provavelmente alteram a transmissão do potencial de ação e ultra-estrutura dos nervos e suas sinapses, e causam sensibilização medular e fenômeno de *wind up* (aumento da duração da resposta de certos neurônios) (KRAYCHETE; GUIMARAES, 2003).

Capsaicina é o ingrediente de característica picante encontrado em algumas pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*. Os receptores sensíveis à capsaicina, receptores vanilóides do tipo 1 (VR1), encontram-se em neurônios sensoriais. Esta substância tem sido bastante utilizada em estudos envolvendo dor por agir especificamente nas fibras primárias aferentes dos tipos C e A δ . Quando ativados estes neurônios evocam a sensação de dor em queimação e liberam neuropeptídeos que induzem a inflamação neurogênica. Por outro lado, com a aplicação de grandes doses de capsaicina a animais adultos ou neonatos ocorre a dessensibilização e desnervação dos neurônios aferentes primários (HOLZER, 1991).

Os VR1 são canais catiônicos não seletivos. A principal característica dos VR1 é sua grande permeabilidade aos íons cálcio (CATERINA et al., 1997). A capsaicina atua nos neurônios sensoriais induzindo o influxo de cátions, particularmente cálcio e sódio (BEVAN; SZOLCSANYI, 1990). O influxo, principalmente de íons sódio, despolariza a membrana neuronal levando à geração de um potencial de ação. O influxo de cálcio induzido pela capsaicina para o terminal nervoso através dos VR1 e canais de cálcio dependentes de voltagem causa a excitação de neuropeptídeos e aminoácidos excitatórios (BEVAN; SZOLCSANYI, 1990).

O que tornou estes receptores tão interessantes no estudo da dor foi sua sensibilidade a estímulos nocivos de calor ($\sim 43\text{ }^{\circ}\text{C}$), acidose e estímulos químicos, além de sua propriedade de tornar-se sensível a mediadores inflamatórios e algésicos. Tais receptores comportam-se, portanto, como nociceptores polimodais de neurônios aferentes e existem hipóteses de que eles estejam envolvidos na hiperalgesia associada com a inflamação. Portanto, os VR1 são vistos como um alvo importante de novas drogas analgésicas.

Os VR1 estão presentes no trato gastrointestinal onde se encontram associados a axônios de neurônios espinhais aferentes e, em alguma extensão, a nervos vagais aferentes (PATTERSON et al., 2003; SCHICHO et al., 2004; WARD et al., 2003). Através da interação com estes receptores, a capsaicina libera dos neurônios viscerais, por exemplo, peptídeo intestinal vasoativo no cólon humano (RENZI et al., 1991) e substância P na bexiga de cobaias (MAGGI et al., 1988).

Não existe, ainda, um protocolo bem estabelecido para a determinação de estratégias diagnósticas e condutas terapêuticas no paciente com dor abdominal crônica (KRAYCHETE; GUIMARAES, 2003).

1.10 OBJETIVOS

1.10.1 Objetivo geral

Em virtude da escassez de estudos sobre o *Croton urucurana*; do amplo uso popular do látex (*Sangre de Grado*) proveniente de várias espécies de *Croton* no tratamento de inflamações, cólicas intestinais e no combate às infecções, além de outras patologias; e da ausência de estudos que comprovem a atividade do látex do *Croton urucurana* em modelos de inflamação intestinal e dor visceral, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial antiinflamatório e antinociceptivo do mesmo em modelos animais de inflamação intestinal e dor visceral que simulam doenças humanas, como as doenças inflamatórias intestinais e a síndrome do intestino irritável, buscando verificar uma possível utilização terapêutica deste como fitoterápico no tratamento das doenças inflamatórias intestinais e distúrbios da função gastrintestinal.

Além disso, devido à existência de apenas um trabalho avaliando a atividade antibacteriana de um extrato, algumas frações e compostos isolados da casca do tronco do *Croton urucurana*, contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, o presente estudo pretende também avaliar a atividade antimicrobiana do látex desta planta.

1.10.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do látex do *Croton urucurana* contra bactérias e fungos;
- Avaliar o efeito do látex do *Croton urucurana* no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos;
- Avaliar o efeito do látex do *Croton urucurana* no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva visceral do látex do *Croton urucurana* nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, cistite induzida por ciclofosfamida e dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos;
- Avaliar o mecanismo de ação antinociceptiva visceral do látex do *Croton urucurana*;
- Avaliar se o látex do *Croton urucurana* possui atividade depressora sobre o sistema nervoso central, utilizando o modelo de tempo de sono induzido por pentobarbital e os testes do campo aberto e do “rotarod” em camundongos.

2 Materiais

2 MATERIAIS

2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O látex do *Croton urucurana* Baillon (LCU) foi coletado na Fazenda Anael, no município de São Pedro da Cipa, Mato Grosso, Brasil. A identificação da planta foi feita pela Profa. Dra. Aline de Souza Oliveira (Departamento de Botânica/Museu Nacional do Rio de Janeiro) e pelo Prof. Dr. Germano Guarim Neto (Departamento de Botânica e Ecologia/Universidade Federal do Mato Grosso). Uma amostra da planta (excicata nº 21881) foi depositada no Herbário Central da Universidade Federal do Mato Grosso. O LCU (500 mL) foi liofilizado mostrando um rendimento de 205,5 g e no momento de uso foi dissolvido em água destilada. O LCU utilizado para o estudo fitoquímico não foi submetido à liofilização. A dose empregada nos modelos experimentais foi expressa em termos do peso seco do mesmo.

2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss-Webster, adultos, machos, pesando entre 25-30 g, e ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, adultos, machos, pesando entre 150-180 g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central desta Universidade. Os animais foram mantidos

à temperatura de 20-24 °C, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará.

2.3 BACTÉRIAS E FUNGOS UTILIZADOS

As bactérias utilizadas (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) foram obtidas do laboratório de microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal desta universidade.

As leveduras (*Candida* sp., *Trichosporon* sp., *Malassezia* sp.), os fungos filamentosos não-dermatófitos (*Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.) e as cinco espécies de dermatófitos estudadas (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*) foram obtidas da micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica desta universidade.

2.4 EQUIPAMENTOS

Equipamentos	Origem
Agitador - Aquecedor	Fanen 258
Autoclave	Phoenix Equipamentos Científicos
Balança analítica	Marte AL 200
Balança para animais	TI - Filizola
Centrífuga refrigerada	Cientec CT 5500 DR
Espectrofotômetro de infravermelho	Bomem 100
Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear	Varian XL-300
Espectrofotômetro UV-visível	Bayer-RA 50 / Beckman DU640B
Estufa de incubação	Olidef CV
Fluxo laminar	Trox do Brasil Ltda.
Freezer -75°C	Legaci System
Lavadora ultrasônica	Unique USC 700
Leitor de placa Elisa	Packard Spectra Count
Liofilizador	EC - Micromodulyo
Microscópio óptico	Nikon
pHmetro	Alalion-PM 608
Pipetas automáticas	Jencons

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FRAÇÕES ACETONA E AQUOSA DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA*

A análise fitoquímica do LCU foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, em Santa Catarina.

3.1.1 Material vegetal

Foram utilizados 300 mL do LCU em seu estado líquido para o estudo fitoquímico.

3.1.2 Preparação das frações

O LCU (300 mL) foi suspenso em água (80 mL) e extraído com acetona, sendo os compostos solúveis neste solvente denominados de fração acetona, e de fração aquosa para os compostos que não foram solúveis neste solvente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

3.1.3 Análise cromatográfica

As duas frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD), visando uma análise fitoquímica preliminar, utilizando-se sistemas de eluentes e reveladores usuais para “screening” fitoquímico.

3.1.4 Separação e purificação dos compostos

As frações foram submetidas a procedimentos de cromatografia em coluna (CC). Algumas subfrações foram recromatografadas. O eluente mais o produto carregado foram coletados em frascos de aproximadamente 10 mL, numerados seqüencialmente, sendo que cada frasco foi analisado por CCD. Após esta análise do perfil cromatográfico, as subfrações semelhantes foram reunidas formando uma nova subfração, a qual foi submetida a novos procedimentos de CCD/CC quantas vezes necessários, até obtenção dos compostos com bom grau de pureza.

3.1.5 Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados

Os compostos puros ou semipuros foram identificados por métodos espectroscópicos usuais, como Infra-Vermelho e Ressonância Magnética de Próton e Carbono.

3.2 TOXICIDADE SOBRE *ARTEMIA SALINA*

A dose letal do LCU para 50% dos animais (DL_{50}), administrada por via oral, foi anteriormente estabelecida utilizando camundongos. O valor encontrado foi de $5,20 \pm 0,13$ g/kg (GURGEL, 2000). No presente estudo, as doses utilizadas para tratamento com o LCU, definidas após estudos preliminares em laboratório, foram de 200 e 400 mg/kg, correspondendo a 1/26 e 1/13 da DL_{50} , respectivamente. Nas doses utilizadas, os animais tratados não apresentaram sinais de toxicidade ou comportamento anormal. Portanto, consideramos que as doses empregadas são seguras e livres de toxicidade. É importante ressaltar que estas doses são bem diferentes da dose utilizada pela população (5 a 30 gotas de 1 a 3 vezes por dia durante 5 dias). Uma vez que a DL_{50} já havia sido estabelecida, foi dada continuidade ao estudo experimental do LCU utilizando-se o teste de toxicidade sobre *Artemia salina*.

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MACRAE; HUDSON; TOWERS, 1988), parasiticida (SAHPAZ et al., 1994), entre outras. Muitos laboratórios de produtos naturais têm inserido este teste dentro de suas rotinas no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

Para a avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*, foi seguida a metodologia descrita por Meyer et al. (1982). Os ovos de artemia (50 mg) foram colocados para eclodir em um recipiente contendo 1.000 mL de água marinha artificial aerada, durante 48 h. Após as primeiras 24 h, um foco de luz foi colocado

sobre o recipiente para manter a água levemente aquecida. Decorridas as 48 h, as larvas foram coletadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Foram preparados tubos de ensaio (em triplicata) contendo 5 mL de várias concentrações do LCU (1-1.000 µg/mL, em escala logarítmica) dissolvido em água marinha artificial. A cada tubo foram adicionadas dez larvas. O número de larvas mortas em cada tubo foi verificado após 24 h. A concentração letal para 50% das larvas (CL₅₀) com intervalo de confiança de 95% foi determinada para a substância de acordo com o método do Probit (MILLER; TAINTER, 1944 apud GOULART et al., 2005). Tubos controle, não tratados, contendo apenas água marinha (5 mL), e tratados com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) (1-1.000 µg/mL, em escala logarítmica) foram adicionados ao estudo com a finalidade de comparação.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O estudo da atividade antimicrobiana foi realizado no Centro Especializado em Micologia Médica desta universidade.

3.3.1 Atividade antibacteriana *in vitro*

Em 1997, Peres et al. investigaram a atividade antibacteriana do extrato aquoso-etanólico, de quatro frações do extrato metanólico e de substâncias isoladas (catequina e ácido acetil aleuritólico) da casca do tronco do *Croton urucurana* contra

Staphylococcus aureus e *Salmonella typhimurium*. Em seus resultados, eles mostraram que o ácido acetil aleuritólico exibiu melhor atividade, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 0,1 mg/mL, enquanto os outros materiais testados exibiram CIM variando entre 0,8 e 6 mg/mL. Pelo fato de popularmente o LCU ser utilizado em sua forma bruta, forma esta que não foi testada por Peres et al. (1997), e também por não terem sido utilizadas cepas resistentes a antibióticos, resolvemos investigar a atividade do LCU contra cepas de *Staphylococcus aureus*, uma bactéria gram positiva, resistentes e sensíveis a oxacilina e também contra cepas de *Escherichia coli*, uma enterobactéria gram negativa. Para este estudo, utilizamos o método de difusão em poços no ágar (HUFFORD et al., 1975).

Placas de Petri de 25 cm de diâmetro foram preparadas com 25 mL de ágar Batata estéril. Após solidificação, foram produzidos poços de 6 mm de diâmetro no ágar com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. A superfície do ágar foi então inoculada com uma suspensão de culturas de bactérias em solução salina (NaCl 0,9%) em uma concentração equivalente ao grau 0,5 da escala de McFarland. Foram utilizadas 10 cepas de *Staphylococcus aureus*, sendo 5 sensíveis e 5 resistentes à oxacilina, e 10 cepas de *Escherichia coli*.

O LCU foi dissolvido em água destilada para o preparo de soluções nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL. Foram adicionados a cada um dos poços 50 µL de cada uma das soluções. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C, por 24 h. O diâmetro da zona de inibição ao redor dos poços foi registrado após o período de incubação. A presença de zonas de inibição de crescimento ao redor dos poços é considerada, neste modelo, como um indicativo preliminar de atividade antibacteriana.

3.3.2 Atividade antifúngica *in vitro*

Para o estudo da atividade antifúngica do LCU, foi realizado inicialmente um teste preliminar onde tubos de ensaio contendo LCU diluído em ágar Batata em concentrações crescentes (5, 10, 20 e 40 mg/mL) foram inoculados com uma suspensão de fungo em solução salina (NaCl 0,9%) numa concentração equivalente ao grau 0,5 da escala de McFarland. Foram utilizados três gêneros de leveduras (*Candida* sp., *Trichosporon* sp., *Malassezia* sp.), três gêneros de fungos filamentosos não-dermatófitos (*Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.) e um gênero de fungo filamentoso do grupo de fungos dermatófitos (*Microsporum* sp.), sendo testadas duas espécies de cada um dos gêneros. Depois do período de incubação (8 dias para o fungo filamentoso e 24 h para as leveduras), a 25-28 °C, verificamos a presença ou não de crescimento do fungo.

O LCU inibiu o crescimento do *Microsporum* em todas as doses testadas, contudo não inibiu o crescimento dos demais fungos, desta forma direcionamos nosso estudo para a avaliação da atividade antifúngica do LCU contra dermatófitos.

O *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) dos Estados Unidos, em 1982, definiu dois métodos padronizados de susceptibilidade de leveduras e fungos filamentosos, o M27-A e o M38-P, respectivamente. Contudo, o M38-P não menciona testes de susceptibilidade antifúngica de dermatófitos. A avaliação da atividade antifúngica no LCU contra dermatófitos foi realizada de acordo com o método de difusão em discos de papel descrito por Barry et al., em 1979. Foram testadas cinco espécies de dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e

Epidermophyton floccosum), tendo sido utilizados 5 microrganismos isolados de cada espécie.

Placas de Petri, com 15 cm de diâmetro, contendo ágar Batata foram inoculadas em sua superfície com uma suspensão padrão do fungo (grau 0,5 da escala de McFarland) em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. O LCU foi dissolvido em água destilada para obtenção das concentrações teste de 300; 150; 75; 37,5 e 18,75 mg/mL. A griseofulvina foi utilizada como controle positivo e foi dissolvida em dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 0,6 mg/mL. Discos de papel de filtro estéreis, com diâmetro de 5 mm, foram impregnados com 10 µL de cada uma das diferentes soluções, passando cada disco a conter, portanto, 3,0; 1,5; 0,75; 0,375 ou 0,1875 mg de LCU ou 6,0 µg de griseofulvina. Os discos foram então colocados da superfície do ágar de cada uma das placas de Petri. Os discos contendo as cinco diferentes quantidades do LCU a serem testadas foram cuidadosamente posicionados em uma mesma placa (Figura 6). Como controle veículo foi utilizado DMSO (10 µL). O diâmetro da zona de inibição ao redor dos discos foi medido após 8 dias de incubação a 25-28 °C. O valor de cada zona de inibição foi calculado como a média, em mm, de quatro medidas realizadas em diferentes direções com o objetivo de minimizar a possibilidade de erro.

Paralelamente a este experimento foram testadas, utilizando a mesma metodologia, as frações aquosa e acetona do LCU na concentração de 300 mg/mL, ou seja, 3 mg/disco, contra duas cepas de *Trichophyton rubrum* e duas de *Microsporum canis*.

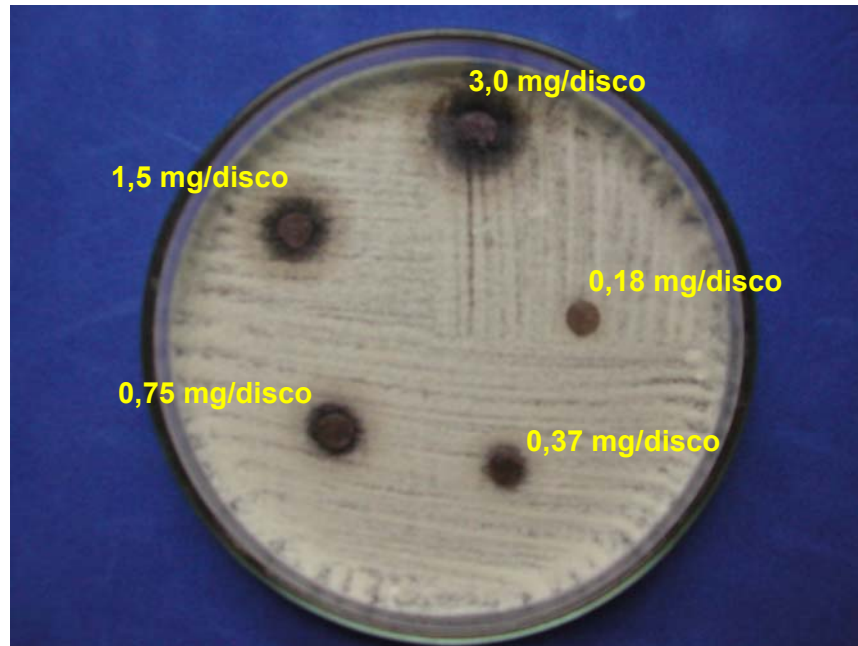


FIGURA 6. Posicionamento dos discos contendo diferentes quantidades do látex do *Croton urucurana* no método de difusão em discos utilizando *Trichophyton mentagrophytes*.

3.3.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima

O método de diluição em tubos foi utilizado para determinar a CIM do LCU frente às espécies estudadas. Diluições em série (SYDNEY; FINEGOLD; ELLEN BARON, 2001) a partir de uma solução estoque de *Croton urucurana* (10 mg/mL, diluído em ágar Sabouraud) foram incorporadas em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de ágar Sabouraud até a obtenção de concentrações de 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 e 0,15625 mg/mL. Todos os tubos receberam 50 µL do inóculo padrão (grau 0,5 da escala de McFarland) de cada organismo. Tubos contendo apenas 0,5 mL do ágar Sabouraud e 50 µL do inóculo foram utilizados como controle veículo. O ágar Sabouraud foi utilizado como controle negativo de crescimento de fungos. Todos os tubos, em duplicata, foram incubados a 25-28 °C, durante 8 dias. A CIM foi definida como a menor concentração do LCU sem crescimento visível após o período de incubação. Foram utilizados cinco microrganismos isolados de cada espécie.

3.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL

3.4.1 Colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos

A colite foi induzida nos animais de acordo com a metodologia descrita por Mascolo et al. (1995). Para a realização do experimento foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando 150-180 g, em jejum sólido de 36 h, recebendo água

glicosada (0,5%) durante o período de jejum. Os animais, distribuídos em grupos de 6 animais cada, foram tratados por via retal com veículo (controle veículo, água destilada, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24 e 2 h antes da administração de ácido acético (4%, 2 mL, via retal). O grupo controle normal foi tratado por via retal com veículo (água destilada, 10 mL/kg) 24 e 2 h antes da administração de mais 2 mL de água destilada por via retal, em substituição ao ácido acético. Para a realização dos tratamentos e a aplicação do ácido acético, os animais foram anestesiados com éter. O ácido acético foi instilado no cólon, a 8 cm do ânus do animal por meio de uma sonda.

Vinte e quatro horas após a administração do ácido acético os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada de 8 cm do cólon a partir do ânus. Foram desprezados os 3 cm proximais ao ânus e o segmento restante (5 cm) foi aberto longitudinalmente, limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e avaliado macroscopicamente para aferição de escores, de acordo com Wallace et al. (1989) (0 = aparência normal; 1 = hiperemia focal sem úlcera; 3 = ulceração com inflamação em um único local; 4 = dois ou mais sítios com discreta ulceração e inflamação; 5 = sítios maiores de injúria e inflamação com extensão de 1-2 cm ao longo do comprimento do cólon; 6-10 = 1 ponto por cada cm adicional de dano ou injúria, além de 2 cm).

Foi avaliado também o peso úmido do tecido que foi expresso em mg/cm do segmento (cólon). Antes da pesagem, o excesso de umidade foi delicadamente retirado com o uso de papel de filtro. Após pesagem, a mucosa do tecido foi raspada com auxílio de uma lâmina e 300 mg desta foram separados para dosagem de mieloperoxidase e 200 mg para dosagem de nitrito e catalase. Uma pequena

amostra de cada um dos segmentos foi fixada em uma solução a 10% de formaldeído tamponado para posterior análise microscópica.

3.4.2 Injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos

Para a indução de injúria intestinal por isquemia-reperfusão mesentérica seguiu-se o método descrito anteriormente por Kimura et al. (1998). Para a realização do experimento, foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando 150-180 g, em jejum sólido de 36 h, recebendo água glicosada (0,5%) durante o período de jejum. Os animais, divididos em grupos de 6 animais cada, foram tratados por via oral com veículo (controle veículo, água destilada, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24, 12 e 2 h antes da indução da isquemia.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.m.) e cloridrato de xilazina (35 mg/kg, i.m.). Foi então realizada laparotomia e clampeada a artéria mesentérica superior por 45 min. Após este período, o clampe foi retirado para que houvesse reperfusão do tecido por uma hora. Um outro grupo foi tratado por via oral com veículo (controle normal, água destilada, 10 mL/kg) 24, 12 e 2 h antes do mesmo procedimento cirúrgico para a indução da isquemia, contudo sem que houvesse o clampeamento da artéria mesentérica. Os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical. O intestino delgado foi retirado, o íleo foi separado e limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada. A mucosa do tecido foi raspada com auxílio de uma lâmina e 300 mg da mesma foram separados para dosagem de mieloperoxidase,

200 mg para dosagem de catalase e nitrito e 500 mg para dosagem da glutathione. Amostras dos tecidos foram fixadas em uma solução a 10% de formaldeído tamponado para posterior análise microscópica.

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase

Para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984), amostras da mucosa intestinal (300 mg) foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0; 1 mL por 50 mg de tecido). O homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento (-70 °C, 5 min) e descongelamento (água a 37 °C). As amostras foram então centrifugadas (4.000 rpm, 15 min, 4 °C) para remover o material insolúvel. A mieloperoxidase contida no sobrenadante (0,1 mL) foi analisada espectrofotometricamente após a adição de 2,9 mL de tampão fosfato (50 mM; pH 6,0) contendo 0,167 mg/mL de hidrocloreto de *o*-dianisidine e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudanças na absorvância a 470 nm foram medidas no tempo 0 e 5 min. A atividade enzimática foi expressa em termos da diferença entre a absorvância obtida no tempo 5 min e no tempo 0 min.

3.5.2 Determinação da atividade da catalase

Para a determinação da atividade da enzima catalase (BEERS; SIZER, 1952 apud IBRAHIM et al., 1997), 200 mg de mucosa intestinal foram tomados e homogeneizados em 2 mL de uma solução gelada de cloreto de potássio (KCl) a 1,15% (homogenato a 10%). O homogenato foi centrifugado por 15 min a 14.000 rpm. Foram misturados em cubeta de quartzo 980 μL do meio [90 mL (100 μL de H_2O_2 em 100 mL de H_2O milli-Q q.s.p.) + 5 mL de tampão Tris [HCL 1 M, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, pH 8,0] + 4 mL de H_2O milli-Q] para a reação com 20 μL do sobrenadante. A reação foi lida durante 6 min em espectrofotômetro a 230 nm em UV. Em seguida foi determinada a concentração de proteínas totais de acordo com o método de Lowry et al. (1951), onde foram preparados tubos de ensaio, contendo 750 μL de H_2O destilada, 5 μL do sobrenadante e 500 μL do reagente C [24 mL do reagente A (Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1 N) para 1 mL do reagente B (0,5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1% de citrato de sódio $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)]. Após repouso por 10 min, foram adicionados 50 μL do reagente D (1 mL do reativo Folin para 1 mL de H_2O destilada) e a solução foi então agitada. A leitura foi realizada 30 min depois em espectrofotômetro a 750 nm em onda visível. O padrão recebeu 50 μL de albumina sérica bovina em substituição ao homogenato.

3.5.3 Dosagem de nitrito

A concentração de nitrito foi medida, sendo um indicador da produção de NO, de acordo com a reação de Griess (CHEN et al., 2000b). Duzentos miligramas de tecido (mucosa intestinal) foram tomados e homogeneizados em 2 mL de uma solução gelada de cloreto de potássio (KCl) a 1,15% (homogenato a 10%). O homogenato foi centrifugado por 15 min a 14.000 rpm. Foram misturados 100 μ L do sobrenadante a um mesmo volume do reagente de Griess [1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 0,1% de naphthylethylenediamina em água] e 10 min depois a absorvância foi medida a 560 nm e determinada em ELISA. A concentração de nitrito foi calculada através da equação da reta de regressão obtida de uma curva de calibração de nitrito de sódio ($NaNO_2$) e expressa em μ M de $NaNO_2/10$ mg de tecido.

3.5.4 Determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos

Uma vez que a GSH é o componente principal do estoque endógeno de grupos sulfidrílicos não protéicos (SH-NP), esta metodologia (BOYD; SASAME; BOYD, 1979 apud MEISTER; ANDERSON, 1983) foi utilizada com o objetivo de indiretamente avaliar a concentração de GSH no tecido.

Quinhentos miligramas (500 mg) de mucosa intestinal foram tomados e homogeneizados em 5 mL de EDTA a 0,02 M gelado. Foram retirados 4 mL do

homogenato e a estes foram adicionados 3,2 mL de água destilada, mais 0,8 mL de ácido tricloroacético (Cl_3CCOOH) a 50%, a solução foi agitada por 10 min e em seguida centrifugada a 3.000 rpm por 15 min. Foram retirados 2 mL do sobrenadante e adicionados 4 mL de tampão Tris (0,4 M; pH 8,9) e 0,1 mL de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) a 0,01 M dissolvido em metanol. A absorbância foi determinada dentro de 5 min a 412 nm. O branco foi feito sem homogenato. A concentração de SH-NP foi calculada através da equação da reta de regressão obtida de uma curva de calibração de GSH e expressa em μg de SH-NP/500 mg de tecido.

3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Para a análise histopatológica de sessões do cólon e do íleo, amostras de tecido foram coletadas e fixadas em uma solução a 10% de formaldeído tamponado, por 24 h, e depois de procedimentos de rotina foram incluídas em parafina para a realização de cortes de 7 μm que foram corados com hematoxilina-eosina, montados em lâminas de vidro e examinados por microscopia óptica.

As sessões do cólon receberam escores de acordo com a presença e intensidade de lesões, onde foi utilizado o seguinte critério (APPLEYARD; WALLACE, 1995): 0 = ausente, 1 ou 2 = moderada (leve ou grave) e 3 = severa, para a avaliação da perda da arquitetura glandular, da infiltração celular e do espessamento da mucosa; e 0 = ausente ou 1 = presente para formação de abscesso em cripta e perda de células caliciformes. As sessões do íleo foram

avaliadas qualitativamente quanto à presença de edema, infiltração de células inflamatórias, congestão e quanto à integridade epitelial.

3.7 MODELOS DE DOR VISCERAL

3.7.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

O modelo experimental de contorções abdominais induzidas por ácido acético (KOSTER; ANDERSON; DE BEER, 1959 apud GHELARDINI et al., 1998) foi utilizado para avaliação de um possível efeito antinociceptivo do LCU. Para a realização do experimento, camundongos Swiss, machos, pesando 25-30 g, em jejum sólido de 12 h, foram distribuídos em grupos de 8 animais cada e tratados com veículo (controle veículo, água destilada, 10 mL/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.).

Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo a resposta nociceptiva foi induzida através da injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%), diluído em solução salina (NaCl 0,9%), em um volume de 10 mL/kg de peso corpóreo do animal. A nocicepção foi avaliada através do registro do número de contorções abdominais realizadas pelo animal durante um período de 20 min, contados a partir da administração do agente álgico.

3.7.2 Cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos

Este modelo foi utilizado não apenas por ser um modelo de dor visceral, mas também porque parece que a cistite, assim como a SII, está relacionada à ativação de fibras viscerais periféricas aferentes. Tal idéia foi proposta depois de verificadas algumas coincidências entre a cistite e a SII. Em um estudo Walker et al. (1996) encontraram uma prevalência de dor pélvica crônica em 35% das mulheres com SII e em 14% das mulheres com DII. Destas mulheres com dor pélvica crônica, 5 a 10% apresentavam cistite intersticial (REITER, 1998). Em um outro estudo com 2.405 pacientes com cistite intersticial a SII foi a segunda alteração mais comum associada (GIAMBERARDINO, 2000 apud HEITKEMPER; JARRETT, 2005).

Este modelo experimental foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Olivar e Laird, em 1999. Camundongos Swiss, machos, pesando 25-30 g, foram distribuídos em grupos de 8 animais cada e tratados com veículo (controle veículo, água destilada, 10 mL/kg, v.o.), N-acetil-cisteína (750 mg/kg, i.p.) ou LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 1 h antes da administração de ciclofosfamida (400 mg/kg, i.p.) diluída em solução salina (NaCl 0,9%). Imediatamente após a administração da ciclofosfamida, os animais foram colocados individualmente em caixas plásticas e observados, durante 8 intervalos de 30 min, para o registro do tempo de crises transitórias, em minutos. Um grupo controle normal foi tratado por via oral com veículo (10 mL/kg) e recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg, i.p.) em substituição à ciclofosfamida.

Neste modelo, são consideradas crises transitórias qualquer um dos seguintes comportamentos: piloereção, lambar o abdômen, arrastar o abdômen

contra o solo, contorcer ou retrain o abdômen. O tempo de crises transitórias foi expresso como a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) do tempo de crises dos animais durante os 8 intervalos de 30 min. Além do tempo de crises, a cada intervalo de 30 min os animais foram observados por 2 min para que fosse aferido um escore ao seu comportamento de acordo com a seguinte escala: 0 = comportamento normal; 1 = piloereção fraca, 2 = piloereção forte; 3 = respiração forçada; 4 = lambadura de abdômen; 5 = contorção ou retração abdominal. Quando observados mais de um destes comportamentos durante o período de 2 min de observação, foi registrado o somatório dos pontos correspondentes a cada um dos comportamentos. Os escores para comportamento nociceptivo foram registrados como a mediana e valores mínimo e máximo dos escores obtidos durante os 8 intervalos de 2 min de observação.

3.7.3 Dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos

O modelo de nocicepção visceral induzida por capsaicina foi realizado como descrito anteriormente por Laird et al. (2001). Camundongos Swiss, machos, pesando 25-30 g, distribuídos em grupos de 8 animais cada, em jejum sólido de 12 h antes do início do experimento foram tratados com veículo (controle veículo, água destilada, 10 mL/kg, v.o.), morfina (7,5 mg/kg, s.c.) ou LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.).

Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, os animais receberam, por via intracolônica, capsaicina (0,3%, 50 μ L) que foi diluída em

uma solução contendo 10% de etanol, 10% de tween 80 e 80% de PBS. Esta administração foi realizada por meio de uma cânula, de 1,6 mm de diâmetro externo, no cólon do animal a 4 cm do ânus, após a aplicação de vaselina na região perianal para evitar a estimulação desta área pelo contato com a solução de capsaicina. Imediatamente após a administração de capsaicina, foi registrado, durante 30 min, o número de comportamentos nociceptivos dos animais relacionados com a dor visceral. São eles: lamber o abdômen, contorcer-se, arrastar a região abdominal baixa contra o solo e retrair o abdômen. Um grupo controle normal foi tratado por via oral com veículo (água destilada, 10 mL/kg) e recebeu apenas o veículo da capsaicina por via intracolônica (50 µL).

Com o propósito de investigar um possível envolvimento dos receptores opióides, α_2 -adrenérgicos e vanilóides, e do NO na atividade antinociceptiva visceral do LCU, este modelo experimental foi utilizado em outras ocasiões. Na primeira delas, os grupos (camundongos, machos, 25-30 g, n = 8) receberam os seguintes tratamentos: veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.); morfina (7,5 mg/kg, s.c.); naloxona (5 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração de morfina (7,5 mg/kg, s.c.); LCU (200 mg/kg, v.o.); naloxona (5 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração de LCU (200 mg/kg, v.o.) ou L-nitro arginina metil éster (L-NAME, 20 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração de LCU (200 mg/kg, v.o.). A capsaicina foi administrada 1 h após o tratamento v.o. ou 30 min após o tratamento s.c. e em seguida foi registrado o número de comportamentos nociceptivos dos animais durante 30 min. Posteriormente, outros grupos, apresentando o mesmo perfil anterior, foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.); clonidina (100 mg/kg, i.p.); ioimbina (2 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração de clonidina (100 mg/kg, i.p.); LCU (200 mg/kg, v.o.) ou ioimbina (2 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração de LCU (200

mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento com veículo ou LCU, ou 30 min após o tratamento com clonidina, os animais receberam capsaicina e em seguida foi registrado o número de comportamentos nociceptivos durante 30 min.

Em outra série experimental os grupos (camundongos, machos, 25-30 g, n = 8) foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.), vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.), LCU (200 mg/kg, v.o.) ou vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.) 15 min antes da administração de LCU (200 mg/kg, v.o.). A capsaicina foi administrada 1 h após o tratamento com veículo ou LCU (isoladamente ou em associação com o vermelho de rutênio), ou 45 min após o tratamento apenas com vermelho de rutênio e em seguida foi registrado o número de comportamentos nociceptivos dos animais durante 30 min. Em todas estas ocasiões para estudo de um possível mecanismo de ação do LCU, foram incluídos grupos controle normais.

3.8 TEMPO DE SONO INDUZIDO POR PENTOBARBITAL EM CAMUNDONGOS

Camundongos, machos, pesando 25-30 g, em jejum sólido de 12 h, foram distribuídos em grupos de 8 animais cada, e tratados com veículo (controle veículo, água destilada, 10 mL/kg, v.o.), clorpromazina (10 mg/kg, i.m.) ou LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.).

Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento intramuscular os animais receberam uma injeção intraperitoneal de pentobarbital sódio (40 mg/kg) como agente indutor de sono (DANDIYA; COLLUMBINE, 1959 apud HOSSEINZADEH; NASSIRI ASL, 2003). Iniciado o período de sono, os animais

foram posicionados em decúbito dorsal e observados durante 120 min para o registro do tempo de sono, em minutos, tendo como parâmetro indicativo de retorno à situação de alerta o momento no qual o animal saiu voluntariamente da posição de decúbito dorsal.

3.9 MODELOS DE ESTUDO DO DESEMPENHO MOTOR DOS ANIMAIS

3.9.1 Teste do campo aberto em camundongos

A atividade motora espontânea dos animais foi avaliada através do teste do campo aberto, na tentativa de verificar uma possível atividade sedativa/depressora do LCU sobre o SNC.

A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto, com formato quadrangular (BRUHWYLER et al., 1991), com 30 cm de largura em cada um dos lados e com paredes de acrílico incolor medindo 15 cm de altura, sendo a sua base (local onde ocorre a movimentação dos animais) de cor preta e dividida em 9 secções de igual tamanho.

Camundongos, machos, pesando 25-30 g, em jejum sólido de 12 h, foram separados em grupos de 8 animais cada e tratados por via oral com veículo (controle veículo, água destilada, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg). Uma hora após o tratamento, todos os animais foram levados individualmente ao campo aberto e,

após 1 min de ambientação, observados durante 4 min, sendo registrado o número de seções transpassadas pelo animal.

3.9.2 Teste do “rotarod” em camundongos

O teste do “rotarod” também foi utilizado para a avaliação de um possível efeito do LCU sobre a atividade motora dos animais. Camundongos, machos, pesando 25-30 g, foram pré-selecionados em um aparelho de “rotarod” de 36 mm de diâmetro, realizando 4 rpm, 24 h antes do experimento. Os animais que permaneceram no aparelho por 2 min foram selecionados e distribuídos em grupos de 8 animais cada. Após jejum de 12 h, os grupos foram tratados oralmente com veículo (controle veículo, água destilada, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg). Uma hora após o tratamento, os animais foram colocados no aparelho de “rotarod” para registro do tempo de permanência do animal no mesmo, em segundos (DUNHAM; MIYA, 1957 apud KOCH; BRITTON, 2003). O tempo máximo de permanência permitido foi de 120 segundos.

3.10 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média \pm E.P.M., com exceção dos valores de escores que foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. Para comparação múltipla de dados paramétricos foi

utilizada a análise de variância uma via (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keul e para dados não paramétricos foi empregado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Em todas as análises estatísticas, foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FRAÇÕES ACETONA E AQUOSA DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA*

Dos 300 mL utilizados do LCU foram obtidos 2,42 g de fração acetona. Cromatografou-se 1,4 g desta fração, em coluna aberta, cuja fase estacionária foi a sílica e os eluentes utilizados foram misturas de clorofórmio/metanol. Obteve-se desta cromatografia 6 subfrações, as quais foram exaustivamente cromatografadas. Somente da subfração 91-107 (84 mg), foi possível isolar uma mistura 2:1 de galocatequina e epigalocatequina, com um rendimento de 14 mg.

Das demais subfrações não foi possível obter nenhum produto puro. Embora esteróides e/ou terpenos tenham sido detectados por CCD, não foi possível purificá-los devido mistura complexa.

Foram obtidos 6 g de fração aquosa, desta foi feita extração específica para alcalóides, mas não houve sucesso na extração, cujo rendimento foi de apenas 5 mg. Os compostos detectados em CCD parecem ser todos de origem fenólica/flavonóides.

4.2 TOXICIDADE SOBRE *ARTEMIA SALINA*

Neste teste, as substâncias são consideradas ativas quando a toxicidade para *Artemia salina* for menor que 1.000 ppm (MEYER et al., 1982), ou seja, quando em cada 1.000 mL da solução existir menos que 1 mL da substância teste. Considerando-se que a CL_{50} encontrada para o LCU foi de $100,00 \pm 3,52 \mu\text{g/mL}$ e que 1 mL do látex bruto do *Croton urucurana* possui 411 mg de material sólido (peso seco), a CL_{50} encontrada equivale a aproximadamente 0,2433 mL do LCU em sua forma bruta (líquida) diluído em 1.000 mL da solução. Ou seja, o LCU é considerado ativo neste modelo experimental.

Não foram encontradas larvas mortas nos tubos controle. A CL_{50} encontrada para o dicromato de potássio foi de $20,00 \pm 1,83 \mu\text{g/mL}$, portanto, o LCU é cinco vezes menos tóxico do que este.

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.3.1 Atividade antibacteriana *in vitro*

Não houve formação de halo (zona de inibição de crescimento) nas placas após o período de incubação. Este achado indica que o LCU, nas concentrações

utilizadas, não apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

4.3.2 Atividade antifúngica *in vitro*

A Tabela 1 mostra o efeito do LCU sobre o crescimento de dermatófitos no método de difusão em discos. O LCU, nas quatro maiores concentrações utilizadas, produziu zonas de inibição de crescimento contra todas as cepas testadas. As zonas de inibição foram concentração-dependentes e variaram de 21,8 até 26,9 mm, quando utilizados discos impregnados com 3,0 mg de LCU (Tabela 1). A griseofulvina (6,0 µg/disco), utilizada como controle positivo do experimento, produziu zonas de inibição comparativamente maiores (25,2 - 34,0 mm) (Tabela 1). Não houve formação de zona de inibição de crescimento nas placas controle veículo.

As frações aquosa e acetona (3,0 mg/disco) não mostraram zonas de inibição significativamente diferentes ($26,2 \pm 0,3$ e $25,4 \pm 0,5$ mm, respectivamente, contra o *Trichophyton rubrum* e $24,1 \pm 0,6$ e $23,6 \pm 0,7$ mm, respectivamente, contra o *Microsporium canis*) das zonas registradas com o LCU (3,0 mg/disco), obtidas contra as mesmas espécies testadas ($25,6 \pm 0,4$ mm, contra o *Trichophyton rubrum* e $23,5 \pm 0,3$ mm, contra o *Microsporium canis*).

TABELA 1. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o crescimento de dermatófitos no método de difusão em discos.

Espécies de dermatófitos	Diâmetro (mm) da zona de inibição de crescimento					
	(Média ± E.P.M.)					
	LCU					Griseofulvina
	(mg/disco)					(µg/disco)
	3,00	1,50	0,75	0,375	0,1875	6,0
<i>Trichophyton</i>	25,6	19,4	14,6	11,2	7,6	34,0
<i>rubrum</i>	± 0,4	± 0,6	± 0,5	± 0,9	± 1,9	± 1,3
<i>Trichophyton</i>	21,8	14,0	10,8	6,4	2,8	25,2
<i>mentagrophytes</i>	± 0,5	± 0,3	± 0,5	± 1,6	± 1,7	± 1,4
<i>Trichophyton</i>	26,9	17,8	13,2	10,0	1,8	28,8
<i>tonsurans</i>	± 1,3	± 0,2	± 0,8	± 0,5	± 1,8	± 3,2
<i>Microsporum</i>	23,5	17,4	13,8	11,0	2,0	26,5
<i>Canis</i>	± 0,3	± 0,6	± 0,8	± 0,8	± 2,0	± 2,6
<i>Epidermophyton</i>	23,4	18,0	14,0	7,3	6,0	27,5
<i>floccosum</i>	± 0,8	± 0,0	± 1,0	± 3,7	± 3,0	± 1,4

Placas de Petri contendo ágar Batata foram inoculadas em sua superfície com uma suspensão padrão do fungo em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Discos de papel de filtro estéreis, com diâmetro de 5 mm, foram impregnados com 10 µL de uma solução contendo 3,0; 1,5; 0,75; 0,375 ou 0,1875 mg de LCU ou 6 µg de griseofulvina. Os discos foram então colocados na superfície do ágar de cada uma das placas de Petri. O diâmetro da zona de inibição ao redor dos discos foi medido depois de 8 dias de incubação a 25-28 °C. Foram utilizados 5 microrganismos isolados de cada espécie.

4.3.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima

A Tabela 2 mostra que a concentração inibitória mínima do LCU contra os dermatófitos testados foi de 2,5 mg/mL, com exceção do *Trichophyton tonsurans* onde foi observada uma CIM de 1,25 mg/mL (Tabela 2). Houve crescimento visível dos fungos em todos os tubos controle veículo. Não houve crescimento de fungos nos tubos controle contendo apenas o ágar Sabouraud.

TABELA 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do látex do *Croton urucurana* (LCU) contra dermatófitos no método de diluição em tubos.

Espécies de dermatófitos	CIM (mg/mL)
<i>Trichophyton rubrum</i>	2,50
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2,50
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1,25
<i>Microsporum canis</i>	2,50
<i>Epidermophyton floccosum</i>	2,50

Tubos contendo 0,5 mL de uma solução contendo 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 ou 0,15625 mg/mL de LCU diluído em ágar Sabouraud receberam 50 µL do inóculo padrão (grau 0,5 da escala de McFarland) de cada organismo estudado. Todos os tubos, em duplicata, foram incubados a 25-28 °C durante 8 dias. A CIM foi definida como a menor concentração do LCU sem crescimento visível após o período de incubação. Foram utilizados cinco microrganismos isolados de cada espécie de dermatófito.

4.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL

4.4.1 Colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos

O ácido acético produziu elevação significativa ($p < 0,001$) na proporção peso úmido/comprimento do tecido ($183,35 \pm 15,63$ mg/cm) em relação ao grupo controle normal ($72,80 \pm 4,58$ mg/cm) (Figura 7). Este aumento na proporção peso úmido/comprimento induzido pela administração intracolônica de ácido acético, foi significativamente reduzido nos grupos de animais tratados com o LCU nas doses de 200 e 400 mg/kg ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), onde foram obtidos valores de $141,56 \pm 8,80$ mg/kg, para a menor dose, e $122,12 \pm 11,09$ mg/kg, para a maior dose do LCU (Figura 7).

A avaliação macroscópica do cólon dos animais mostrou que o ácido acético induziu uma lesão colônica significativa ($p < 0,001$) no grupo controle veículo, com escore de 9,0 (8-10), em comparação ao grupo controle normal, cujo escore foi de 0,0 (0-0) (Tabela 3). Como mostrado na Tabela 3, o pré-tratamento com o LCU por via retal, nas doses de 200 e 400 mg/kg, reduziu o valor do escore obtido para 5,0 (4-7) e 5,5 (3-6), respectivamente, no entanto esta redução não foi estatisticamente significante.

A análise histopatológica confirmou o efeito lesivo do ácido acético no cólon dos animais evidenciado pela avaliação macroscópica. O ácido acético induziu lesão tecidual significativa ($p < 0,001$) nos ratos do grupo controle veículo, exibindo escores de 10,0 (9-11), em relação aos animais do grupo controle normal, que obtiveram

escore de 0,0 (0-0) (Tabela 4). O LCU na dose de 400 mg/kg foi capaz de prevenir de forma significativa ($p < 0,05$) o dano tecidual microscópico induzido pelo ácido acético, tendo este grupo obtido escore de 1,5 (0-6). Já na menor dose utilizada, o LCU não foi capaz de reduzir de forma significativa o escore microscópico de lesão, exibindo valor de 3,0 (0-7) (Tabela 4).

A Figura 8 resume as alterações histopatológicas das secções do cólon dos quatro grupos estudados. Secções do cólon dos ratos do grupo controle veículo mostraram, 24 h após a administração do ácido acético, uma resposta inflamatória caracterizada por extensa desorganização da mucosa, infiltração de células inflamatórias na submucosa, focos inflamatórios com necrose e edema da submucosa (Figura 8B). Nas secções de cólon dos animais do grupo controle normal estas alterações não foram visualizadas (Figura 8A). O tratamento com LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, reduziu a desorganização da mucosa, a presença de focos inflamatórios com necrose e o edema da submucosa (Figuras 8C e 8D, respectivamente).

A colite causada pelo ácido acético foi associada a uma elevação significativa ($p < 0,001$) de aproximadamente três vezes na atividade da enzima mieloperoxidase ($0,295 \pm 0,015$) presente na mucosa do cólon dos animais, quando este valor foi comparado ao obtido no grupo controle normal ($0,083 \pm 0,005$) (Figura 9). O pré-tratamento com 200 e 400 mg/kg do LCU reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) a atividade da mieloperoxidase, 24 h após a administração do ácido acético, para $0,158 \pm 0,017$ e $0,187 \pm 0,023$, respectivamente, contudo tais níveis não foram capazes de alcançar os valores normais (Figura 9).

A atividade da catalase na mucosa do cólon dos animais do grupo controle veículo foi significativamente elevada ($p < 0,01$) pela administração do ácido acético, atingindo valores de $139,52 \pm 12,81$ mM/min/ μ g de proteína, em relação ao grupo controle normal que obteve valores de $86,23 \pm 10,60$ mM/min/ μ g de proteína (Figura 10). O LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) a atividade da catalase, atingindo valores basais de $85,10 \pm 1,75$ e $97,98 \pm 5,77$ mM/min/ μ g de proteína, respectivamente (Figura 10).

Foram encontrados níveis de nitrito significativamente elevados ($p < 0,001$) na mucosa colônica dos animais do grupo controle veículo ($33,50 \pm 3,32$ μ M de $\text{NaNO}_2/10$ mg de tecido), em relação ao grupo controle normal ($21,62 \pm 2,23$ μ M de $\text{NaNO}_2/10$ mg de tecido) (Figura 11). O pré-tratamento com o LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, causou uma inibição significativa ($p < 0,001$) na produção de nitrito, que atingiu valores de $17,12 \pm 0,48$ e $18,23 \pm 0,90$ μ M de $\text{NaNO}_2/10$ mg de tecido, respectivamente (Figura 11).

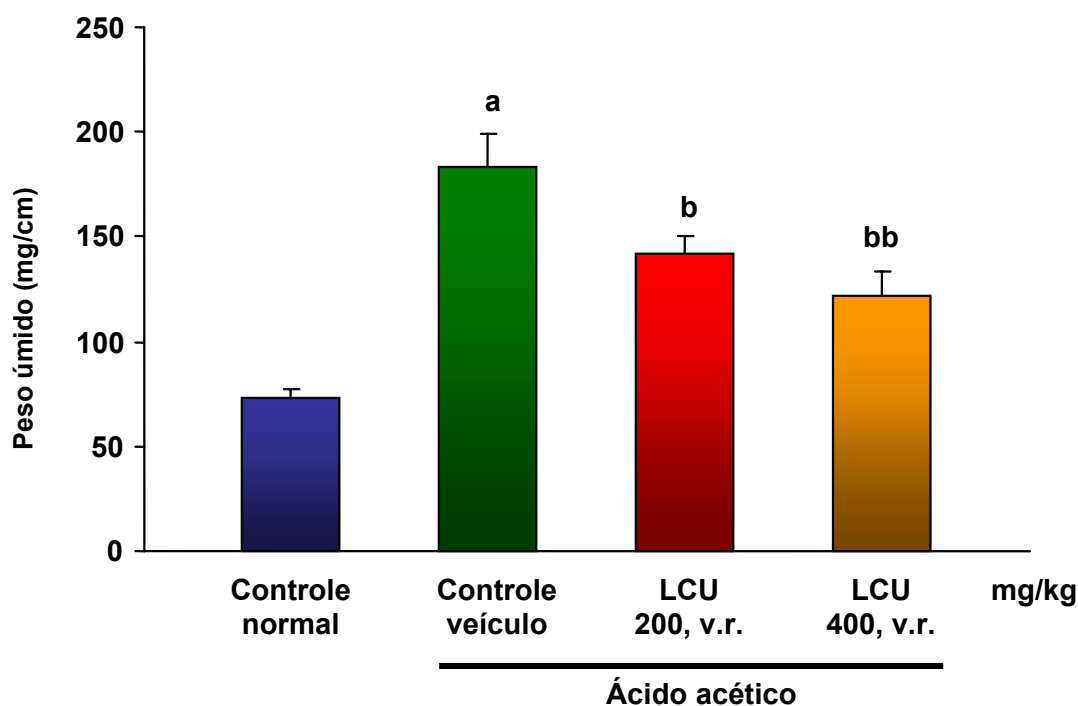


FIGURA 7. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a relação peso úmido/comprimento do cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.r.) com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24 e 2 h antes da administração de ácido acético (4%, 2 mL, v.r.). O grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.r.) 24 e 2 h antes da administração de 2 mL de água destilada (v.r.), em substituição ao ácido acético. Vinte e quatro horas após a administração do ácido acético, os animais foram sacrificados para a retirada de 8 cm do cólon a partir do ânus, foram desprezados os 3 cm proximais e o segmento restante (5 cm) foi aberto, limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e pesado. As colunas representam a média \pm E.P.M. da relação peso úmido/comprimento do segmento (mg/cm). ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal; ^bp<0,05 e ^{bb}p<0,01 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

TABELA 3. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o escore de lesão macroscópica do cólon no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos.

Tratamento (v.r.)	Escore
Controle normal (água destilada, 10 mL/kg)	0,0 (0-0)
Controle veículo (água destilada, 10 mL/kg)	9,0 (8-10)*
LCU (200 mg/kg)	5,0 (4-7)
LCU (400 mg/kg)	5,5 (3-6)

Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados 24 e 2 h antes da administração de ácido acético (4%, 2 mL, via retal). O grupo controle normal foi tratado 24 e 2 h antes da administração de mais 2 mL de água destilada por via retal, em substituição ao ácido acético. Vinte e quatro horas após a administração do ácido acético, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada de 8 cm do cólon a partir do ânus, foram desprezados os 3 cm proximais ao ânus e o segmento restante (5 cm) foi aberto longitudinalmente, limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e avaliado macroscopicamente para aferição de escores de acordo com a intensidade e extensão da lesão tecidual. Resultados expressos como mediana e valores mínimo e máximo. *p<0,001 comparado ao grupo controle normal (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn).

TABELA 4. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o escore de lesão microscópica do cólon no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos.

Tratamento (v.r.)	Escore
Controle normal (água destilada, 10 mL/kg)	0,0 (0-0)
Controle veículo (água destilada, 10 mL/kg)	10,0 (9-11) ^a
LCU (200 mg/kg)	3,0 (0-7)
LCU (400 mg/kg)	1,5 (0-6) ^b

Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados 24 e 2 h antes da administração de ácido acético (4%, 2 mL, via retal). O grupo controle normal foi tratado 24 e 2 h antes da administração de mais 2 mL de água destilada por via retal, em substituição ao ácido acético. Vinte e quatro horas após a administração do ácido acético os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada de 8 cm do cólon a partir do ânus, foram desprezados os 3 cm proximais ao ânus e o segmento restante (5 cm) foi aberto longitudinalmente, limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e uma pequena amostra de cada um dos segmentos foi fixada em uma solução a 10% de formaldeído tamponado para posterior avaliação histopatológica, onde foram aferidos escores aos tecidos de acordo com o grau de lesão. Resultados expressos como mediana e valores mínimo e máximo. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal e ^bp<0,05 comparado ao grupo controle veículo (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn).

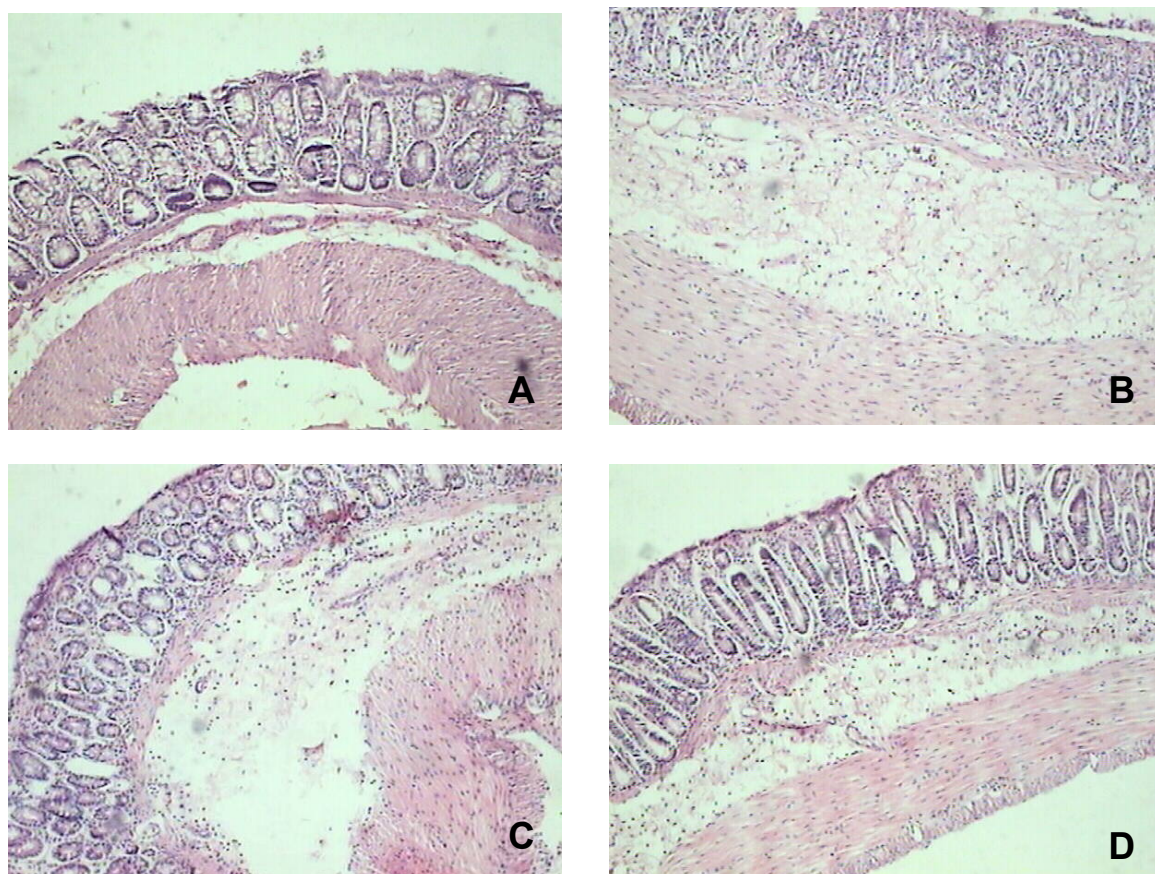


FIGURA 8. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a lesão tecidual microscópica no cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.r.) com (B) veículo (controle veículo, 10 mL/kg), (C) LCU (200 mg/kg) ou (D) LCU (400 mg/kg) 24 e 2 h antes da administração de ácido acético (4%, 2 mL, v.r.). O grupo controle normal (A) foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.r.) 24 e 2 h antes da administração de água destilada (2 mL, v.r.), em substituição ao ácido acético. Vinte e quatro horas após a administração do ácido acético os animais foram sacrificados para a retirada de 8 cm do cólon a partir do ânus, foram desprezados os 3 cm proximais e uma amostra do segmento restante (5 cm) foi fixada e processada para análise microscópica (H&E, 40x). Na figura B observa-se uma resposta inflamatória com desorganização da mucosa, infiltração de células inflamatórias na submucosa, focos inflamatórios com necrose e edema da submucosa. Estas alterações não são visualizadas na figura A. Nas figuras C e D observa-se redução da desorganização da mucosa, da necrose e do edema da submucosa.

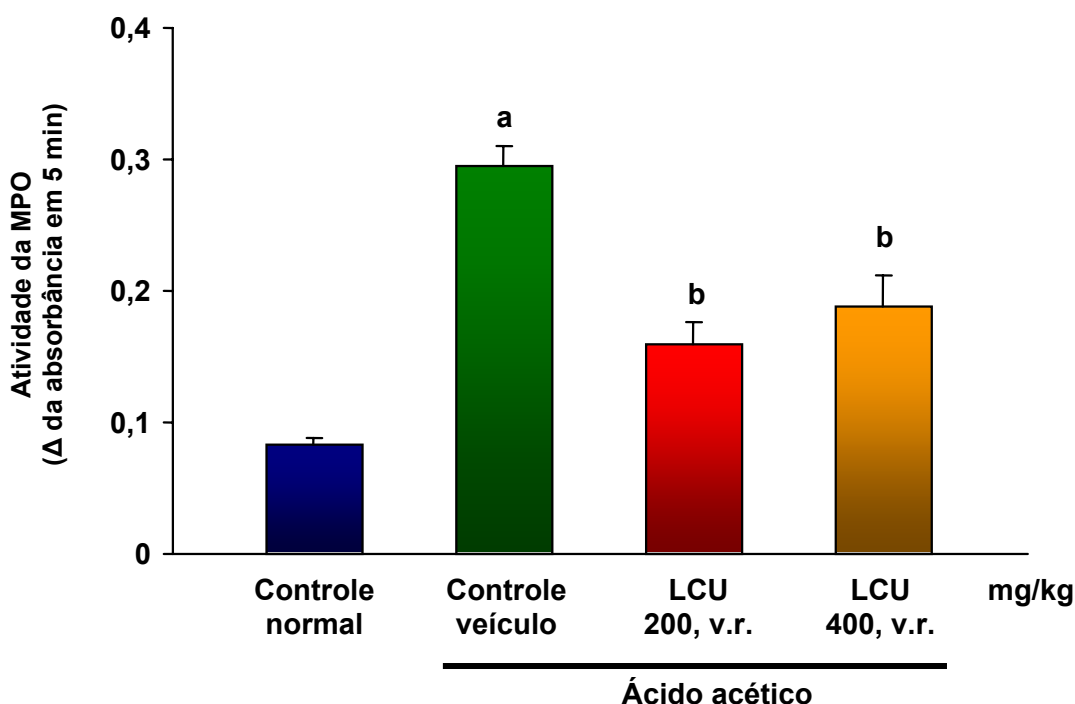


FIGURA 9. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa do cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.r.) com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24 e 2 h antes da administração de ácido acético (4%, 2 mL, v.r.). O grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.r.) 24 e 2 h antes da administração de 2 mL de água destilada (v.r.), em substituição ao ácido acético. Vinte e quatro horas após a administração do ácido acético os animais foram sacrificados para a retirada de 8 cm do cólon a partir do ânus, foram desprezados os 3 cm proximais e o segmento restante (5 cm) foi aberto, limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e 300 mg da mucosa foram retirados para a determinação da atividade da MPO. As colunas representam a média \pm E.P.M. da variação na absorbância da reação no intervalo de 5 min. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal e ^bp<0,001 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

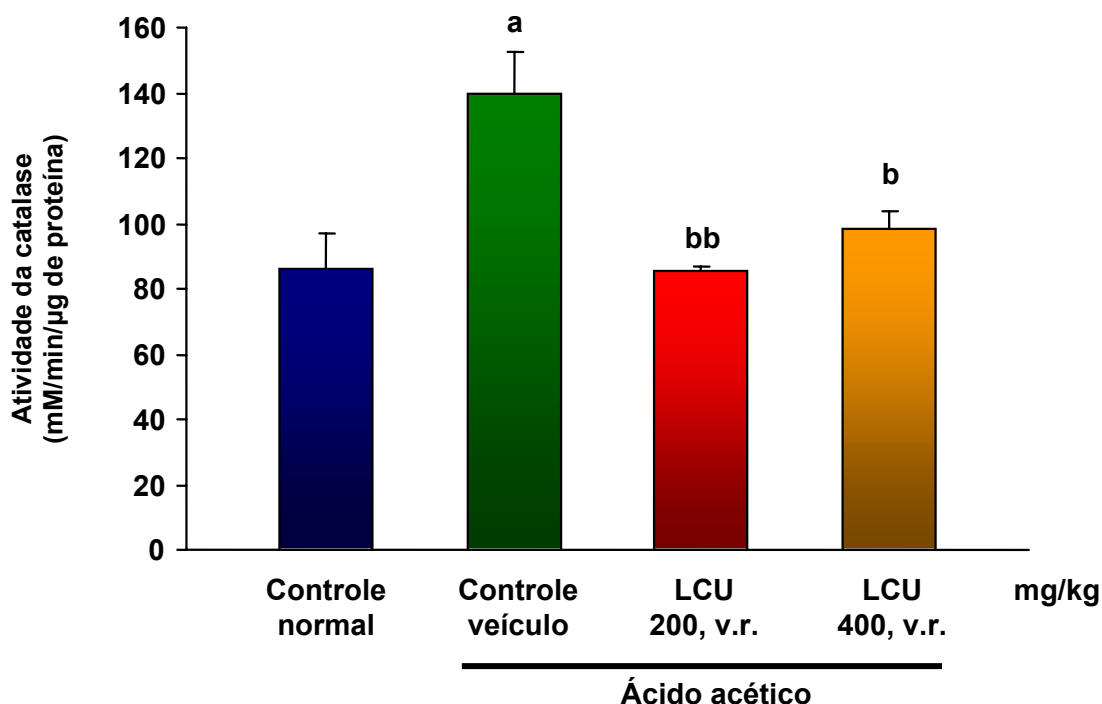


FIGURA 10. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a atividade da catalase na mucosa do cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.r.) com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24 e 2 h antes da administração de ácido acético (4%, 2 mL, v.r.). O grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.r.) 24 e 2 h antes da administração de 2 mL de água destilada (v.r.), em substituição ao ácido acético. Vinte e quatro horas após a administração do ácido acético os animais foram sacrificados para a retirada de 8 cm do cólon a partir do ânus, foram desprezados os 3 cm proximais e o segmento restante (5 cm) foi aberto, limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e 200 mg da mucosa foram retirados para a determinação da atividade da catalase. As colunas representam a média \pm E.P.M. da atividade da catalase em mM/min/ μ g de proteína. ^ap<0,01 comparado ao grupo controle normal; ^bp<0,05 e ^{bb}p<0,01 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

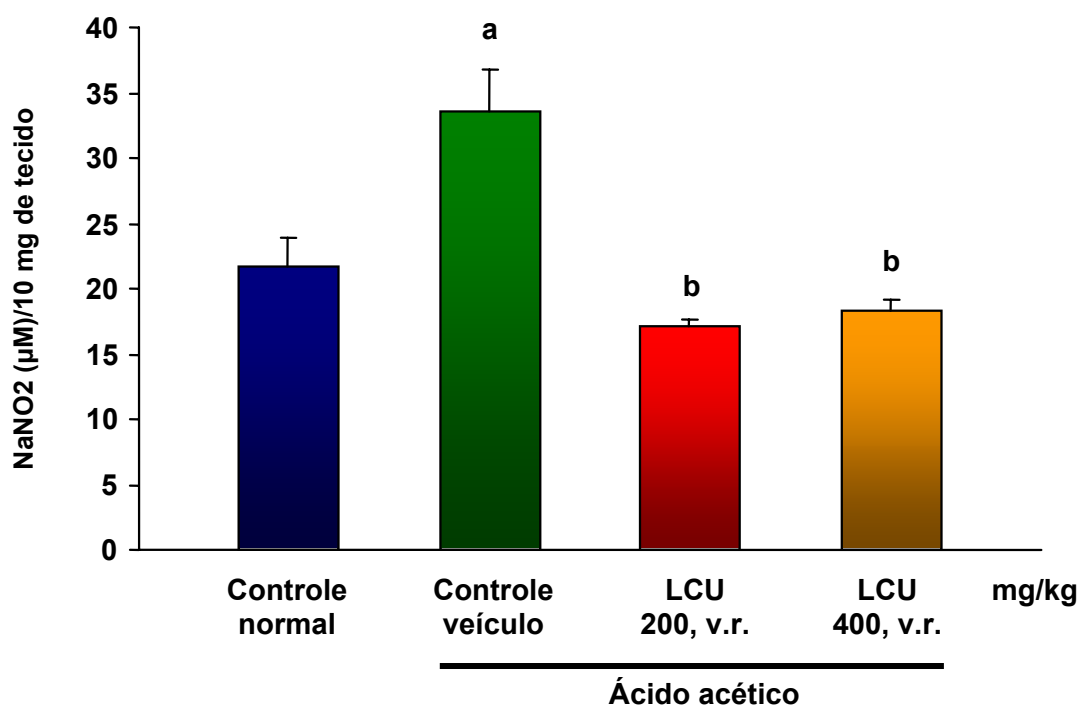


FIGURA 11. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a concentração de nitrito na mucosa do cólon dos animais no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.r.) com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24 e 2 h antes da administração de ácido acético (4%, 2 mL, v.r.). O grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.r.) 24 e 2 h antes da administração de 2 mL de água destilada (v.r.), em substituição ao ácido acético. Vinte e quatro horas após a administração do ácido acético os animais foram sacrificados para a retirada de 8 cm do cólon a partir do ânus, foram desprezados os 3 cm proximais e o segmento restante (5 cm) foi aberto, limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e 200 mg da mucosa foram retirados para a dosagem de nitrito (NaNO₂). As colunas representam a média ± E.P.M. da concentração de NaNO₂ (µM) em 10 mg de tecido. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal e ^bp<0,001 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

4.4.2 Injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos

Não foi observada mortalidade nos ratos submetidos ao modelo experimental de isquemia-reperfusão mesentérica. A Figura 12 resume as alterações histopatológicas nas secções de íleo dos quatro grupos estudados. Secções do íleo dos ratos tratados com veículo e submetidos à injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica mostraram uma resposta inflamatória caracterizada por moderada desorganização da mucosa, infiltração de células inflamatórias e discreto edema da submucosa (Figura 12B). Nas secções do íleo dos animais do grupo controle normal estas alterações não foram visualizadas (Figura 12A). O LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, reduziu a desorganização da mucosa e o edema da submucosa (Figuras 12C e 12D, respectivamente), contudo, esta proteção foi considerada discreta. A proteção desempenhada pela menor dose do LCU parece ter sido mais efetiva que aquela desempenhada pela maior dose.

A isquemia-reperfusão mesentérica no grupo controle veículo foi associada a um significativo ($p < 0,001$) aumento na atividade das enzimas mieloperoxidase ($0,297 \pm 0,028$) e catalase ($167,27 \pm 4,24$ mM/min/ μ g de proteína) presentes na mucosa ileal em relação ao grupo controle normal ($0,067 \pm 0,012$ e $125,85 \pm 7,50$ mM/min/ μ g de proteína, respectivamente) (Figuras 13 e 14). O tratamento com LCU em ambas as doses reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) a atividade destas enzimas em relação ao grupo controle veículo, submetido à isquemia-reperfusão mesentérica. A atividade da mieloperoxidase atingiu valores de $0,177 \pm 0,013$ e $0,172 \pm 0,013$ nos grupos tratados com 200 e 400 mg/kg de LCU, respectivamente, valores estes que não chegaram a alcançar o valor encontrado no grupo controle normal (Figura 13). A

atividade da catalase foi reduzida para $72,73 \pm 6,58$ e $79,83 \pm 5,10$ mM/min/ μ g de proteína com as doses de 200 e 400 mg/kg de LCU, respectivamente. Esta redução levou a atividade da catalase para níveis significativamente ($p < 0,001$) inferiores ao encontrado no grupo controle normal (Figura 14), o que pode ter ocorrido em decorrência de uma redução na quantidade de peróxido de hidrogênio produzido pelo tecido inflamado para níveis abaixo do normal.

Os níveis de nitrito na mucosa ileal também foram significativamente ($p < 0,01$) elevados com a isquemia-reperfusão mesentérica no grupo controle veículo ($18,670 \pm 3,170$ μ M de $\text{NaNO}_2/10$ mg de tecido) em relação ao grupo controle normal ($10,176 \pm 1,176$ μ M de $\text{NaNO}_2/10$ mg de tecido) (Figura 15). Estes níveis foram reduzidos de forma significativa com as doses de 200 mg/kg ($p < 0,001$) e 400 mg/kg ($p < 0,01$) de LCU ($6,396 \pm 0,681$ e $10,765 \pm 1,578$ μ M de $\text{NaNO}_2/10$ mg de tecido, respectivamente) quando os valores foram comparados ao valor obtido no grupo controle veículo (Figura 15).

A isquemia-reperfusão mesentérica induzida no grupo controle veículo reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) a concentração de SH-NP na mucosa ileal em relação ao grupo controle normal, indicando, uma redução na concentração de GSH (Figura 16). No grupo controle veículo a concentração de SH-NP atingiu valores de $30,67 \pm 2,03$ μ g de SH-NP/500 mg de tecido ($p < 0,01$), enquanto a concentração no grupo controle normal foi de $49,71 \pm 4,65$ μ g de SH-NP/500 mg de tecido (Figura 16). O LCU na menor dose preveniu esta redução de forma significativa ($p < 0,001$), mostrando uma concentração de $61,87 \pm 4,37$ μ g de SH-NP/500 mg de tecido. Contudo, a redução na concentração de SH-NP induzida pela isquemia-reperfusão não foi inibida de forma significativa pela maior dose de LCU ($41,29 \pm 2,31$ μ g de SH-NP/500 mg de tecido) (Figura 16).

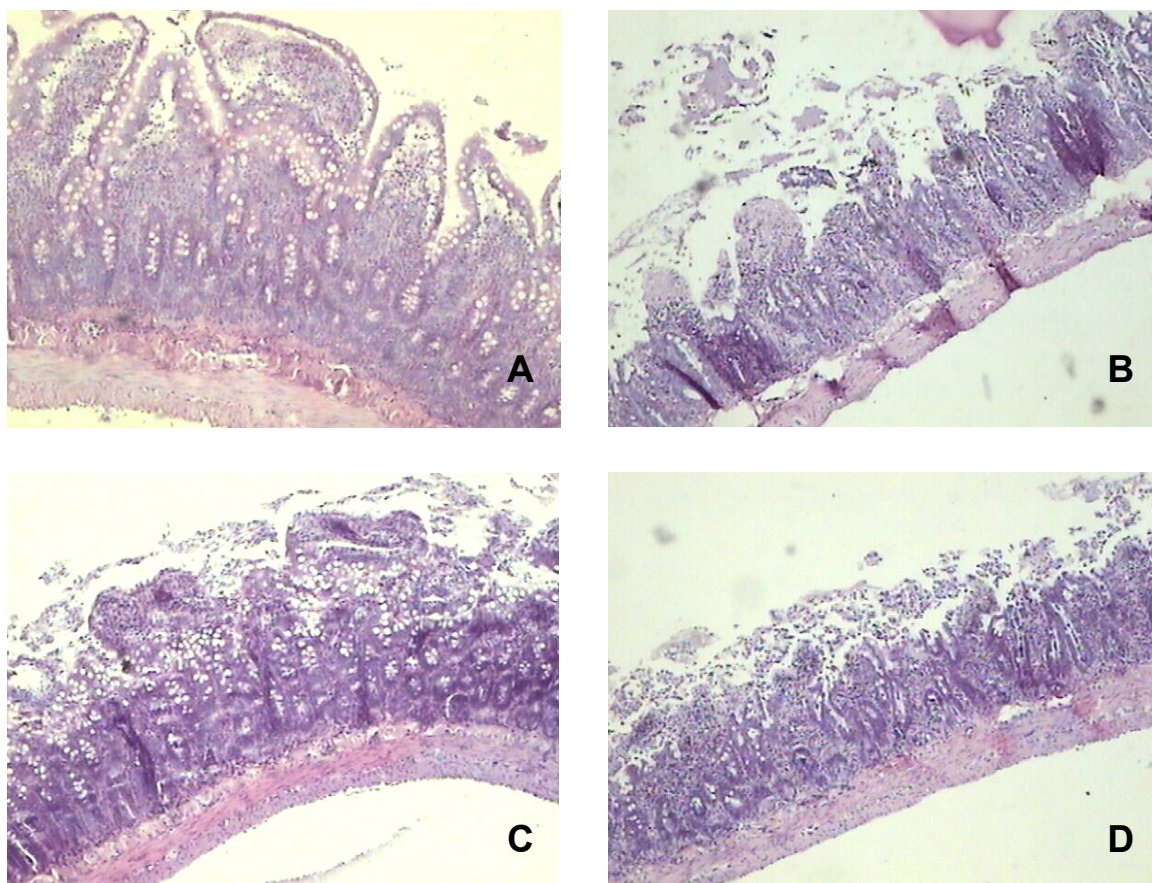


FIGURA 12. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a lesão tecidual microscópica do íleo dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.o.) com (B) veículo (controle veículo, 10 mL/kg), (C) LCU (200 mg/kg) ou (D) LCU (400 mg/kg) 24, 12 e 2 h antes da indução da isquemia. Para a realização do procedimento cirúrgico, a artéria mesentérica superior foi clampeada por 45 min, por meio de laparotomia, em seguida o clampe foi retirado para que houvesse reperfusão do tecido por 1 h. Um outro grupo (A) foi tratado com veículo (controle normal, 10 mL/kg, v.o.) 24, 12 e 2 h antes do mesmo procedimento experimental, contudo sem o clampeamento da artéria. Os animais foram então sacrificados, o íleo foi retirado e uma mostra foi fixada e processada para análise microscópica (H&E, 40x). Na figura B observa-se desorganização da mucosa, infiltração de células inflamatórias e discreto edema da submucosa. Estes achados não são observados na figura A. Nas figuras C e D observa-se discreta proteção quanto à desorganização da mucosa e ao edema da submucosa, tal proteção parece ter sido mais efetiva na figura C.

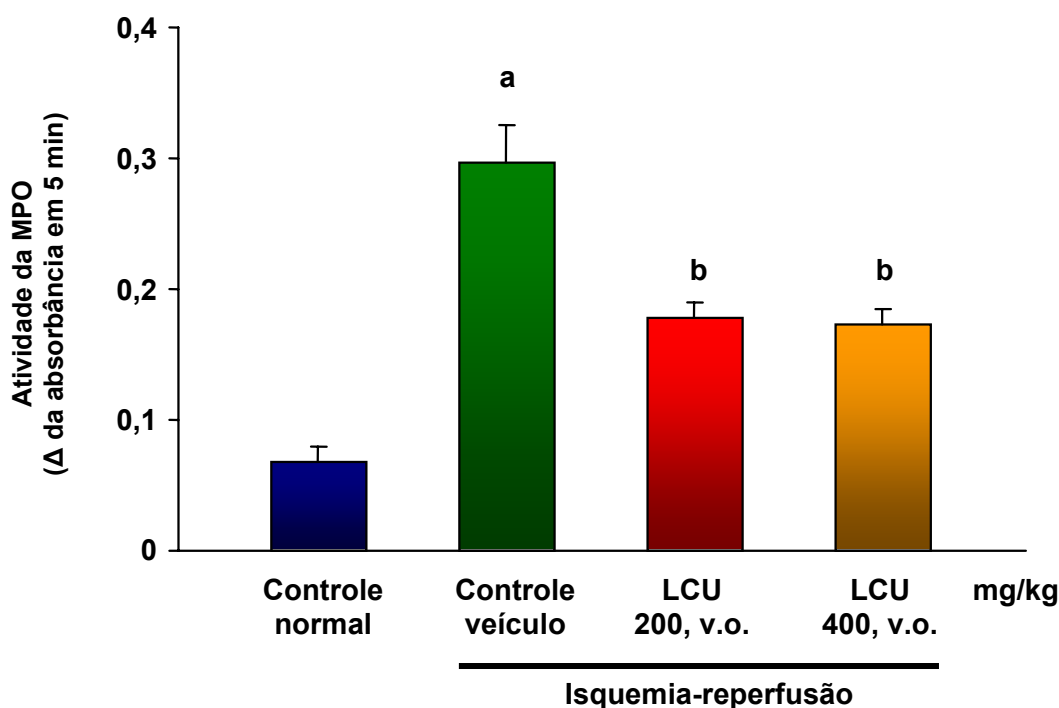


FIGURA 13. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa ileal dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.o.) com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24, 12 e 2 h antes da indução da isquemia. Para a realização do procedimento cirúrgico, a artéria mesentérica superior foi clampeada por 45 min, por meio de laparotomia, em seguida o clampe foi retirado para que houvesse reperfusão do tecido por 1 h. Um outro grupo foi tratado com veículo (controle normal, 10 mL/kg, v.o.) 24, 12 e 2 h antes do mesmo procedimento experimental, contudo sem o clameamento da artéria. Os animais foram então sacrificados, o íleo foi retirado e limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e 300 mg de mucosa foram separados para dosagem da MPO. As colunas representam a média \pm E.P.M. da variação na absorbância da reação no intervalo de 5 min. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal e ^bp<0,001 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

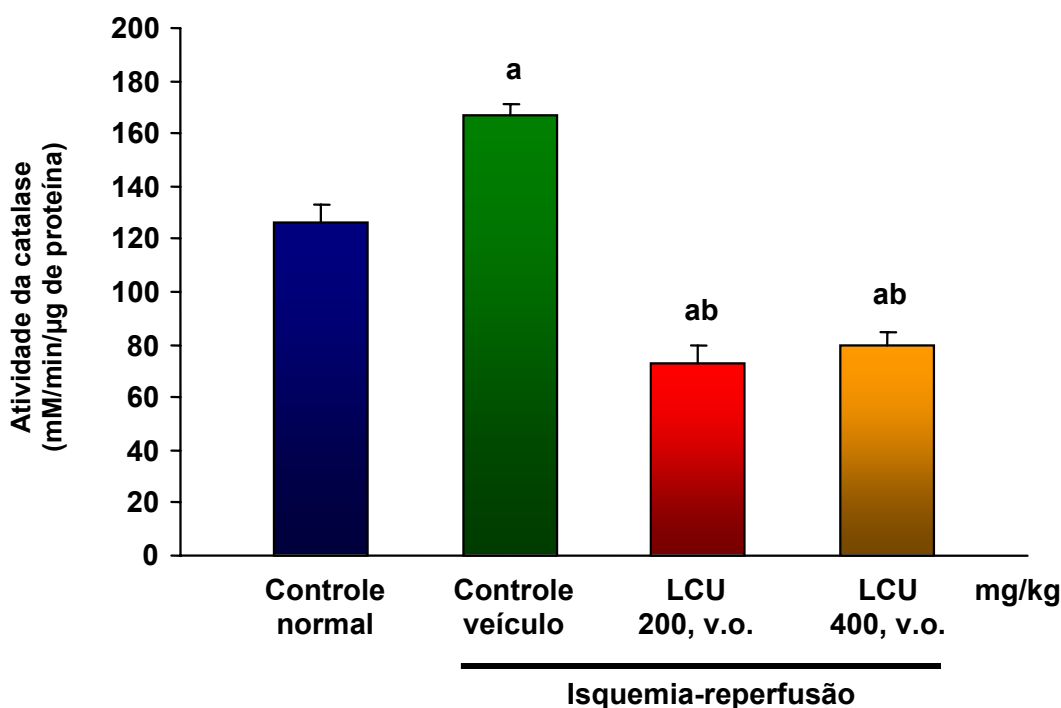


FIGURA 14. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a atividade da catalase na mucosa ileal dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.o.) com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24, 12 e 2 h antes da indução da isquemia. Para a realização do procedimento cirúrgico, a artéria mesentérica superior foi clampeada por 45 min, por meio de laparotomia, em seguida o clampe foi retirado para que houvesse reperfusão do tecido por 1 h. Um outro grupo foi tratado com veículo (controle normal, 10 mL/kg, v.o.) 24, 12 e 2 h antes do mesmo procedimento experimental, contudo sem o clameamento da artéria. Os animais foram então sacrificados, o íleo foi retirado e limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e 200 mg de mucosa foram separados para dosagem da catalase. As colunas representam a média \pm E.P.M. da atividade da catalase em mM/min/ μ g de proteína. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal e ^bp<0,001 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

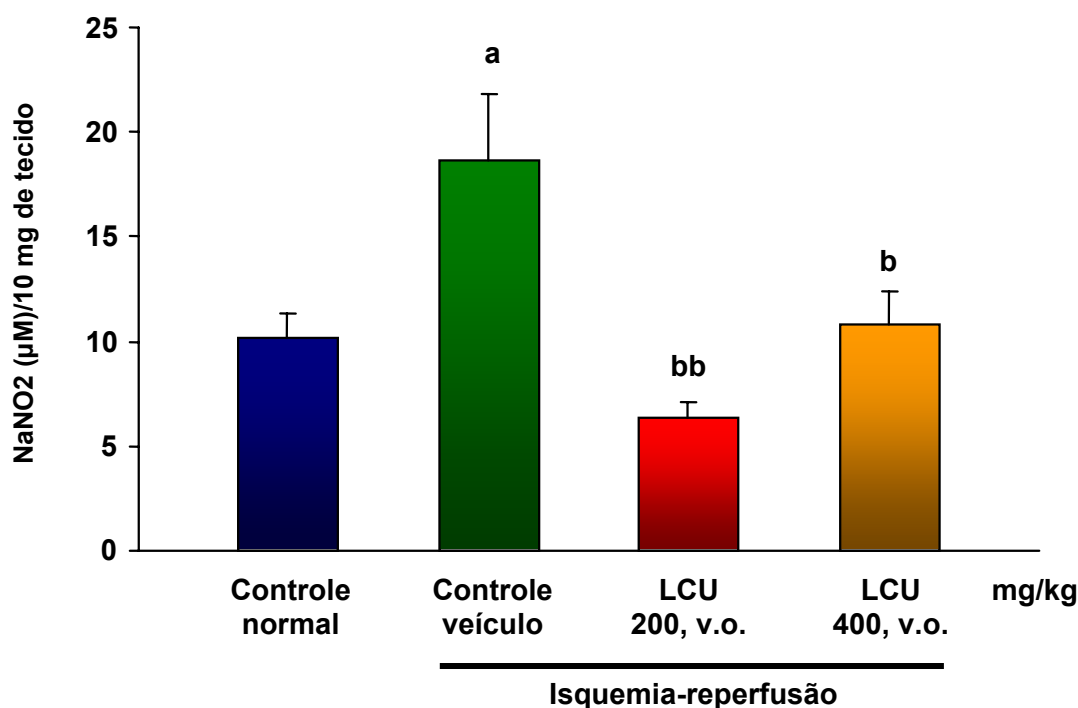


FIGURA 15. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a concentração de nitrito na mucosa ileal dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.o.) com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24, 12 e 2 h antes da indução da isquemia. Para a realização do procedimento cirúrgico, a artéria mesentérica superior dos animais foi clampeada por 45 min, por meio de laparotomia, em seguida o clampe foi retirado para que houvesse reperfusão do tecido por 1 h. Um outro grupo foi tratado com veículo (controle normal, 10 mL/kg, v.o.) 24, 12 e 2 h antes do mesmo procedimento experimental, contudo sem o clameamento da artéria. Os animais foram então sacrificados, o íleo foi retirado e limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e 200 mg de mucosa foram separados para dosagem de nitrito (NaNO₂). As colunas representam a média ± E.P.M. da concentração de NaNO₂ (μM) em 10 mg de tecido. ^ap<0,01 comparado ao grupo controle normal; ^bp<0,01 e ^{bb}p<0,001 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

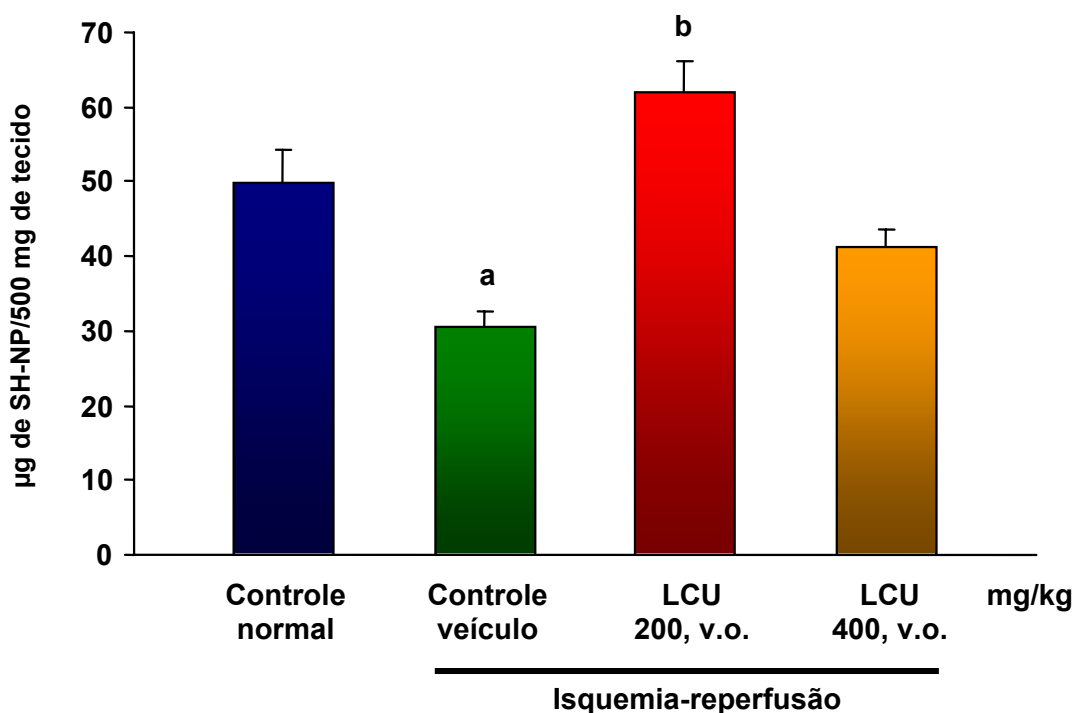


FIGURA 16. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a quantidade de grupos sulfidrílicos não protéicos (SH-NP) na mucosa ileal dos animais no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos. Ratos Wistar (machos, 150-180 g, n=6) foram tratados (v.o.) com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg) 24, 12 e 2 h antes da indução da isquemia. Para a realização do procedimento cirúrgico, a artéria mesentérica superior dos animais foi clampeada por 45 min, por meio de laparotomia, em seguida o clampe foi retirado para que houvesse reperfusão do tecido por 1 h. Um outro grupo foi tratado com veículo (controle normal, 10 mL/kg, v.o.) 24, 12 e 2 h antes do mesmo procedimento experimental, contudo sem o clameamento da artéria. Os animais foram então sacrificados, o íleo foi retirado e limpo em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e 500 mg de mucosa foram separados para dosagem de SH-NP. As colunas representam a média \pm E.P.M. da quantidade de SH-NP (μg) em 500 mg de tecido. ^a $p < 0,01$ comparado ao grupo controle normal e ^b $p < 0,001$ comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

4.5 MODELOS DE DOR VISCERAL

4.5.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

No modelo de contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético (0,6%; 10 mL/kg) em camundongos, a administração de morfina (5 mg/kg, s.c.) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o número de contorções abdominais apresentadas pelos animais ($0,14 \pm 0,14$) em relação ao grupo controle veículo ($42,33 \pm 3,78$) (Figura 17).

O tratamento com LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,05$) o número de contorções para $31,17 \pm 4,21$ e $29,17 \pm 4,45$, respectivamente, quando estes valores foram comparados ao valor registrado no grupo controle veículo (Figura 17). Evidenciando, assim, uma atividade antinociceptiva visceral do LCU.

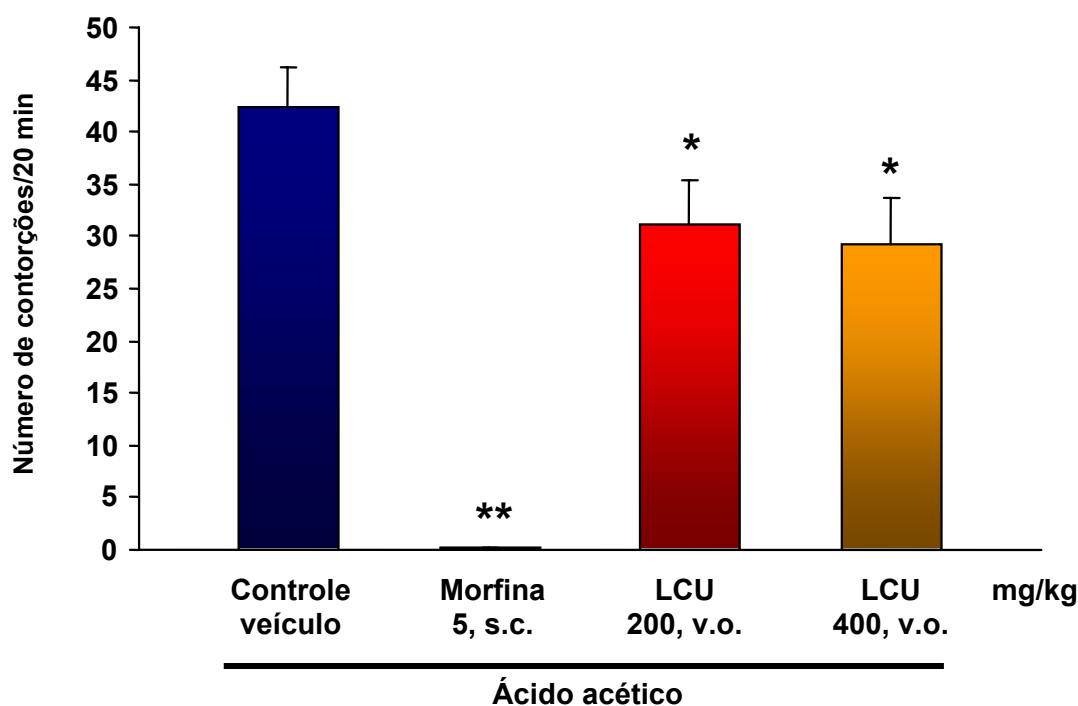


FIGURA 17. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o número de contorções no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo a resposta nociceptiva foi induzida através da injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%), diluído em solução salina (NaCl 0,9%), em um volume de 10 mL/kg de peso corpóreo do animal. A nocicepção foi avaliada através do registro do número de contorções abdominais realizadas pelo animal durante um período de 20 min, contados a partir da administração do agente álgico. As colunas representam a média ± E.P.M. do número de contorções de cada um dos grupos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

4.5.2 Cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos

No modelo de cistite induzida por ciclofosfamida (400 mg/kg, i.p.), houve uma elevação significativa ($p < 0,001$) no tempo de crises transitórias do grupo controle veículo ($12,25 \pm 2,98$ min), quando este valor foi comparado ao obtido no grupo controle normal ($2,03 \pm 0,38$ min) (Figura 18). A N-acetil-cisteína (750 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o tempo de crises para $1,02 \pm 0,18$ min, quando este valor foi comparado ao obtido no grupo controle veículo (Figura 18). O LCU nas doses de 200 e 400 mg/kg também foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,001$) o tempo de crises para $2,60 \pm 0,49$ e $2,33 \pm 0,36$ min, respectivamente (Figura 18).

Quanto aos escores para comportamento nociceptivo, registrados a cada intervalo de 30 min durante um período de 2 min de observação, o grupo controle veículo mostrou elevação significativa ($p < 0,001$) deste [52 (26-72)] em relação ao grupo controle normal [2 (0-21)] (Tabela 5). A N-acetil-cisteína (750 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) os escores para comportamento nociceptivo [2 (0-6)] em relação ao grupo controle veículo (Tabela 5). O LCU, na dose de 400 mg/kg, também reduziu significativamente ($p < 0,05$) tal escore [12 (3-52)] em relação ao grupo controle veículo (Tabela 5). Na dose de 200 mg/kg, o LCU reduziu os escores [14 (2-51)], contudo esta redução não foi considerada estatisticamente significativa (Tabela 5).

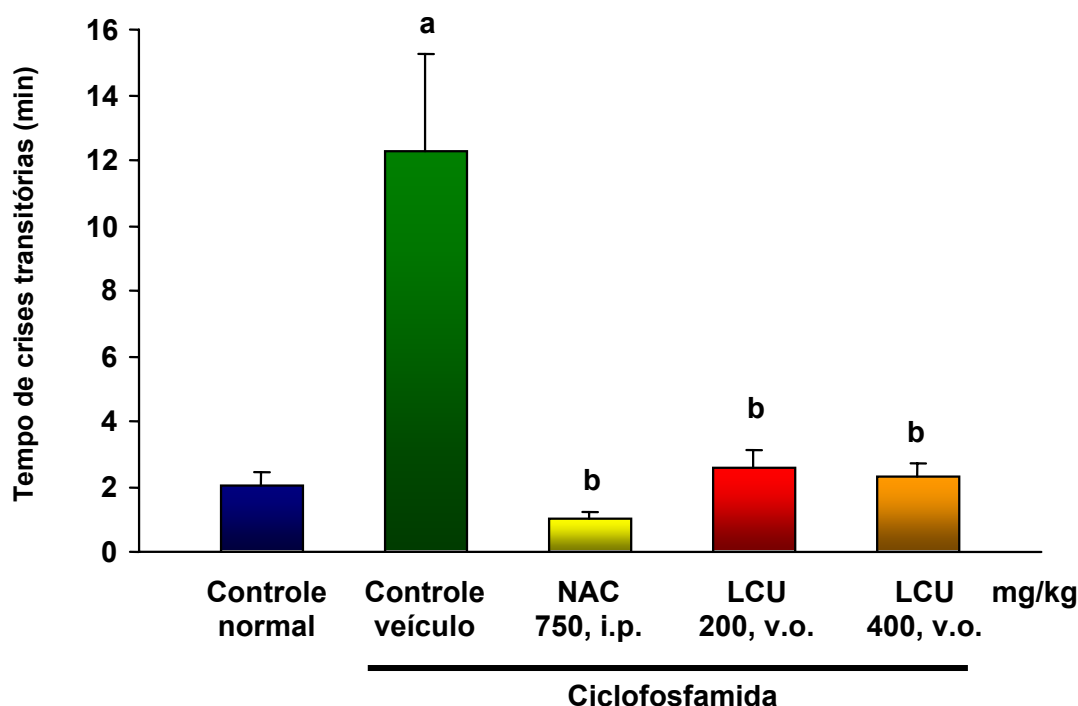


FIGURA 18. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o tempo de crises transitórias no modelo de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.), N-acetil-cisteína (NAC, 750 mg/kg, i.p.) ou LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 1 h antes da administração de ciclofosfamida (400 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a administração da ciclofosfamida os animais foram observados, durante 8 intervalos de 30 min, para o registro do tempo de crises transitórias (piloereção, lamber o abdômen, arrastar o abdômen contra o solo, contorcer ou retraindo o abdômen), em minutos. Um grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.o.) e recebeu solução salina (10 mL/kg, i.p.) em substituição à ciclofosfamida. As colunas representam a média \pm E.P.M. do tempo de crises transitórias (min) dos animais durante os 8 intervalos de 30 min. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal e ^bp<0,001 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

TABELA 5. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o escore para comportamento nociceptivo no modelo de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos.

Tratamento	Escore
Controle normal (água destilada, 10 mL/kg, v.o.)	2 (0-21)
Controle veículo (água destilada, 10 mL/kg, v.o.)	52 (26-72) ^a
N-acetil-cisteína (750 mg/kg, i.p.)	2 (0-6) ^{bb}
LCU (200 mg/kg, v.o.)	14 (2-51)
LCU (400 mg/kg, v.o.)	12 (3-52) ^b

Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados 48, 24 e 1 h antes da administração de ciclofosfamida (400 mg/kg, i.p.) diluída em solução salina (NaCl 0,9%). Imediatamente após a administração da ciclofosfamida os animais foram colocados individualmente em caixas plásticas e observados durante 2 min, a cada intervalo de 30 min, para a aferição de um escore ao seu comportamento nociceptivo. Foram utilizados 8 períodos de observação. O grupo controle normal recebeu apenas solução salina (10 mL/kg, i.p.) em substituição à ciclofosfamida. Resultados expressos como mediana e valores mínimo e máximo dos escores obtidos durante os 8 intervalos de 2 min de observação. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal; ^bp<0,05 e ^{bb}p<0,001 comparado ao grupo controle veículo (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn).

4.5.3 Dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos

A administração de capsaicina (0,3%, 50 μ L) por via intracolônica elevou significativamente ($p < 0,001$) o número de comportamentos nociceptivos relacionados à dor visceral no grupo controle veículo ($55,00 \pm 3,25$), quando este valor foi comparado ao registrado no grupo controle normal ($9,75 \pm 3,72$) (Figura 19). A morfina (7,5 mg/kg, s.c.) reduziu significativamente ($p < 0,001$) a expressão de tais comportamentos ($4,28 \pm 1,46$), em relação ao grupo controle veículo (Figura 19). O LCU também reduziu de forma significativa a frequência destes comportamentos, mostrando valores de $16,12 \pm 4,29$ ($p < 0,001$) no grupo tratado com a menor dose e $37,62 \pm 5,78$ ($p < 0,05$) no grupo tratado com a maior dose (Figura 19).

Em um segundo procedimento experimental, buscando investigar possível participação dos receptores opióides e do NO na atividade antinociceptiva visceral do LCU, foi verificado que o pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) inibiu de forma significativa ($p < 0,01$) o efeito antinociceptivo da morfina (7,5 mg/kg, s.c.) ($29,57 \pm 5,62$), quando este valor foi comparado ao obtido no grupo tratado apenas com morfina (7,5 mg/kg, s.c.) ($4,72 \pm 1,61$) (Figura 20). Da mesma forma, o pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter de forma significativa ($p < 0,01$) o efeito antinociceptivo do LCU (200 mg/kg, v.o.) ($53,28 \pm 9,91$), quando este valor foi comparado ao obtido no grupo tratado apenas com o LCU na mesma dose ($22,71 \pm 5,04$) (Figura 20). O L-NAME (20 mg/kg, i.p.) não foi capaz de potencializar o efeito do LCU (200 mg/kg), tendo este grupo mostrado $19,00 \pm 5,56$ comportamentos nociceptivos (Figura 20).

Em um terceiro procedimento utilizando este modelo experimental e buscando investigar possível participação dos receptores α_2 -adrenérgicos na atividade antinociceptiva visceral do LCU, foi verificado que a clonidina (100 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente ($p < 0,001$) o número de comportamentos nociceptivos ($6,50 \pm 2,46$), quando este valor foi comparado ao obtido no grupo controle veículo ($62,80 \pm 1,90$) (Figura 21). Este efeito antinociceptivo da clonidina foi revertido de forma significativa ($p < 0,001$) pelo pré-tratamento com ioimbina (2 mg/kg, i.p.) ($44,20 \pm 6,88$) (Figura 21). Contudo, o pré-tratamento com ioimbina (2 mg/kg, i.p.) não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do LCU (200 mg/kg, v.o.) ($4,80 \pm 1,20$), quando este foi comparado ao valor encontrado no grupo tratado apenas com o LCU na mesma dose ($18,66 \pm 3,55$), ao contrário, a ioimbina pareceu potencializar o efeito deste, no entanto não foi encontrada diferença significativa entre o número de comportamentos nociceptivos do grupo tratado com LCU e do grupo tratado com ioimbina em associação ao LCU (Figura 21).

O mesmo modelo foi também utilizado para a avaliação de um possível envolvimento dos receptores vanilóides na atividade antinociceptiva visceral do LCU. Verificamos que o vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.), um antagonista não competitivo da capsaicina, quando administrado isoladamente, foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,01$) o número de comportamentos nociceptivos ($28,20 \pm 6,64$) em relação ao grupo controle veículo ($59,00 \pm 6,79$), assim como o LCU na dose de 200 mg/kg (v.o.) ($29,17 \pm 4,82$) (Figura 22). Contudo, quando o LCU (200 mg/kg) foi administrado em associação ao vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.), não houve uma potencialização na atividade antinociceptiva deste ($25,83 \pm 4,21$) (Figura 22), indicando um possível efeito do LCU sobre os receptores vanilóides.

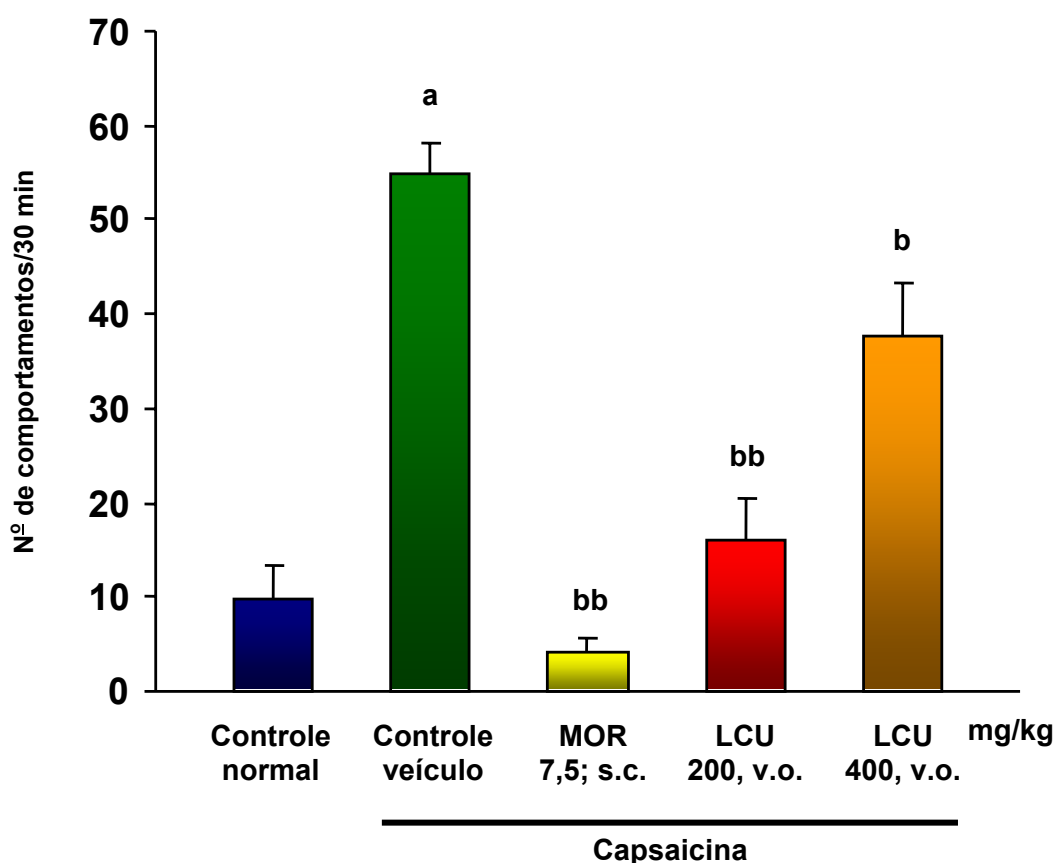


FIGURA 19. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o número de comportamentos nociceptivos no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.), morfina (MOR; 7,5 mg/kg, s.c.) ou LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, os animais receberam capsaicina (0,3%, 50 µL, via intracolônica). Imediatamente após a administração de capsaicina, foi registrado, durante 30 min, o número de comportamentos nociceptivos dos animais relacionados à dor visceral (lamber o abdômen, contorcer-se, arrastar a região abdominal baixa contra o solo e retraindo o abdômen). Um grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.o.) e recebeu apenas o veículo da capsaicina por via intracolônica (50 µL). As colunas representam a média ± E.P.M. do número de comportamentos nociceptivos. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal; ^bp<0,05 e ^{bb}p<0,001 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

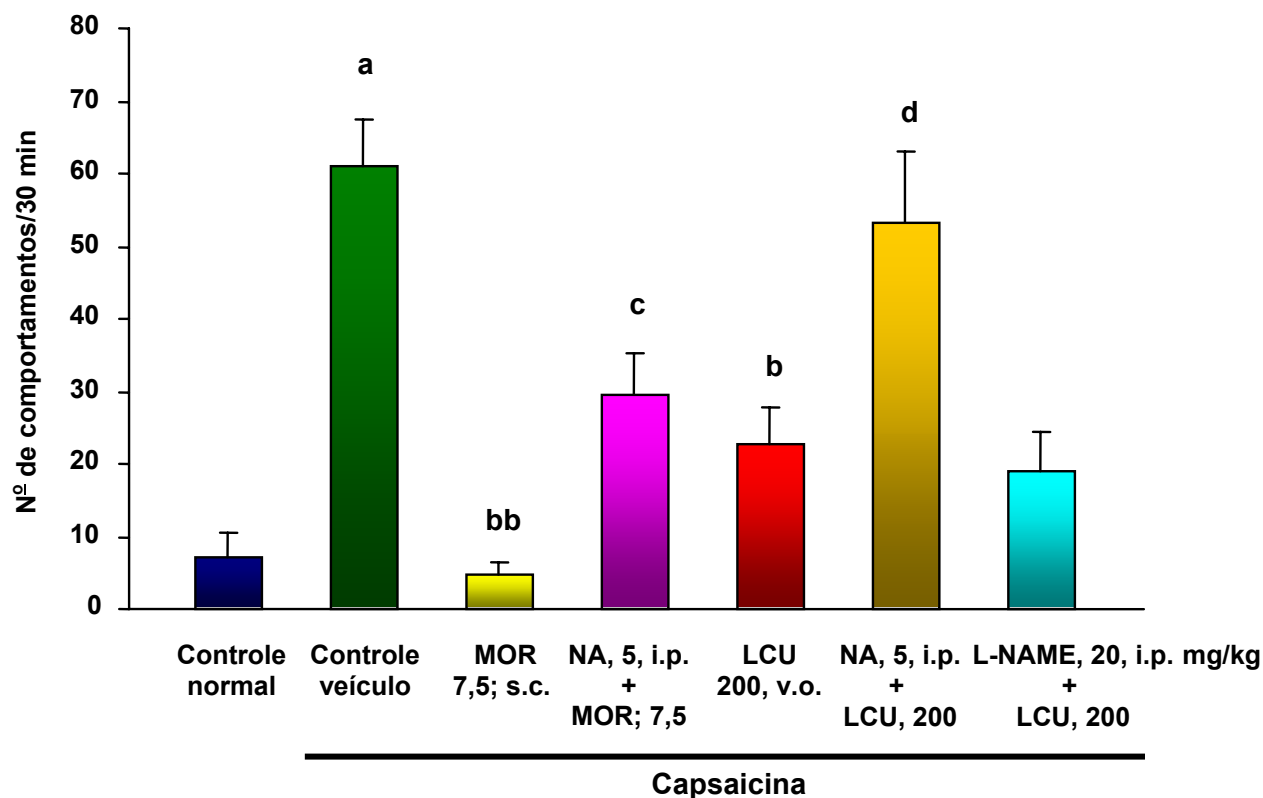


FIGURA 20. Efeito da naloxona e do L-nitro arginina metil éster sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.); morfina (MOR; 7,5 mg/kg, s.c.); naloxona (NA, 5 mg/kg, i.p.), 15 min antes de MOR (7,5 mg/kg, s.c.); LCU (200 mg/kg, v.o.); naloxona (5 mg/kg, i.p.), 15 min antes de LCU (200 mg/kg, v.o.) ou L-nitro arginina metil éster (L-NAME, 20 mg/kg, i.p.), 15 min antes de LCU (200 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento v.o. ou 30 min após o tratamento s.c., os animais receberam capsaicina (0,3%, 50 µL, via intracolônica) e em seguida foi registrado o número de comportamentos nociceptivos destes (lamber o abdômen, contorcer-se, arrastar a região abdominal baixa contra o solo e retrair o abdômen) durante 30 min. Um grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.o.) e recebeu apenas o veículo da capsaicina por via intracolônica (50 µL). As colunas representam a média ± E.P.M. do número de comportamentos nociceptivos. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal; ^bp<0,01 e ^{bb}p<0,001 comparado ao grupo controle veículo; ^cp<0,01 comparado ao grupo MOR e ^dp<0,01 comparado ao grupo LCU (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

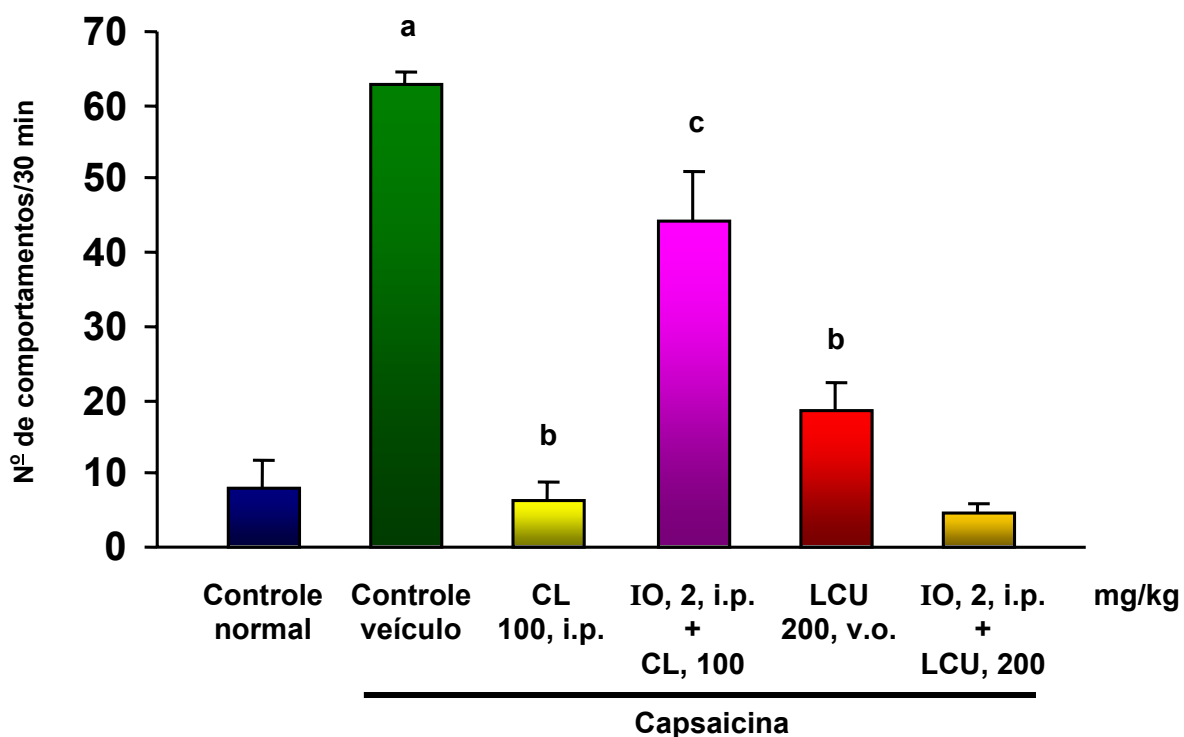


FIGURA 21. Efeito da ioimbina sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.); clonidina (CL, 100 mg/kg, i.p.); ioimbina (IO, 2 mg/kg, i.p.), 15 min antes de clonidina (100 mg/kg, i.p.); LCU (200 mg/kg, v.o.) ou ioimbina (2 mg/kg, i.p.), 15 min antes de LCU (200 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento com veículo ou LCU, ou 30 min após o tratamento com clonidina, os animais receberam capsaicina (0,3%, 50 µL, via intracolônica) e em seguida foi registrado o número de comportamentos nociceptivos destes (lamber o abdômen, contorcer-se, arrastar a região abdominal baixa contra o solo e retrair o abdômen) durante 30 min. Um grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.o.) e recebeu apenas o veículo da capsaicina por via intracolônica (50 µL). As colunas representam a média ± E.P.M. do número de comportamentos nociceptivos. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal; ^bp<0,001 comparado ao grupo controle veículo e ^cp<0,001 comparado ao grupo clonidina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

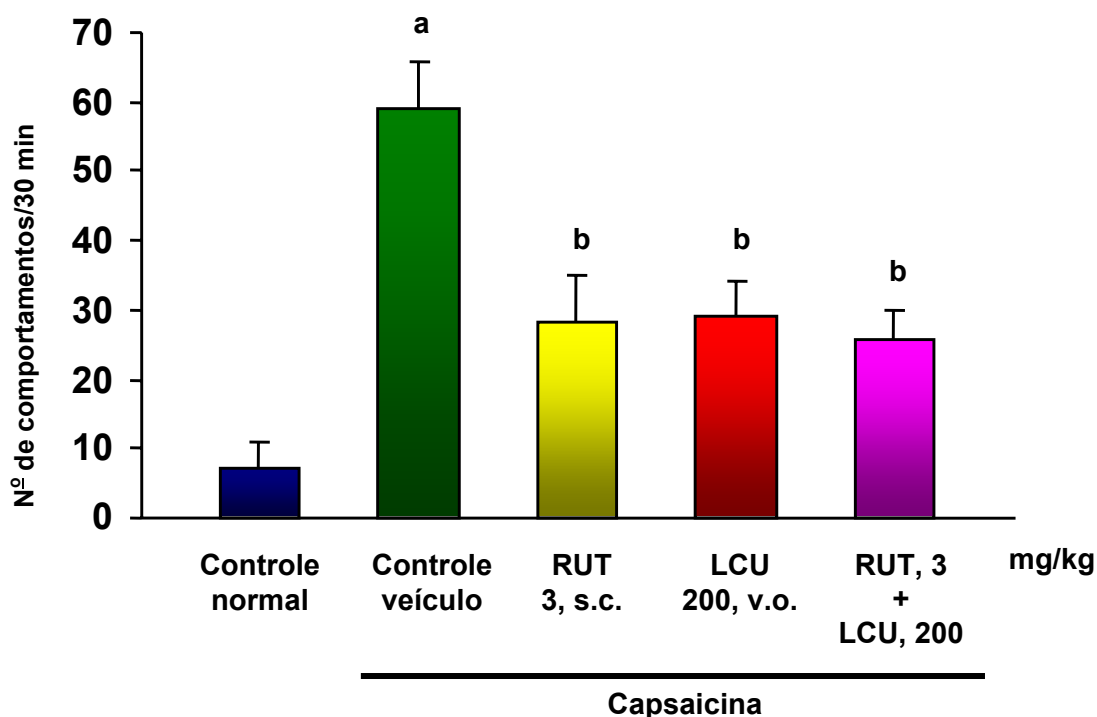


FIGURA 22. Efeito do vermelho de rutênio sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina em camundongos. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.); vermelho de rutênio (RUT, 3 mg/kg, s.c.); LCU (200 mg/kg, v.o.) ou vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.) em associação ao LCU (200 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento com veículo ou LCU, administrado isoladamente ou em associação, ou 45 min após o tratamento apenas com vermelho de rutênio os animais receberam capsaicina (0,3%, 50 µL, via intracolônica) e em seguida foi registrado o número de comportamentos nociceptivos destes (lamber o abdômen, contorcer-se, arrastar a região abdominal baixa contra o solo e retrair o abdômen) durante 30 min. Um grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.o.) e recebeu apenas o veículo da capsaicina por via intracolônica (50 µL). As colunas representam a média ± E.P.M. do número de comportamentos nociceptivos. ^ap<0,001 comparado ao grupo controle normal e ^bp<0,01 comparado ao grupo controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

4.6 TEMPO DE SONO INDUZIDO POR PENTOBARBITAL EM CAMUNDONGOS

A clorpromazina (10 mg/kg, i.m.) prolongou de forma significativa ($p < 0,001$) o tempo de sono dos animais, induzido pela administração de pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) ($120,00 \pm 0,00$ min) quando este valor foi comparado ao obtido no grupo controle veículo ($54,37 \pm 7,59$ min) (Figura 23).

O LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, não alterou de forma significativa o tempo de sono dos animais ($54,50 \pm 7,60$ e $47,00 \pm 3,14$ min, respectivamente) em relação ao grupo controle veículo (Figura 23).

4.7 MODELOS DE ESTUDO DO DESEMPENHO MOTOR DOS ANIMAIS

4.7.1 Teste do campo aberto em camundongos

No teste do campo aberto o LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, não alterou de forma significativa o número de secções transpassadas pelos animais ($46,71 \pm 4,00$ e $48,71 \pm 3,78$, respectivamente), quando estes valores foram comparados ao obtido no grupo controle veículo ($52,87 \pm 4,21$) (Figura 24).

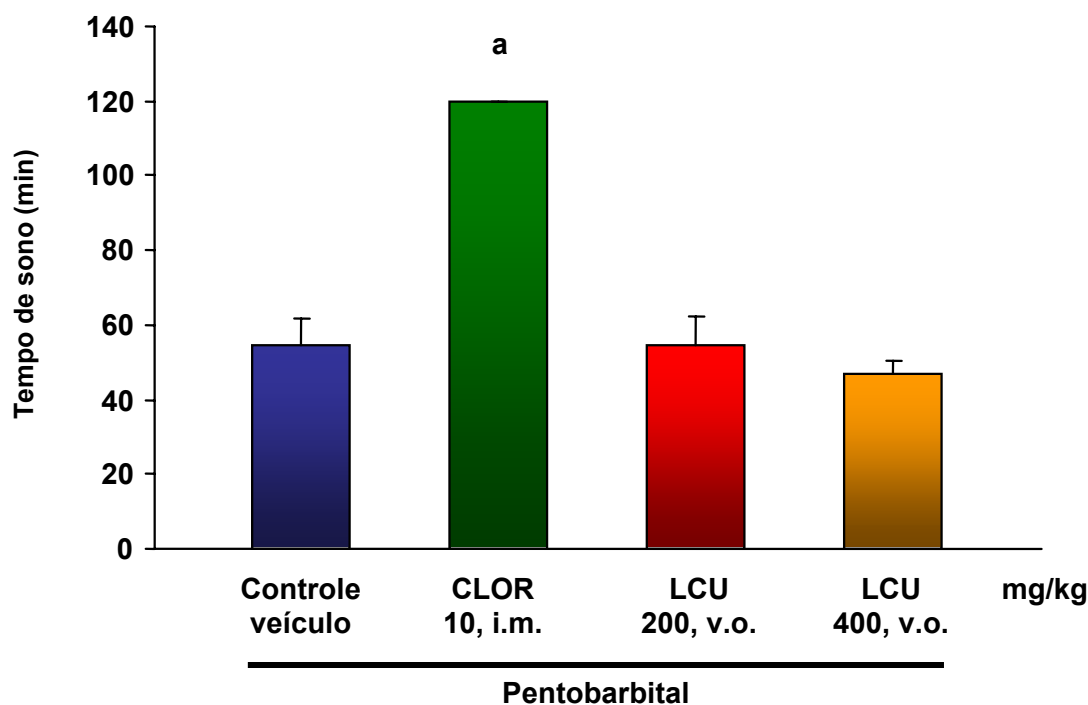


FIGURA 23. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados com veículo (controle veículo, 10 mL/kg, v.o.), clorpromazina (CLOR, 10 mg/kg, i.m.) ou LCU (200 e 400 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento v.o. ou 30 min após o tratamento i.m. os animais receberam uma injeção de pentobarbital sódio (40 mg/kg, i.p.) como agente indutor de sono. Iniciado o período de sono, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e observados durante 120 min para o registro do tempo de sono, em minutos, tendo como parâmetro indicativo de retorno à situação de alerta o momento no qual o animal saiu voluntariamente da posição de decúbito dorsal. As colunas representam a média \pm E.P.M. do tempo de sono (min) dos animais. ^ap<0,001 comparado ao grupo Controle veículo (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

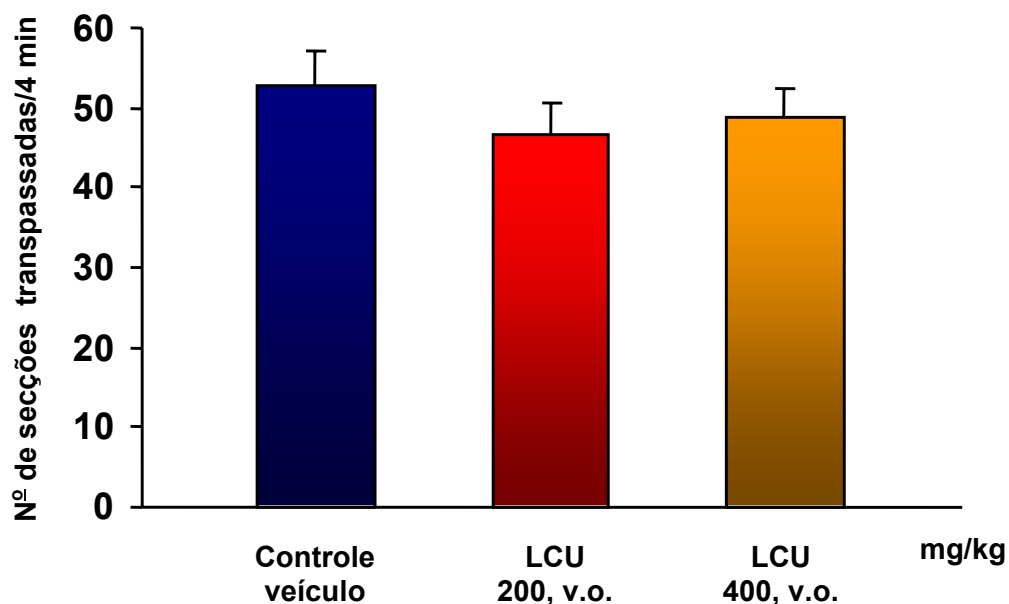


FIGURA 24. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a atividade motora espontânea de camundongos no teste do campo aberto. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados por via oral com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg). Uma hora após o tratamento todos os animais foram levados individualmente ao campo aberto e, após 1 min de ambientação, observados durante 4 min, sendo registrado o número de secções transpassadas pelo animal. As colunas representam a média \pm E.P.M. do número de secções transpassadas pelos animais durante o período de observação (ANOVA).

4.7.2 Teste do “rotarod” em camundongos

No teste do “rotarod” o LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, não alterou de forma significativa o tempo de permanência dos animais no aparelho ($120,00 \pm 0,00$ e $120,00 \pm 0,00$ seg, respectivamente), quando estes valores foram comparados ao registrado no grupo controle veículo ($116,25 \pm 3,75$ seg) (Figura 25).

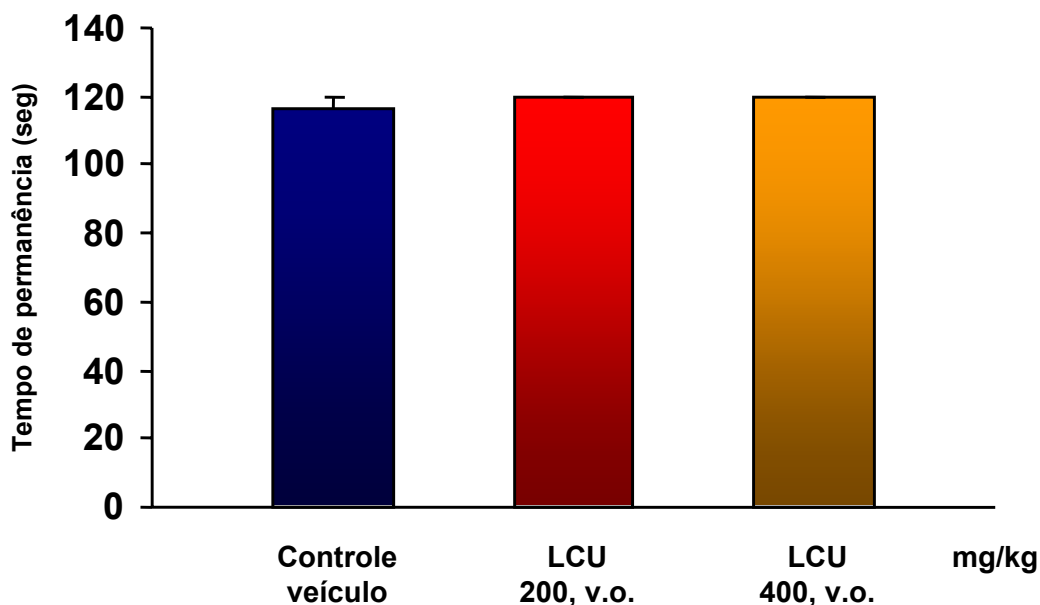


FIGURA 25. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o tempo de permanência dos animais no teste do “rotarod”. Camundongos Swiss (machos, 25-30 g, n=8) foram tratados por via oral com veículo (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (200 e 400 mg/kg). Uma hora após o tratamento, os animais foram colocados no aparelho de “rotarod” para registro do tempo de permanência do animal no mesmo. O tempo máximo de permanência permitido foi de 120 segundos. As colunas representam a média \pm E.P.M. do tempo de permanência dos animais em segundos (ANOVA).

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Existem alguns critérios fundamentais a serem seguidos no estudo de plantas. O primeiro deles é procurar informações na medicina popular para orientar o estudo farmacológico dos extratos. O segundo é utilizar o método mais simples possível para localizar e isolar compostos ativos e determinar se estes compostos são responsáveis pela atividade do extrato. O presente estudo, tendo como base o uso popular do *Croton urucurana* Baill. em processos inflamatórios, feridas infectadas, cólicas intestinas e doenças diarréicas, teve o objetivo de validar sua utilização como antiinfecioso, antiinflamatório intestinal e antinociceptivo visceral avaliando sua influência em modelos animais de inflamação intestinal e dor visceral *in vivo* e em modelos *in vitro* de estudo das atividades antibacteriana e antifúngica.

O interesse na realização do presente trabalho surgiu devido à incidência significativa de DFG e DII em todo o mundo e ao enorme impacto destas doenças na qualidade de vida dos pacientes. Além disso, a incidência de DII tem crescido dramaticamente em países em desenvolvimento (THOMPSON et al., 2000).

As DII representam algumas das doenças mais desafiantes e frustrantes para médicos e pacientes, e o impacto das DII na vida dos pacientes pode ser enorme.

São encontrados na literatura poucos estudos utilizando o *Croton urucurana*. Pesquisas anteriores mostraram que o LCU inibe o trânsito e a secreção intestinal (GURGEL et al., 2001) e apresenta atividades antinociceptiva, antiinflamatória, antiespasmódica e cicatrizante (MATTOS, 2001). Mattos (2001) verificou que a atividade antinociceptiva do látex envolve a interação com o sistema opióide,

eicosanóides e neuropeptídeos (taquicininas e/ou peptídeos excitatórios) e seu efeito antiinflamatório envolve a inibição de mediadores da resposta inflamatória (prostaglandinas, 5-HT, histamina, substância P e leucotrienos) e inibição da migração celular. Também foi verificado que algumas frações e substâncias isoladas obtidas a partir da casca do tronco do *Croton urucurana*, como o ácido acetil aleurítico, possuem atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (PERES et al., 1997).

Estudos toxicológicos mostraram que o látex obtido do *Croton urucurana* apresenta baixa toxicidade aguda com uma DL₅₀, administrada por via oral, de 5,20 ± 0,13 g/kg (GURGEL, 2000) e aparente ausência de toxicidade subcrônica uma vez que não houve modificação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e nutricionais após tratamento com o LCU nas doses de 300 e 2.000 mg/kg (v.o.), durante 30 dias (MATTOS, 2001).

Estudo fitoquímico do látex do *Croton urucurana* obtido no mesmo local de coleta do látex utilizado no presente estudo, contudo em diferente época, revelou a presença de saponinas, esteróides, taninos pirogálicos, taninos catéquicos, catequinas, flavonóis, flavonas, antocianinas, antocianidinas e alcalóides (GURGEL, 2000; MATTOS, 2001). Três alcalóides foram isolados do LCU, entre eles a taspina, composto ativo freqüentemente associado às principais atividades terapêuticas desta planta (MATTOS, 2001). A presença de taspina no LCU foi confirmada por análises espectroscópicas de massa, IV, UV, RMN ¹H e ¹³C (MATTOS, 2001).

O *Croton urucurana* pertence à família Euforbiacea, e os mais potentes promotores de tumor, os ésteres de forbol, são extraídos de espécies pertencentes a esta família (VAISBERG et al., 1989). Contudo, o *Sangre de Grado*, obtido do *Croton*

lechleri Muell. Arg., não apresentou atividade carcinogênica ou promotora de tumor após 17 meses de tratamento, em modelo animal usando camundongos (VAISBERG et al., 1989). Portanto, possivelmente o *Sangre de Grado* não apresenta em sua composição quantidade considerável destes ésteres, além disso, os estudos até então realizados com o *Croton urucurana* não demonstraram a presença de ésteres de forbol, diterpenos com atividade carcinogênica (FARIAS et al., 1996), o que é favorável à sua utilização terapêutica.

Muitos laboratórios de produtos naturais têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Dentre estes bioensaios, encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina*, que se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas. Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais utilizando este teste na monitoração de estudos fitoquímicos (SIQUEIRA et al., 1998). A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes.

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como parasiticida (SAHPAZ et al., 1994), antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MACRAE; HUDSON; TOWERS, 1988), entre outras.

Neste teste, as substâncias são consideradas ativas quando a toxicidade para *Artemia salina* for menor que 1.000 ppm (MEYER et al., 1982). A CL_{50} encontrada para o LCU foi de $100,00 \pm 3,52 \mu\text{g/mL}$, esta concentração equivale a aproximadamente 243,3 ppm do LCU. Portanto, o LCU mostrou-se ativo neste

modelo experimental. Além disso, o LCU demonstrou ser cinco vezes menos tóxico que o dicromato de potássio, substância utilizada como controle positivo neste teste.

A atividade do LCU no teste de toxicidade sobre *Artemia salina* sugere que o mesmo poderia agir equilibrando a flora intestinal nos pacientes com DII ou DFG, assim como os probióticos, no entanto mais estudos são necessários para investigar este possível efeito do LCU.

Tendo o LCU mostrado atividade no teste de toxicidade sobre *Artemia salina*, foram então realizados novos testes com a finalidade de investigar uma possível atividade antimicrobiana do látex.

No método de difusão em poços no ágar, utilizado para estudo da atividade antibacteriana do LCU contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, não houve formação de zona de inibição de crescimento nas placas após o período de incubação. Sugerindo que o LCU, nas doses testadas, não possui atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*. No entanto, o LCU tem sido popularmente utilizado no tratamento de infecções, além disso, em 1997, Peres et al. demonstraram a atividade antibacteriana do extrato aquoso-etanólico, de quatro frações do extrato metanólico e de substâncias isoladas (catequina e ácido acetil aleurítico) da casca do tronco do *Croton urucurana* contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. A diferença entre estes resultados pode ter ocorrido em virtude da constituição química da casca e do látex da planta serem diferentes e/ou devido ao fato de o material ter sido coletado de locais e em épocas diferentes.

Como os dermatófitos são responsáveis por infecções de pele, possuindo considerável importância clínica, e o *Sangre de Grado* é utilizado popularmente no

tratamento de feridas de pele de diversas origens, foi avaliada uma possível atividade antifúngica do LCU contra cinco diferentes espécies de dermatófitos: *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*.

O LCU, nas quatro maiores concentrações utilizadas, produziu zonas de inibição de crescimento concentração-dependentes contra todas as cepas testadas. A griseofulvina, utilizada como controle positivo do experimento produziu zonas de inibição comparativamente maiores. A baixa eficácia do LCU em relação à griseofulvina pode ser explicada, dentre outros fatores, por sua natureza bruta.

Os dermatófitos são fungos queratinofílicos que compreendem os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. O LCU demonstrou possuir um amplo espectro contra dermatófitos, sendo efetivo contra seus três gêneros.

As frações aquosa e acetona foram testadas contra *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* e não mostraram zonas de inibição estatisticamente diferentes das zonas registradas com o LCU, na mesma concentração, obtidas contra estas espécies testadas.

O estudo fitoquímico realizado com a fração acetona do LCU identificou a presença de galocatequina e epigalocatequina, substâncias com atividade antifúngica (OKUBO et al., 1991). Portanto, a presença destas substâncias pode explicar a atividade antifúngica desempenhada pelo LCU.

O uso de compostos antifúngicos de forma profilática tem se tornado uma prática clínica relativamente comum para pacientes que estão sendo tratados de condições hematológicas malignas, contudo existem poucas evidências que

justifiquem este uso (DE PAUW, 2004). Alguns estudos, por exemplo, mostraram que o fluconazol reduz a mortalidade em pacientes com leucemia (BOW et al., 2002; CORNELLY; ULLMANN; KARTHAUS, 2003; KANDA et al., 2000).

Os resultados deste estudo explicam e justificam, pelo menos em parte, o uso popular desta planta no tratamento de feridas infectadas por fungos e sugerem que o *Sangre de Grado* obtido do *Croton urucurana* possui uma atividade antifúngica que pode ser explorada como uma alternativa de tratamento para as dermatofitoses ou ainda, que o LCU pode ser utilizado em associação com outros antimicóticos permitindo o uso de doses menores e evitando, assim, problemas como os efeitos colaterais ou resistência.

A atividade do LCU também foi avaliada em modelo experimental que simula a DII humana.

A colite ativa em pacientes com DII está associada com vasodilatação da mucosa, aumento na permeabilidade intestinal e motilidade colônica anormal. Estudos em pacientes com DII mostraram elevado aumento na síntese de NO (LUNDBERG et al., 1994; MIDDLETON; SHORTHOUSE; HUNTER, 1993) e na atividade da NOSi (BOUGHTON-SMITH et al., 1993) na mucosa inflamada de pacientes com colite ulcerativa, comparado com um grupo controle sem inflamação. O excesso de NO pode causar redução no tônus colônico, hiperemia intestinal e lesão tecidual, devido à formação de produtos reativos do NO como o peroxinitrito (RACHMILEWITZ et al., 1995). O NO também pode estar envolvido na regulação/amplificação da inflamação (REMICK; VILLARETE, 1996). Durante a inflamação, a maior parte do NO é produzida nas células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, pela NOSi (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Agora já está bem estabelecido que ERO, como o superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso são produzidas em excesso pela mucosa inflamada nas DII e podem ser patogênicas (BABBS, 1992; SEDGHI et al., 1994). O estresse oxidativo resultante pode se sobrepor às defesas endógenas que regulam a produção de ERO durante o metabolismo normal, particularmente se existir comparativamente baixos níveis teciduais de antioxidantes endógenos, como na mucosa colônica (GRISHAM; MACDERMOTT; DEITCH, 1990).

Durante os últimos 20 anos foram desenvolvidos mais de 20 modelos experimentais com uma ampla variedade de manifestações clínicas similares às observadas nas DII humanas (JURJUS; KHOURY; REIMUND, 2004). Estes modelos contribuíram bastante para os avanços importantes em nossos conhecimentos atuais acerca dos mecanismos da inflamação e da patogênese da doença, assim como de seu tratamento.

A instilação de ácido acético diluído no lúmen do intestino induz, de forma dose-dependente, necrose do epitélio e da mucosa e inflamação transitória (ELSON et al., 1995). A injúria inicial neste modelo é uma necrose epitelial leve e edema na lâmina própria, submucosa ou camadas musculares externas que varia de extensão, dependendo da concentração e da duração de exposição ao ácido acético (JURJUS; KHOURY; REIMUND, 2004). Uma isquemia transitória local também pode contribuir com a lesão aguda. A inflamação da mucosa e da submucosa acompanha a lesão inicial e é associada com a ativação da cascata do ácido araquidônico (ELSON et al., 1995).

A colite induzida por ácido acético é um modelo de DII facilmente induzida e a similaridade dos mediadores inflamatórios envolvidos com a DII sugere que a fase

inflamatória guarda semelhança com a inflamação intestinal aguda em humanos (ELSON et al., 1995). A colite induzida por ácido acético divide algumas outras características com a colite ulcerativa aguda que se desenvolve em humanos (FITZPATRICK et al., 1990), incluindo características histopatológicas (FABIA et al., 1992) e o papel do NO (RACHMILEWITZ et al., 1995). O tratamento com drogas antioxidantes melhora os escores macroscópicos e microscópicos deste modelo (CHOUDHARY et al., 2001).

O modelo experimental de colite induzida por ácido acético é um dos modelos mais utilizados na pesquisa de drogas eficazes contra as doenças inflamatórias intestinais (MACPHERSON; PFEIFFER, 1978; NOA et al., 2000; SHARON; STENSON, 1985) onde mediadores inflamatórios como ERO, aminas vasoativas e eicosanóides desempenham um papel importante (CARTY et al., 2000; LOGUERCIO et al., 1996; SEO et al., 1995).

O presente estudo demonstrou que o LCU, nas doses utilizadas, preveniu a lesão tecidual no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos, o que foi verificado através de seu efeito sobre o peso úmido do tecido, a análise histopatológica e os achados bioquímicos.

O peso úmido do tecido colônico inflamado é considerado um indicador confiável e sensível da severidade e extensão da resposta inflamatória (RACHMILEWITZ et al., 1989). O LCU nas doses testadas reduziu significativamente a relação peso úmido/comprimento do cólon em relação ao grupo controle veículo, contudo ele não foi capaz de reduzir de forma significativa o escore macroscópico de lesão tecidual. Além disso, o LCU reduziu os sinais histológicos de inflamação, o que

foi evidenciado pela redução significativa do escore microscópico de lesão tecidual no grupo tratado com a maior dose do LCU em relação ao grupo controle veículo.

O LCU foi capaz de reduzir a atividade da mieloperoxidase, uma enzima presente nos neutrófilos e, em menores concentrações, em monócitos e macrófagos (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984). A mieloperoxidase é uma enzima liberada de grânulos após a ativação dos neutrófilos por um estímulo inflamatório, e catalisa a formação de ácido hipocloroso (KETTLE; GEDYE; WINTERBOURN, 1997). Uma redução na atividade desta enzima pode ser interpretada como uma manifestação de atividade antiinflamatória por um determinado composto (VELJACA et al., 1995).

Estudos mostraram que o aumento da atividade da mieloperoxidase está presente em vários processos patológicos e está associado com um aumento do risco ao estresse oxidativo, como no caso de enfermidades infecciosas, enfermidades inflamatórias e na isquemia-reperfusão (MORALES; ROCHE; SÁNCHEZ, 1998). Este aumento na atividade da mieloperoxidase ocorre em proporção direta ao número de neutrófilos no tecido e sua atividade pode ser utilizada como índice de migração leucocitária e, portanto, de estresse oxidativo (NALINI; MATHAN; BALASUBRAMANIAN, 1993; VENGE, 1994). Sendo assim, a determinação da atividade da mieloperoxidase é um método sensível e de natureza quantitativa para a investigação da inflamação intestinal aguda (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984).

A determinação da atividade da mieloperoxidase tem sido utilizada como um indicador do influxo de neutrófilos no cólon em diversos modelos experimentais de colite (HOGABOAM et al., 1995; RACHMILEWITZ et al., 1995). Trabalhos anteriores têm sugerido que a produção de ERO na colite ulcerativa (BABBS, 1992) e na colite

induzida por ácido acético (KESHAVARZIAN et al., 1990; KESHAVARZIAN et al., 1992) é mediada em grande parte por neutrófilos. O efeito terapêutico encontrado do LCU pode ser em parte devido a uma ação antioxidante indireta pela inibição da infiltração de neutrófilos.

Além de causar inibição da atividade da mieloperoxidase, o LCU impediu o aumento na atividade da catalase, associado com a colite induzida por ácido acético.

ERO são inevitavelmente formadas em processos bioquímicos, e várias enzimas são destinadas a inativarem estes metabólitos sob condições fisiológicas, incluindo a superóxido dismutase e a catalase. A catalase é uma enzima de defesa e está amplamente distribuída em nosso organismo, ela catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio, um forte agente oxidante (FOREMAN; TORRES, 2001) em água e oxigênio.

Os níveis de peróxido de hidrogênio encontram-se elevados na mucosa de pacientes com DII, assim como em modelos experimentais de inflamação (KESHAVARZIAN et al., 1992). Estudos mostraram que a atividade da catalase encontrava-se significativamente elevada na mucosa colônica de amostras de biopses de pacientes com colite ulcerativa (BENO; STARUCHOVA; VOLKOVOVA, 1997) e proctocolite idiopática (BENO et al., 1995). No entanto, o assunto ainda não está claro, pois outros estudos, usando biopses retais de pacientes com colite ulcerativa (BHASKAR; RAMAKRISHNA; BALASUBRAMANIAN, 1995) e doença de Crohn (O'MORAIN et al., 1985) não demonstraram diferença na atividade da catalase entre estes grupos e o grupo de indivíduos controle. É possível que a atividade da catalase seja influenciada pela grande quantidade de peróxido de hidrogênio produzido no cólon inflamado.

O LCU também causou uma significativa inibição na produção de nitrito, um metabólito estável do NO cuja determinação nos fluidos biológicos tem sido utilizada para estimar a produção de NO. Esta inibição na produção de nitrito evidenciada no modelo de colite induzida por ácido acético pode estar associada a uma possível inibição da NOSi pelo látex.

Estudos têm sugerido que a liberação de citocinas de alguns tipos de células é dependente do dano à membrana celular mediado pelo NO (VALLETTE et al., 1997). O aumento na produção de NO poderia resultar na ativação de uma alça de alimentação positiva para as células inflamatórias, em que o NO aumentaria a síntese de citocinas, como interleucina 1β e TNF- α , que por sua vez poderiam induzir a expressão de NOSi (MARCINKIEWICZ; GRABOWSKA; CHAIN, 1995). O efeito antiinflamatório do LCU na colite induzida por ácido acético parece promover proteção provavelmente limitando a liberação de mediadores inflamatórios, uma vez que ele preveniu a infiltração de neutrófilos e a geração de NO.

As análises bioquímicas realizadas neste modelo experimental demonstraram uma melhor atividade da dose de 200 mg/kg do LCU em comparação à maior dose, este comportamento também foi observado em relação à lesão tecidual microscópica, à atividade da catalase e às concentrações de nitrito e SH-NP no modelo de injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica, assim como também no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina, tal achado despertou o interesse para a avaliação do resultado de uma dose menor nestes modelos, 100 mg/kg, contudo a atividade desta foi semelhante à obtida com a dose de 200 mg/kg do LCU (dados não mostrados). Observações

como estas são facilmente verificadas em estudos utilizando compostos em sua forma bruta.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o LCU foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta inflamatória aguda no modelo de colite induzida por ácido acético. É importante ressaltar que o LCU reduziu de forma efetiva a atividade das enzimas mieloperoxidase e catalase, o conteúdo de nitrito, o edema tecidual e o escore microscópico, apesar de não ter reduzido de forma significativa o dano macroscópico ao tecido. Além disso, a melhora da colite induzida por ácido acético que foi obtida com o LCU pode incluir a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias mediada pelo NO. A tentativa em reduzir a produção excessiva de ERO e o dano oxidativo à mucosa colônica inflamada pode ser considerada como um tratamento complementar da colite ulcerativa.

Em busca de confirmar o efeito benéfico do LCU sobre a inflamação intestinal e de encontrar um produto natural para o alívio da lesão intestinal por isquemia-reperfusão, este trabalho também analisou o efeito do LCU em modelo experimental de isquemia-reperfusão mesentérica em ratos.

A isquemia seguida de reperfusão intestinal é um evento clínico comum que favorece a translocação bacteriana em órgãos à distância, possuindo altas taxas de complicações como: síndrome da angústia respiratória do adulto, hipotensão e falência renal. As taxas de mortalidade variam de 44% a 89% (LEVY; KRAUSZ; MANNY, 1990; WILSON et al., 1987).

A injúria intestinal por isquemia-reperfusão que acompanha a falência da perfusão microvascular parece estar associada com infiltração de células inflamatórias, elevada interação leucócito-célula endotelial e liberação de

mediadores inflamatórios (BRAUN et al., 2002; CHEN et al., 2000a). Neutrófilos ativados aderidos ao endotélio microvascular podem secretar a enzima mieloperoxidase, favorecendo a formação de ERO com subsequente lesão tecidual (CARDEN; GRANGER, 2000; KETTLE; GEDYE; WINTERBOURN, 1997).

No presente estudo, o LCU reduziu a atividade da mieloperoxidase, um marcador bioquímico da infiltração de neutrófilos, no tecido lesado. A redução na atividade desta enzima poderia ser interpretada como uma manifestação de atividade antioxidante (VELJACA et al., 1995).

A peroxidação lipídica iniciada por radicais de oxigênio e o dano a proteínas podem contribuir para a alteração na função celular e para a necrose associada com a reperfusão (ZIMMERMAN; GRANGER, 1992). Foi demonstrado que durante a reperfusão, oxigênio molecular reage com a enzima xantina-oxidase e com a hipoxantina para produzir radicais livres de oxigênio (GRANGER; HOLLWARTH; PARKS, 1986).

No presente estudo, foi encontrado um nível elevado de atividade da catalase no homogenato da mucosa ileal do grupo controle veículo, quando comparado ao grupo controle normal, indicando, possivelmente, que o nível de produção de peróxido de hidrogênio é maior no intestino submetido à isquemia-reperfusão. Um nível elevado de atividade da catalase associado com a injúria intestinal induzida por isquemia-reperfusão pode representar uma defesa do sistema biológico contra os oxidantes reativos no tecido. Uma observação similar foi registrada em polpas dentárias inflamadas de humanos que apresentavam elevada atividade da enzima catalase (ESPOSITO et al., 2003).

O pré-tratamento com o LCU, em ambas as doses testadas, mostrou níveis de atividade da catalase significativamente inferiores àqueles observados no grupo tratado com veículo. Indicando, provavelmente, que o nível de produção de peróxido de hidrogênio foi reduzido pelo pré-tratamento com o LCU, no entanto esta redução possivelmente levou os níveis de peróxido de hidrogênio para valores abaixo do normal, pois também foi verificado que a atividade da catalase nestes grupos encontrava-se significativamente abaixo da obtida no grupo controle normal.

O NO tem sido apontado como participante na patogênese da injúria tecidual relacionada à isquemia-reperfusão (TURNAGE et al., 1995). Um estudo mostrou que a inibição seletiva da NOSi pela aminoguanidina pode reduzir o desarranjo hemodinâmico e microcirculatório que resulta da isquemia-reperfusão intestinal (CHEN et al., 2000a). O LCU nas doses testadas inibiu de forma significativa o aumento na produção de nitrito associado à isquemia-reperfusão indicando uma possível inibição da NOSi pelo látex.

O conteúdo de glutathiona na mucosa ileal do grupo controle veículo, submetido à isquemia-reperfusão mesentérica, foi significativamente menor que no grupo controle normal e o pré-tratamento com o LCU, na dose de 200 mg/kg, elevou este conteúdo de forma significativa, mostrando que o tratamento com o látex restaurou a reserva de glutathiona evitando a depleção deste estoque provocada pelo processo de isquemia-reperfusão. Uma vez que o LCU foi capaz de prevenir a depleção de glutathiona, ele mostrou possuir atividade antioxidante.

Apesar dos expressivos resultados das análises bioquímicas, o efeito protetor do LCU sobre a lesão histológica ao tecido, neste modelo experimental, foi bastante discreto. Talvez um tempo maior de perfusão fosse suficiente para incrementar a

lesão histológica no grupo controle veículo, evidenciando assim o efeito do látex. Além disso, a variação no efeito do LCU sobre a avaliação histopatológica entre os dois modelos de inflamação intestinal utilizados, colite induzida por ácido acético e isquemia-reperfusão mesentérica em ratos, pode também ter ocorrido, em parte, pela diferença na farmacocinética do(s) composto(s) ativo(s) presente(s) no LCU uma vez que a via de administração foi diferente entre os modelos. O LCU utilizado foi dissolvido em água destilada por ser hidrossolúvel e sua administração por via retal pode ter favorecido a absorção do mesmo de forma mais rápida devido a grande capacidade absorptiva do cólon. A possibilidade de barreira mecânica do LCU no modelo de colite foi descartada em virtude de sua baixa densidade, de sua solubilidade em água e dos resultados das análises bioquímicas terem sido semelhantes entre os dois modelos de inflamação intestinal utilizados.

Os resultados indicam que o LCU previne o dano causado por isquemia-reperfusão mesentérica em intestino de ratos, uma vez que o pré-tratamento dos animais com o LCU, nas doses de 200 e 400 mg/kg, preveniu de forma significativa o aumento na atividade das enzimas mieloperoxidase e catalase, e nos níveis de nitrito associados à isquemia-reperfusão mesentérica, além disso, a dose de 200 mg/kg do látex evitou a depleção do estoque de glutatona do tecido. Tais resultados sugerem que este efeito protetor pode ser, pelo menos em parte, devido a uma atividade antioxidante do LCU.

A atividade antiinflamatória apresentada pelo LCU nos dois modelos de inflamação intestinal utilizados também poderia estar sendo influenciada por um possível efeito do LCU sobre a migração celular e os mediadores inflamatórios, pois recentemente Mattos (2001) mostrou que o LCU apresenta atividade antiinflamatória nos modelos animais de edema de pata induzido por bradicinina, carragenina,

prostaglandina E₂ ou substância P; em modelos de edema de orelha induzido por ácido araquidônico ou óleo de croton e em modelo de pleurisia induzida por carragenina. Neste estudo, Mattos (2001) destacou que o efeito antiinflamatório do LCU envolve a inibição de mediadores da resposta inflamatória (prostaglandinas, 5-HT, histamina, substância P e leucotrienos) e inibição da migração celular para o foco inflamatório.

Alguns estudos mostram que a mucosa de pacientes com DII contém um número maior de bactérias quando comparada com a mucosa de pacientes controle (SCHULTSZ et al., 1999; SWIDSINSKI et al., 2002). Contudo, até agora, nenhum microrganismo específico foi diretamente associado à patogênese desta doença (MARTEAU et al., 2004). A composição da flora intestinal também parece estar envolvida na patogênese de alguns DFG. Tem sido mostrado que as infecções intestinais desempenham um papel importante na patogênese da SII, DFG mais comum (SPILLER, 2003; WANG; FANG; PAN, 2002). Si et al. (2004) verificaram, em um estudo utilizando 25 pacientes com SII, que o número de enterobactérias presentes nas fezes destes pacientes encontrava-se significativamente aumentado em comparação com amostras de fezes de indivíduos saudáveis.

Acredita-se também que a DII seja o resultado de uma resposta inadequada do sistema imune da mucosa intestinal dirigida contra a presença da flora normal presente na luz do intestino. Esta resposta inadequada pode ser facilitada por defeitos tanto na função de barreira do epitélio intestinal quanto no sistema imune da mucosa (KNIGGE, 2002).

Ainda não está claro se o sistema imune nas DII é ativado como resultado de um problema intrínseco ou se existe estimulação de forma contínua resultante de

uma alteração na barreira da mucosa epitelial (PODOLSKY, 2002). Vários progressos aconteceram no conhecimento e caracterização das populações de células imunes e dos mediadores inflamatórios nos pacientes com DII e em modelos experimentais. Existe um razoável consenso de que a mucosa de pacientes com doença de Crohn é dominada por células T auxiliares do tipo 1 (CD4/Th1) e nos pacientes com colite ulcerativa existe um predomínio de células T auxiliares do tipo 2 (CD4/Th2) (PODOLSKY, 2002). A ativação das populações centrais de células imunes é eventualmente acompanhada de uma grande variedade de mediadores inflamatórios inespecíficos incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, assim como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos). Esses mediadores aumentam o processo inflamatório e a destruição tecidual.

Nos modelos de inflamação intestinal, o LCU poderia também estar atuando equilibrando a flora intestinal uma vez que mostrou atividade no teste de toxicidade sobre *Artemia salina*, teste este que parece ter correlação com atividades como viruscida, antimicrobiana e parasiticida (MACRAE; HUDSON; TOWERS, 1988; SAHPAZ et al., 1994), como citado anteriormente, apesar de o LCU não ter mostrado atividade contra as bactérias testadas. Além disso, o LCU poderia estar agindo sobre o epitélio intestinal de forma a fortalecer sua função de barreira uma vez que mostrou reduzir a lesão tecidual nos modelos de colite induzida por ácido acético e lesão intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica em ratos, além de ter mostrado atividade cicatrizante nos modelos de ferida por incisão e por excisão em ratos (MATTOS, 2001).

São muitas as condições extra gastrintestinais associadas à SII. Um trabalho de revisão de literatura, desde 1966, elaborado por Whitehead, Palsson e Jones (2002) relata que as desordens com maior associação à SII já documentadas são a

fibromialgia (49% dos pacientes apresentam SII), a síndrome de fadiga crônica (51%), desordens na articulação temporomandibular (64%) e dor pélvica crônica (50%). Em um outro estudo Walker et al. (1996) encontraram uma prevalência de dor pélvica crônica em 35% das mulheres com SII avaliadas e em 14% das mulheres com DII. Destas mulheres com dor pélvica crônica, 5 a 10% apresentavam cistite intersticial (REITER, 1998). Em um estudo com 2.405 pacientes com cistite intersticial a SII foi a segunda alteração mais comum associada depois das alergias (GIAMBERARDINO, 2000 apud HEITKEMPER; JARRETT, 2005). Foi sugerido então que tal coincidência entre a SII e outras alterações de órgãos abdominais, como a cistite intersticial e a dor pélvica crônica, pode estar relacionada à ativação de fibras viscerais periféricas aferentes.

Os médicos geralmente percebem as DII como doenças reais e a SII como um problema psicológico (OWENS; NELSON; TALLEY, 1995). No entanto, independentemente da etiologia, a dor abdominal crônica afeta negativamente a qualidade de vida. Talvez seja a hora de pensarmos nas DII e na SII como parte de um grupo de doenças onde existe dor abdominal crônica (YOUSSEF, 2004).

Com o propósito de investigar uma possível atividade antinociceptiva do LCU na dor visceral que justificasse mais fortemente uma possível utilização terapêutica do mesmo nos DFG e nas DII, o LCU foi testado em três modelos animais de dor visceral.

O modelo de dor visceral mais comumente utilizado em camundongos é o teste de contorções abdominais. Este teste envolve a injeção intraperitoneal de substâncias químicas, como o ácido acético. O efeito antinociceptivo do LCU já havia sido demonstrado neste modelo experimental e também nos modelos de dor

induzida pela administração intraplantar de formalina e de capsaicina em camundongos (MATTOS, 2001). Contudo, apesar de o LCU já ter sido testado anteriormente no modelo de dor visceral induzida por ácido acético, este foi novamente testado em virtude das possíveis alterações na constituição do látex quando obtido de locais e em épocas diferentes.

O LCU, nas doses utilizadas, reduziu significativamente o número de contorções abdominais neste modelo em relação ao grupo tratado com veículo, confirmando assim sua atividade antinociceptiva. Embora a inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético represente uma antinocicepção periférica (WEI et al., 1986), o modelo não possui especificidade, desde que uma diversidade de compostos farmacológicos, como antidepressivos tricíclicos (TAKAHASHI; PAZ, 1987), anti-histamínicos (YEH, 1986) e anti-hipertensivos (PETTIBONE; MUELLER, 1981) inibem as contorções abdominais induzidas por ácido acético e mostram uma antinocicepção que pode ser questionada.

Além do teste de contorções abdominais, existem outros modelos de dor visceral em espécies diferentes, a maioria em ratos, contudo estes modelos geralmente envolvem técnicas cirúrgicas delicadas ou a intubação de um segmento visceral, como no modelo de distensão do cólon. Em 1995, foi proposto um modelo de cistite em ratos induzida pela administração intraperitoneal de ciclofosfamida. Este modelo não necessita de cirurgia ou de qualquer instrumento de estimulação (LANTÉRI-MINET et al., 1995) e foi adaptado para uso em camundongos por Olivar e Laird em 1999.

A ciclofosfamida é um agente antitumoral utilizado no tratamento quimioterápico do câncer e a cistite é um de seus efeitos colaterais importantes. A

ciclofosfamida por si é inerte, porém, após a ativação metabólica no fígado, são geradas acroleína e mostarda fosfamida que parecem ser responsáveis pelos efeitos tóxicos e citostáticos, respectivamente (FRAISER; KEHRER, 1993). A cistite é resultado da acumulação dos metabólitos tóxicos na bexiga que são excretados pela urina. O único efeito tóxico observado em camundongos logo após a administração de ciclofosfamida é a cistite hemorrágica que ocorre pouco tempo após a administração (FRAISER; KANEKAL; KEHRER, 1991). Contudo, alguns dias após a administração de uma única dose de ciclofosfamida são observados fibrose pulmonar e imunossupressão (FRAISER; KANEKAL; KEHRER, 1991).

A cistite observada em camundongos após a administração de ciclofosfamida correlaciona-se à cistite intersticial no tocante à dor pélvica. A cistite intersticial é uma condição inflamatória crônica da bexiga, de etiologia desconhecida, que causa dor na região pélvica, aumento na frequência urinária e urgência urinária. Pacientes com cistite intersticial também relatam outras condições dolorosas crônicas como enxaquecas (BARKHUIZEN, 2001), fibromialgia (CLAUW et al., 1997) e SII (ALAGIRI et al., 1997). A SII parece ser a segunda alteração mais comum que acompanha a cistite intersticial, como citado anteriormente (GIAMBERARDINO, 2000 apud HEITKEMPER; JARRETT, 2005). Portanto, foi utilizado o modelo de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos em virtude dessa associação e com o objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo visceral do LCU.

O NO endógeno está envolvido nos eventos inflamatórios que levam à cistite hemorrágica após a administração de ciclofosfamida (SOUZA-FILHO et al., 1997). Por este motivo, no modelo de cistite induzida por ciclofosfamida, a N-acetil-cisteína foi utilizada como controle positivo e reduziu de forma significativa o tempo de crises transitórias, quando comparado com o grupo controle veículo. A N-acetil-cisteína é

uma forma alterada do aminoácido cisteína que age como antioxidante por ser precursora da glutatona. Da mesma forma, o LCU, nas doses testadas, também foi capaz de reduzir de forma significativa este tempo. A N-acetil-cisteína, assim como o LCU (400 mg/kg), também reduziu de forma significativa os escores para comportamento nociceptivo em relação ao grupo controle veículo.

Recentemente, foi proposto outro modelo de dor visceral utilizando a administração intracolônica de capsaicina, sem o uso de anestesia (LAIRD et al., 2001). Neste modelo o pré-tratamento com o LCU, nas doses testadas, reduziu significativamente a expressão de comportamentos nociceptivos relacionados à dor visceral em relação ao grupo controle veículo. Tais resultados apontam para uma atividade antinociceptiva visceral do LCU.

Apesar de apenas a maior dose do LCU ter reduzido de forma significativa os escores para comportamento nociceptivo no modelo de cistite induzida por ciclofosfamida, ele mostrou atividade antinociceptiva mais potente sobre o tempo de crises transitórias neste modelo experimental do que sobre as contorções no modelo de dor induzida por ácido acético ou sobre o número de comportamentos nociceptivos no modelo de dor induzida por capsaicina.

Foi mostrado que a dor induzida pela administração de capsaicina é inibida pela administração de agonistas α_2 -adrenérgicos através da redução da liberação de glutamato pelas terminações nervosas espinhais (LI; EISENACH, 2001). Sabendo que agonistas α_2 -adrenérgicos, como a clonidina (PERTOVAARA, 1993), e inibidores da NOS possuem atividade analgésica e na tentativa de esclarecer se a atividade antinociceptiva observada com o LCU estava associada a mecanismo nitriérgico, ao envolvimento de receptores α_2 -adrenérgicos ou a um efeito sobre os

receptores opióides presentes no trato gastrintestinal, levando a uma redução na sensação dolorosa, foi utilizado L-NAME, um inibidor inespecífico de NOS, ioimbina, droga predominantemente antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos (HAAPALINNA et al., 1997) e naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opióides.

Os resultados mostraram que a ioimbina não foi capaz de reverter o efeito do látex, evidenciando a ausência de envolvimento de receptores α_2 -adrenérgicos na atividade antinociceptiva visceral deste. O L-NAME não foi capaz de potencializar o efeito do LCU. Esta observação sugere que a atividade antinociceptiva do LCU pode envolver mecanismo nitriérgico. Além disso, a naloxona reverteu o efeito antinociceptivo do LCU evidenciando envolvimento de receptores opióides na antinocicepção visceral produzida por este.

Também foi utilizada a administração de vermelho de rutênio, um antagonista não competitivo da capsaicina, em associação ao LCU. A capsazepina, antagonista competitivo da capsaicina, e o vermelho de rutênio são ferramentas utilizadas no estudo da função de neurônios primários aferentes sensíveis à capsaicina. Ambos são utilizados para inibir a ação da capsaicina em modelos experimentais (MAGGI et al., 1993; SANTOS; CALIXTO, 1997). Neste grupo verificou-se que o vermelho de rutênio não potencializou a atividade antinociceptiva do LCU, sugerindo uma possível ação do LCU sobre os receptores vanilóides.

As fibras C, sensíveis à capsaicina, estão presentes nos nervos vagais e esplâncnicos e podem regular a secreção, a motilidade e a circulação intestinais (HAMMER et al., 1998). Neurônios sensíveis à capsaicina estão envolvidos na hipersecreção patofisiológica causada pela enterotoxina da *Escherichia coli* em

intestino de ratos (NZEKWU; LEVIN, 1996) e pela toxina A do *Clostridium difficile* em íleo de ratos (CASTAGLIUOLO et al., 1994). Em estudo anterior foi demonstrado que o LCU possui atividade anti-secretória no modelo de secreção intestinal induzida por toxina da cólera em camundongos (GURGEL, 2000), tal atividade pode estar associada a um possível efeito inibitório do LCU sobre os VR1, efeito este que foi sugerido pela não potencialização de sua atividade antinociceptiva pelo vermelho de rutênio no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina.

Além disso, estudos sugerem que a capsaicina inibe o tônus e os movimentos em preparações de intestino humano, sendo este efeito mediado pelo NO e/ou pelo peptídeo intestinal vasoativo. Este efeito inibitório da capsaicina foi confirmado em preparações de cólon de ratos e camundongos (BARTHÓ et al., 2004).

Foi mostrado que a capsaicina provoca a liberação de NO a partir da superfície luminal de amostras de bexiga e que esta liberação é reduzida, mas não completamente bloqueada, por desnervação (BIRDER et al., 1998). As células uroteliais respondem a estímulos mecânicos e químicos através da liberação de neurotransmissores (NO e ATP) (BIRDER et al., 1998; FERGUSON; KENNEDY; BURTON, 1997). Foi então proposto que a capsaicina deve ativar receptores no urotélio, assim como nos nervos aferentes, induzindo a liberação de NO. Outros estudos também mostraram que a capsaicina estimula a liberação de NO a partir de neurônios isolados do gânglio da raiz dorsal de ratos (BIRDER; KANAI; DE GROAT, 1997).

Existem evidências de que os VR1 estejam envolvidos na inflamação gastrointestinal. Recentemente, Kimball et al. (2004) mostraram que um novo bloqueador dos canais ligados aos VR1, o JNJ 10185734, reduz a severidade da

colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS) em camundongos. Este achado indica que os VR1 contribuem para a iniciação ou manutenção do processo inflamatório no intestino. Esta atenuação da colite pelo JNJ 10185734 também foi mostrada por outro bloqueador, a capsazepina (KIHARA et al., 2003; KIMBAL et al., 2004) e reproduzida pela depleção genética dos VR1 (FUJINO et al., 2003). Contudo, a relação entre a DSS e os VR1 no modelo de colite ainda não foi bem compreendida.

Considerando que o modelo de colite induzida por DSS é considerado relevante no estudo das doenças inflamatórias intestinais, estes achados experimentais obtidos com o JNJ 10185734 e a capsazepina sugerem que os VR1 contribuem para as DII. Apesar de ainda não existirem provas que expliquem esta afirmativa, é importante notar que a DII está associada com um aumento na expressão dos VR1 nas fibras nervosas do cólon (YIANGOU et al., 2001). Desta forma, a descoberta de drogas que possam ligar-se a estes receptores pode levar ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da dor, da inflamação e de alterações na motilidade intestinal.

Em virtude de tais evidências de que os VR1 estejam envolvidos na inflamação gastrointestinal, e do possível efeito antagonista do LCU sobre estes receptores, sugerido no modelo de dor induzida por capsaicina, o efeito do LCU nos modelos de colite induzida por ácido acético e de lesão intestinal induzida por isquemia-reperfusão mesentérica pode envolver um possível efeito inibitório sobre os VR1.

A dor relacionada aos testes comportamentais utilizados para selecionar agentes potencialmente antinociceptivos pode ter algumas limitações. Por exemplo,

não está claro qual extensão da sedação ou alterações nas funções motoras podem influenciar o resultado destes testes. Agonistas da adenosina, por exemplo, que produzem efeitos comportamentais, como uma inibição da atividade locomotora, demonstraram efeito antinociceptivo (KARLSTEN; GORDH; POST, 1992). Estudos realizados por Rosland et al. (1990) sugerem que a sedação pode reduzir respostas motoras coordenadas.

No presente estudo, o LCU, nas doses utilizadas, não demonstrou potencializar o tempo de sono induzido por pentobarbital ou diminuir a movimentação espontânea dos animais no teste do campo aberto. Essas observações sugerem que o LCU, nestas doses, não possui ação depressora sobre o SNC, ação esta que poderia influenciar o efeito antinociceptivo evidenciado pelo LCU nos modelos de dor. Além disso, o LCU não alterou o tempo de permanência no teste do “rotarod”, ou seja, não alterou a coordenação motora dos animais. A coordenação motora é uma qualidade física que depende da integração do sistema músculo-esquelético com o SNC, portanto, tal achado confirmou o não envolvimento do LCU com o SNC.

Em resumo, os resultados do presente trabalho sugerem que o látex do *Croton urucurana* Baill. apresenta atividade antifúngica, justificando seu uso popular no tratamento de doenças de pele, além de atividades antiinflamatória intestinal e antinociceptiva visceral que, juntamente com sua atividade inibidora do trânsito e da secreção intestinal anteriormente demonstradas (GURGEL, 2000), confirmam seu uso popular no tratamento de diarréias e cólicas intestinais, podendo ser explorado como uma alternativa para o tratamento de DII e DFG, em especial a SII. Além disso, tais resultados sugerem que seu efeito antiinflamatório, pelo menos em parte, envolve inibição da migração de neutrófilos e mecanismo antioxidante e sua

atividade antinociceptiva envolve possivelmente a participação de mecanismo nitriérgico e opióide, assim como de receptores vanilóides.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

☞ A análise fitoquímica da fração acetona do LCU demonstrou a presença de galocatequina e epigalocatequina. A fração aquosa apresenta compostos de origem fenólica/flavonóides.

☞ O LCU exibiu atividade no teste de toxicidade sobre *Artemia salina*.

☞ O LCU demonstrou possuir um amplo espectro contra dermatófitos, sendo efetivo contra seus três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*.

☞ O LCU reduziu a resposta inflamatória nos modelos de colite induzida por ácido acético e isquemia-reperfusão mesentérica, o que foi evidenciado através de alterações bioquímicas e histopatológicas.

☞ Em ambos os modelos experimentais de inflamação intestinal o LCU reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase e a produção de nitrito o que evidencia uma prevenção na migração de neutrófilos e na geração de NO, respectivamente. Além disso, a redução na atividade da enzima mieloperoxidase pode ser interpretada como uma manifestação de atividade antioxidante.

☞ O LCU também reduziu a atividade da catalase nos modelos de inflamação intestinal o que pode ter ocorrido em resposta a uma diminuição na produção de peróxido de hidrogênio produzido no tecido inflamado, indicando uma possível atividade antioxidante do látex.

∞ O LCU preveniu a depleção do estoque de glutatona no modelo de isquemia-reperfusão mesentérica. Tal achado indica uma atividade antioxidante do látex.

∞ O LCU demonstrou atividade antinociceptiva visceral nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, cistite induzida por ciclofosfamida e dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina.

∞ Os dados apresentados no modelo de dor induzida pela administração intracolônica de capsaicina indicam que a atividade antinociceptiva visceral do LCU não depende de mecanismo α_2 -adrenérgico, contudo parece haver envolvimento de mecanismo nitriérgico e opióide, assim como de receptores vanilóides.

∞ O LCU não possui ação depressora no SNC.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGREUS, L.; SVARDSUDD, K.; NYREN, O.; TIBBLIN, G. Irritable bowel syndrome and dyspepsia in the general population: overlap and lack of stability over time. **Gastroenterology**, v. 109, n. 3, p. 671-680, 1995.
2. AHNFELT-RONNE, I.; NIELSEN, O. H. The antiinflammatory moiety of sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid, is a radical scavenger. **Agents Actions**, v. 21, n. 1-2, p. 191-194, 1987.
3. AHNFELT-RONNE, I.; NIELSEN, O. H.; CHRISTENSEN, A.; LANGHOLZ, E.; BINDER, V.; RIIS, P. Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid. **Gastroenterology**, v. 98, p. 1162-1169, 1990.
4. ALAGIRI, M.; CHOTTINER, S.; RATNER, V.; SLADE, D.; HANNO, P. M. Interstitial cystitis: unexplained associations with other chronic disease and pain syndromes. **Urology**, v. 49, p. 52-7, 1997.
5. AL-AWADI, F. M.; SRIKUMAR, T. S.; ANIM, J. T.; KHAN, I. Antiinflammatory effects of *Cordia myxa* fruit on experimentally induced colitis in rats. **Nutrition**, v. 17, n. 5, 391-396, 2001.
6. ALEXANDER, I. C.; PASCOE, K. O.; MANCHARD, P.; WILLIAMSON, L. A. D. An insecticidal diterpene from *Croton linearis*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1801-1803, 1991.
7. ALI-SHTAYEH, M. S.; ABU GHDEIB, S. I. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. **Mycoses**, v. 42, n. 11-12, p. 665-72, 1999.
8. ALTERAS, I.; FEUERMAN, E. J.; DAVID, M.; SEGAL, R. The increasing role of *Microsporum canis* in the variety of dermatophytic manifestations reported from Israel. **Mycopathologia**, v. 95, n. 2, p. 105-107, 1986.
9. AMICI, A.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Conversion of amino acids residues in proteins and amino acids homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed reactions. **J Biol Chem**, v. 264, p. 3341-3346, 1989.
10. ANAYA-PRADO, R.; TOLEDO-PEREYRA, L. H.; LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Ischemia/reperfusion injury. **J Surg Res**, v. 105, n. 2, p. 248-258, 2002.

11. APPELYARD, C. B.; WALLACE, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **Am J Physiol**, v. 269, p. G119-G125, 1995.
12. AYENE, I. S.; AL-MEDI, A. B.; FISHER, A. B. Inhibition of lunge tissue oxidation during ischemia/reperfusion by 2-mercaptopropionyl glycine. **Arch Biochem Biophys**, v. 303, p. 307-312, 1993.
13. BABBS, C.F. Oxygen radicals in ulcerative colitis. **Free Radic Biol Med**, v. 13, p. 169-181, 1992.
14. BACH, J. F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med**, v. 347, n. 12, p. 911-920, 2002.
15. BALOGH, N.; KRAUSZ, F.; LEVAI, P.; RIBICZEYNE, P. S.; VAJDOVICH, P.; GAAL, T. Effect of deferoxamine and L-arginine treatment on lipid peroxidation in an intestinal ischaemia-reperfusion model in rats. **Acta Vet Hung**, v. 50, n. 3, p. 343-356, 2002.
16. BANERJEE, A. K.; MANDAL, A.; CHANDA, D.; CHAKRABORTI, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Mol Cell Biochem**, v. 253, n. 1-2, p. 307-312, 2003.
17. BARKHUIZEN, A. Pharmacologic treatment of fibromyalgia. **Curr Pain Headache Rep**, v. 5, n. 4, p. 351-358, 2001.
18. BARNES, P. J. Nuclear factor-kappa B. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 6, p. 867-870, 1997.
19. BARRY, A. L.; COYLE, M. B.; THORNSBERRY, C.; GERLAND, E. H.; HOWKINSON, R. W. Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. **J Clin Microbiol**, v. 10, p. 885-889, 1979.
20. BARTHÓ, L.; BENKO, R.; PATACCHINI, R.; PETHO, G.; HOLZER-PETSCHÉ, U.; HOLZER, P.; LAZAR, Z.; UNDI, S.; ILLENYI, L.; ANTAL, A.; HORVATH, O. P. Effects of capsaicin on visceral smooth muscle: a valuable tool for sensory neurotransmitter identification. **Eur J Pharmacol**, v. 500, n. 1-3, p. 143-157, 2004.
21. BEERS, R. F. JR.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol Chem**, v. 195, p. 133-140, 1952.

22. BENO, I.; STARUCHOVA, M.; VOLKOVOVA, K. Ulcerative colitis: activity of antioxidant enzymes of the colonic mucosa. **Presse Med**, v. 26, p. 1474-1477, 1997.
23. BENO, I.; STARUCHOVA, M.; VOLKOVOVA, K.; BATOVSKY, M. Increased antioxidant enzyme activities in the colorectal adenoma and carcinoma. **Neoplasma**, v. 42, p. 265-269, 1995.
24. BENSOUSSAN, A.; TALLEY, N. J.; HING, M.; MENZIES, R.; GUO, A.; NGU, M. Treatment of irritable bowel syndrome with Chinese herbal medicine: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 280, n. 18, p. 1585-1589, 1998.
25. BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free-radicals. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 33, p. 205-222, 1993.
26. BERMAN, S. M.; NALIBOFF, B. D.; CHANG, L.; FITZGERALD, L.; ANTOLIN, T.; CAMPLONE, A.; MAYER, E. A. Enhanced preattentive central nervous system reactivity in irritable bowel syndrome. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 11, p. 2791-2797, 2002.
27. BETTOLO, R. M.; SCARPATI, M. L. Alkaloids of *Croton draconoides*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 520-520, 1979.
28. BEVAN, S.; SZOLCSANYI, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 8, p. 330-333, 1990.
29. BHAN, A. K.; MIZOGUCHI, E.; SMITH, R. N.; MIZOGUCHI, A. Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. **Immunol Rev**, v. 169, p. 195-207, 1999.
30. BHASKAR, L.; RAMAKRISHNA, B. S.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Colonic mucosal antioxidant enzymes and lipid peroxide levels in normal subjects and patients with ulcerative colitis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 10, p. 140-143, 1995.
31. BIRDER, L. A.; APODACA, G.; DE GROAT, W. C.; KANAI, A. J. Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder. **Am J Physiol**, v. 275, n. 2, p. F226-F229, 1998.
32. BIRDER, L. A.; KANAI, A. J.; DE GROAT, W. C. DMSO: effect on bladder afferent neurons and nitric oxide release. **J Urol**, v. 158, n. 5, p. 1989-1995, 1997.

33. BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 17, n. 1, p. 3-9, 1997.
34. BOUGHTON-SMITH, N. K.; EVANS, S. M.; HAWKEY, C. J.; COLE, A. T.; BALSITIS, M.; WHITTLE, B. J.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Lancet**, v. 342, p. 338-340, 1993.
35. BOW, E. J.; LAVERDIERE, M.; LUSSIER, N.; ROTSTEIN, C.; CHEANG, M. S.; IOANNOU, S. Antifungal prophylaxis for severely neutropenic chemotherapy recipients: a meta analysis of randomized-controlled clinical trials. **Cancer**, v. 94, n. 12, p. 3230-3246, 2002.
36. BOYD, S. C.; SASAME, H. A.; BOYD, M. K. High concentration of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis. **Sci**, v. 205, p. 1010-1112, 1979.
37. BRAUN, F.; HOSSEINI, S. M.; LORF, T.; LAABS, S.; RINGE, B. Differential gene expression during intestinal ischemia-reperfusion injury. **Transplant Proc**, v. 34, n. 6, p. 2301-2302, 2002.
38. BRONSON, D. M.; DESAI, D. R.; BARSKY, S.; FOLEY, S. M. An epidemic of infection with *Trichophyton tonsurans* revealed in a 20-year survey of fungal infections in Chicago. **J Am Acad Dermatol**, v. 8, n. 3, p. 322-330, 1983.
39. BRUHMYLER, J.; CHLEIDE, E.; LIÉGEOIS, J-F.; DELARGE, J.; MERCIER, M. Effects of specific dopaminergic agonists and antagonists in the open field test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 39, p. 367-371, 1991.
40. BUÉNO, L.; FIORAMONT, J.; GARCIA-VILLAR, R. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications-III. Visceral afferent pathways: a source of new therapeutic targets for abdominal pain. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 278, n. 5, p. G670-G676, 2000.
41. BULKLEY, G.B. Free radical – mediated reperfusion injury: a selective review. **Br J Cancer Suppl**, v. 8, p. 66-73, 1987.
42. CABANES, F. J. Animal dermatophytosis. Recent advances. **Rev Iberoam Micol**, v. 17, n. 1, p. S8-12, 2000.

43. CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 265-268, 1993a.
44. CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Diterpenes from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 755-760, 1993b.
45. CAI, Y.; EVANS, F. J.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M. H.; GLEBA, Y. Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2033-2040, 1991.
46. CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência Hoje**, v. 21, n. 123, p. 26-30, 1996.
47. CAMILLERI, M.; ATANASOVA, E.; CARLSON, P. J.; AHMAD, U.; KIM, H. J.; VIRAMONTES, B. E.; MCKINZIE, S.; URRUTIA, R. Serotonin-transporter polymorphism pharmacogenetics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 123, n. 2, p. 425-432, 2002.
48. CAMILLERI, M.; FORD, M. J. Review article: colonic sensorimotor physiology in health, and its alteration in constipation and diarrhoeal disorders. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, n. 4, p. 287-302, 1998.
49. CARAZO, J. L. S.; LOSADA, L. O.; SANJUAN, V. P. Tratamiento actual de las micose superficiales. **Rev Iberoam Micol**, v. 16, p. 26-30, 1999.
50. CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. **J Pathol**, v. 190, n. 3, p. 255-266, 2000.
51. CARDENAS, M. E.; CRUZ, M. C.; POETA, M. D.; CHUNG, N.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Antifungal activities of antineoplastic agents: *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study drug action. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 4, p. 583-611, 1999.
52. CARRILLO-MUÑOZ, A.; BRIÓ, S.; QUINDÓS, G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, p. 2-5, 2001.
53. CARTY, E.; DE BRABANDER, M.; FEAKINS, R. M.; RAMPTON, D. S. Measurement of in vivo rectal mucosal cytokine and eicosanoid production in ulcerative colitis using filter paper. **Gut**, v. 46, n. 4, 487-492, 2000.
54. CASTAGLIUOLO, I.; LAMONT, J. T.; LETOURNEAU, R.; KELLY, C.; O'KEANE, J. C.; JAFFER, A.; THEOHARIDES, T. C.; POTHOUKAKIS, C.

- Neuronal involvement in the intestinal effects of Clostridium difficile toxin A and Vibrio cholerae enterotoxin in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 107, n. 3, p. 657-665, 1994.
55. CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.
56. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
57. CERVEJO, F.; LAIRD, J. Visceral pain. **Lancet**, v. 353, n. 9170, p. 2145-2148, 1999.
58. CERVEJO, F. Visceral hyperalgesia revisited. **Lancet**, v. 356, n. 9236, p. 1127-1128, 2000.
59. CHANG, L. Review article: epidemiology and quality of life in functional gastrointestinal disorders. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 20, n. 7, p. 31-39, 2004.
60. CHEN, J. C.; CHEN, H. M.; SHYR, M. H.; FAN, L. L.; CHI, T. Y.; CHI, C. P.; CHEN, M. F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J Formos Med Assoc**, v. 99, n. 3, p. 213-218, 2000a.
61. CHEN, J. Y.; CHIU, J. H.; CHEN, H. L.; CHEN, T. W.; YANG, W. C.; YANG, A. H. Human peritoneal mesothelial cells produce nitric oxide: induction by cytokines. **Perit Dial Int**, v. 20, n. 6, p. 772-777, 2000b.
62. CHEN, Z. P.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J. D. Studies on the anti-tumor, anti-bacterial, and wound-healing properties of Dragon's Blood. **Planta Med**, v. 60, p. 541-545, 1994.
63. CHOUDHARY, S.; KESHAVARZIAN, A.; YONG, S.; WADE, M.; BOCKKINO, S.; DAY, B. J.; BANAN, A. Novel antioxidants zolimid and AEOL11201 ameliorate colitis in rats. **Dig Dis Sci**, v. 46, n. 10, p. 2222-2230, 2001.
64. CLAUW, D. J.; SCHMIDT, M.; RADULOVIC, D.; SINGER, A.; KATZ, P.; BRESSETTE, J. The relationship between fibromyalgia and interstitial cystitis. **J Psychiatr Res**, v. 31, n. 1, p. 125-131, 1997.

65. COATES, M. D.; MAHONEY, C. R.; LINDEN, D. R.; SAMPSON, J. E.; CHEN, J.; BLASZYK, H.; CROWELL, M. D.; SHARKEY, K. A.; GERSHON, M. D.; MAWE, G. M.; MOSES, P. L. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 126, n. 7, p. 1657-1664, 2004.
66. CORAZZIARI, E. Definition and epidemiology of functional gastrointestinal disorders. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 18, n. 4, p. 613-31, 2004.
67. CORNELLY, O. A.; ULLMANN, A. J.; KARTHAUS, M. Evidence-based assessment of primary antifungal prophylaxis in patients with hematologic malignancies. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3365-3372, 2003.
68. COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. P.; FERREIRA, H. D.; SALES, H. N.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **J Ethnopharmacol**, v. 72, p. 111-117, 2000.
69. COX, G. M., PERFECT, J. R. Fungal infections. **Curr Opin Infect Dis**, v. 6, p. 422-426, 1993.
70. CRAIG, W. J. Health-promoting properties of common herbs. **Am J Clin Nutr**, v. 70, p. 491S-499S, 1999.
71. CRAVEIRO, A.; SILVEIRA, E. R. 2 cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2571-2574, 1982.
72. CRAVEIRO, A.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ FILHO, R.; MASCARENHAS, I. P. Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 852-854, 1981.
73. CREAN, G. P.; HOLDEN, R. J.; KNILL-JONES, R. P.; BEATTIE, A. D.; JAMES, W. B.; MARJORIBANKS, F. M.; SPIEGELHALTER, D. J. A database on dyspepsia. **Gut**, v. 35, n. 2, p. 191-202, 1994.
74. CRESPO, M. E.; GALVEZ, J.; CRUZ, T.; OCETE, M. A.; ZARZUELO, A. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. **Planta Med**, v. 65, n. 7, p. 651-653, 1999.
75. CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Chichester-New York: Columbia University Press, 1981.

76. CRUZ, T.; GALVEZ, J.; OCETE, M. A.; CRESPO, M. E.; SANCHEZ DE MEDINA, L-H. F.; ZARZUELO, A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. **Life Sci**, v. 62, n. 7, p. 687-695, 1998.
77. DANDIYA, P. C.; COLLUMBINE, H. Studies on Acorus calamus: pharmacological actions fo essencial oil. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 125, p. 353-359, 1959.
78. DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **J Ethnopharmacol**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 1984.
79. DE PAUW, B. Preventative use of antifungal drugs in patients treated for cancer. **J Antimicrob Chemother**, v. 53, n. 2, p. 130-132, 2004.
80. DIJKSTRA, G.; MOSHAGE, H.; VAN DULLEMEN, H. M.; DE JAGER-KRIKKEN, A.; TIEBOSCH, A. T.; KLEIBEUKER, J. H.; JANSEN, P. L.; VAN GOOR, H. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. **J Pathol**, v. 186, n. 4, p. 416-421, 1998.
81. DRAPIER, J. C.; HIBBS, J. B. Jr. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. **J Clin Invest**, v. 78, p. 790-797, 1986.
82. DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurologic deficit in rats and mice. **J Am Pharm Sci Ed**, v. 46, p. 208-209, 1957.
83. ELISABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. **Ciência e Cultura**, v. 39, n. 8, p. 697-702, 1987.
84. ELSON, C. O.; SARTOR, R. B.; TENNYSON, G. S.; RIDDELL, R. H. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1344-1367, 1995.
85. ESPOSITO, P.; VARVARA, G.; CAPUTI, S.; PERINETTI, G. Catalase activity in human healthy and inflamed dental pulps. **Int Endod J**, v. 36, n. 9, p. 599-603, 2003.
86. FABIA, R.; WILLEN, R.; AR'RAJAB, A.; ANDERSSON, R.; AHREN, B.; BENGMARK, S. Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible

- experimental model for acute ulcerative colitis. **Eur Surg Res**, v. 24, p. 211-225, 1992.
87. FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am J Pathol**, v. 107, n. 3, p. 395-418, 1982.
 88. FARIAS, R. A. F.; NETO, M. F. O.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N. Effects of Croton cajucara extract on serum lipids of rats fed a high fat diet. **Phytother Res**, v. 10, p. 697-699, 1996.
 89. FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Global Importance of Medicinal Plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Eds.). **Conversation of Medicinal Plants**. 25. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
 90. FERGUSON, D. R.; KENNEDY, I.; BURTON, T. J. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism? **J Physiol**, v. 505, n. 2, p. 503-511, 1997.
 91. FITZPATRICK, L. R.; BOSTWICK, J. S.; RENZETTI, M.; PENDLETON, R. G.; DECKTOR, D. L. Antiinflammatory effects of various drugs on acetic acid induced colitis in the rat. **Agents Actions**, v. 30, p. 393-402, 1990.
 92. FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol Aspects Med**, v. 22, n. 4-5, . 189-216, 2001.
 93. FOX, J. L. Fungal infection rates are increasing. **ASM News**, v. 59, p. 515-518, 1993.
 94. FRAISER, L. H.; KANEKAL, S.; KEHRER, J. P. Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem. **Drugs**, v. 42, n. 5, p. 781-795, 1991.
 95. FRASIER, L. H.; KEHRER, J. P. Effect of indomethacin, aspirin, nordihydroguaiaretic acid, and piperonyl butoxide on cyclophosphamide-induced bladder damage. **Drug Chem Toxicol**, v. 16, n. 2, p. 117-133, 1993.
 96. FRANK, L.; KLEINMAN, L.; RENTZ, A.; CIESLA, G.; KIM, J. J.; ZACKER, C. Health-related quality of life associated with irritable bowel syndrome: comparison with other chronic diseases. **Clin Ther**, v. 24, n. 4, p. 675-689, 2002.

97. FUJINO, K.; DE LA FUENTE, S. G.; PAPPAS, T. N.; MANTYH, C. R. Dextran sulfate sodium-induced enterocolitis is attenuated in vanilloid receptor-1 knock out mice. **Gastroenterology**, v. 124, p. A300, 2003.
98. GABRIEL, S. E.; DAVENPORT, S. E.; STEAGALL, R. J.; VIMAL, V.; CARLSON, T.; ROZHON, E. J. A novel plant-derived inhibitor of cAMP-mediated fluid and chloride secretion. **Am J Physiol**, v. 276, p. G58-G63, 1999.
99. GEBHART, G. F. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications-IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 278, n. 6, G834-G838, 2000.
100. GENT, A. E.; HELLIER, M. D.; GRACE, R. H.; SWARBRICK, E. T.; COGGON, D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. **Lancet**, v. 343, n. 8900, p. 766-767, 1994.
101. GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; GUALTIERI, F.; MARCHESE, V.; BELLUCCI, C.; BARTOLINI, A. Antinociceptive and anti-amnesic properties of the presynaptic cholinergic amplifier PG-9. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 284, n. 3, p. 806-816, 1998.
102. GIAMBERARDINO, M. Sex-related and hormonal modulation of visceral pain. In: Fillingim, R. (Ed.). **Sex gender and pain**. Seattle: IASP Press, 2000, v. 17.
103. GILBERT, H. F.; MC LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 63, p. 69-172, 1990.
104. GODFREY, R. W.; MANZI, R. M.; CLARK, M. A.; HOFFSTEIN, S. T. Stimulus-specific induction of phospholipid and arachidonic acid metabolism in human neutrophils. **J Cell Biol**, v. 104, n. 4, p. 925-932, 1987.
105. GOERG, K. J.; SPILKER, T. Effect of peppermint oil and caraway oil on gastrointestinal motility in healthy volunteers: A pharmacodynamic study using simultaneous determination of gastric and gall-bladder emptying and oro-caecal transit time. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 17, n. 3, p. 445-451, 2003.
106. GOULART, Y. C. F.; SELA, V. R.; OBICI, S.; MARTINS, J. V. C.; OTOBONE, F.; CORTEZ, D. A.; AUDI, E. A. Evaluation of gastric anti-ulcer activity in a hydro-ethanolic extract from *Kielmeyera coriacea*. **Braz Arch Biol Technol**, v. 48, n. 2, p. 211-216, 2005.

107. GRALNEK, I. M.; HAYS, R. D.; KILBOURNE, A.; NALIBOFF, B.; MAYER, E. A. The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life. **Gastroenterology**, v. 119, n. 3, p. 654-660, 2000.
108. GRANGER, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol**, v. 255, p. H1269-H1275, 1988.
109. GRANGER, D. N.; HOLLWARTH, M. E.; PARKS, D. A. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 548, p. 47-63, 1986.
110. GREER, D. L. An overview of common dermatophytes. **J Am Acad Dermatol**, v. 31, p. S112-S116, 1994.
111. GRISHAM, M. B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. **Lancet**, v. 344, p. 859-861, 1994.
112. GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. **Dig Dis Sci**, v. 33, p. 6S-15S, 1988.
113. GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am J Physiol**, v. 251, p. G567-G574, 1986.
114. GRISHAM, M. B.; MACDERMOTT, R. P.; DEITCH, E. A. Oxidant defense mechanisms in the human colon. **Inflammation**, v. 14, p. 669-680, 1990.
115. GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Antifungal chemotherapy: Advances and perspectives. **Swiss Med Wkly**, v. 132, p. 303-311, 2002.
116. GUO, J. P.; MUROHARA, T.; BUERKE, M.; SCALIA, R.; LEFER, A. M. Direct measurement of nitric oxide release from vascular endothelial cells. **J Appl Physiol**, v. 81, n. 2, p. 774-779, 1996.
117. GUPTA, A. K.; LYNDE, C. W.; LAUZON, G. J.; MEHLMAUER, M. A.; BRADDOCK, S. W.; MILLER, C. A.; DEL ROSSO, J. Q.; SHEAR, N. H. Cutaneous adverse effects associated with terbinafine therapy: 10 case reports and a review of the literature. **Br J Dermatol**, v. 138, n. 3, p. 529-532, 1998.

118. GURGEL, L. A. **Avaliação experimental da atividade antidiarréica do látex do Croton urucurana Baill.** 134 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
119. GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; MARTINS, D. T.; MATTOS, P. O.; RAO, V. S. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytother Res**, v. 15, n. 4, 319-322, 2001.
120. GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem**, v. 41, p. 1819-1828, 1995.
121. GWEE, K. A.; GRAHAM, J. C.; MCKENDRICK, M. W.; COLLINS, S. M.; MARSHALL, J. S.; WALTERS, S. J.; READ, N. W. Psychometric scores and persistence of irritable bowel after infectious diarrhoea. **Lancet**, v. 347, n. 8995, p. 150-3, 1996.
122. HAAPALINNA, A.; VIITAMAA, T.; MACDONALD, E.; SAVOLA, J. M.; TUOMISTO, L.; VIRTANEN, R.; HEINONEN, E. Evaluation of the effects of a specific alpha 2-adrenoceptor antagonist, atipamezole, on alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor subtype binding, brain neurochemistry and behaviour in comparison with yohimbine. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 356, n. 5, p. 570-582, 1997.
123. HALLIWELL, B. Albumin--an important extracellular antioxidant? **Biochem Pharmacol**, v. 37, n. 4, p. 569-571, 1988.
124. HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.
125. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.
126. HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. The Gastrointestinal Tract: A Major Site of Antioxidant Action? **Free Radic Res**, v. 33, n. 6, p. 819-830, 2000.
127. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.
128. HAMMER, J.; HAMMER, H. F.; EHERER, A. J.; PETRITSCH, W.; HOLZER, P.; KREJS, G. J. Intraluminal capsaicin does not affect fluid and electrolyte absorption in the human jejunum but does cause pain. **Gut**, v. 43, n. 2, p. 252-255, 1998.

129. HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 334, n. 13, p. 841-848, 1996.
130. HANAUER, S. B.; SANDBORN, W. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Management of Crohn's disease in adults. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 3, p. 635-643, 2001.
131. HARRIS, A. G.; LEIDERER, R.; PEER, F.; MESSMER, K. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. **Am J Physiol**, v. 271, p. H2388-H298, 1996.
132. HARTWELL, J. L. Plants used against cancer. A survey. **Lloydia**, v. 32, p. 153-205, 1969.
133. HAWKEY, C. J.; RAMPTON, D. S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? **Gastroenterology**, v. 89, n. 5, p. 1162-1188, 1985.
134. HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med**, v. 107, p. 401-404, 1986.
135. HEITKEMPER, M.; JARRETT, M. Irritable Bowel Syndrome: Causes and Treatment. **Gastroenterol Nurs**, v. 23, n. 6, p. 256-263, 2000.
136. HEITKEMPER, M.; JARRETT, M. Overlapping conditions in women with irritable bowel syndrome. **Urol Nurs**, v. 25, n. 1, p. 25-30, 2005.
137. HERBRECHT, R. The changing epidemiology of fungal infections: are the lipid-forms of amphotericin B an advance? **Eur J Haematol Suppl**, v. 57, p. 12-17, 1996.
138. HILSDEN, R. J.; MEDDINGS, J. B.; VERHOEF, M. J. Complementary and alternative medicine use by patients with inflammatory bowel disease: An Internet survey. **Can J Gastroenterol**, v. 13, n. 4, p. 327-332, 1999.
139. HILSDEN, R. J.; SCOTT, C. M.; VERHOEF, M. J. Complementary medicine use by patients with inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v. 93, n. 5, p. 697-701, 1998.
140. HOGABOAM, C. M.; JACOBSON, K.; COLLINS, S. M.; BLENNERHASSETT, M. G. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. **Am J Physiol**, v. 268, p. G673-G684, 1995.

141. HOLODNIY, M.; KOCH, J.; MISTAL, M.; SCHMIDT, J. M.; KHANDWALA, A.; PENNINGTON, J. E.; PORTER, S. B. A double blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the safety and efficacy of orally administered SP-303 for the symptomatic treatment of diarrhea in patients with AIDS. **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 11, p. 3267-3273, 1999.
142. HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 143-201, 1991.
143. HONG, T.; JIN, G. B.; YOSHINO, G.; MIURA, M.; MAEDA, Y.; CHO, S.; CYONG, J. C. Protective effects of Polygalae root in experimental TNBS-induced colitis in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 79, n. 3, p. 341-346, 2002.
144. HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI ASL, M. Anticonvulsant, sedative and muscle relaxant effects of carbenoxolone in mice. **BMC Pharmacol**, v. 3, n. 1, p. 3, 2003.
145. HU, W. H.; TALLEY, N. J. Visceral perception in functional gastro-intestinal disorders: disease marker or epiphenomenon? **Dig Dis**, v. 14, n. 5, p. 276-88, 1996.
146. HUFFORD, C. D.; FUNDERBURK, M. J.; MORGAN, J. M.; ROBERTSON, L. W. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Lirodendron tulipifera* L. **J Pharm Sci**, v. 64, n. 5, p. 789-792, 1975.
147. HUNT, R. H.; TOUGAS, G. Evolving concepts in functional gastrointestinal disorders: promising directions for novel pharmaceutical treatments. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 16, n. 6, p. 869-883, 2002.
148. IBRAHIM, W.; LEE, U. S.; YEH, C. C.; SZABO, J.; BRUCKNER, G.; CHOW, C. K. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. **J Nutr**, v. 127, n. 7, p. 1401-1406, 1997.
149. ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H.; OKUYAMA, S.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; MOTIDOME, M.; ITOKAWA, H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. **Planta Med**, v. 58, p. 549-551, 1992.
150. IROBI, O. N.; DARAMBOLA, S. O. Antifungal activities of crude extract of *Mitracarpus villosus* (Rubiaceae). **J Ethnopharmacology**, v. 40, p. 137-140, 1993.

151. ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; MOCHIZUKI, M.; ENOMORI, T.; MORITA, H.; SHIROTA, O.; INAMATSU, M.; TAKEYA, K. A cytotoxic substance from Sangre de Grado. **Chem Pharm Bull**, v. 39, n. 4, p. 1041-1042, 1991.
152. JUNGER, W. G.; CARDOZA, T. A.; LIU, F. C.; HOYT, D. B.; GOODWIN R. Improved rapid photometric assay for qualitative measurement of PMN migration. **J Immunol Methods**, v. 160, p. 73-79, 1993.
153. JURJUS, A. R.; KHOURY, N. N.; REIMUND, J. M. Animal models of inflammatory bowel disease. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 50, n. 2, p. 81-92, 2004.
154. KANDA, Y.; YAMAMOTO, R.; CHIZUKA, A.; HAMAKI, T.; SUGURO, M.; ARAI, C.; MATSUYAMA, T.; TAKEZAKO, N.; MIWA, A.; KERN, W.; KAMI, M.; AKIYAMA, H.; HIRAI, H.; TOGAWA, A. Prophylactic action of oral fluconazole against fungal infection in neutropenic patients. A meta-analysis of 16 randomized, controlled trials. **Cancer**, v. 89, n. 7, p. 1611-1625, 2000.
155. KANKURI, E.; ASMAWI, M. Z.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H.; MOILANEN, E. Induction of iNOS in a rat model of acute colitis. **Inflammation**, v. 23, n. 2, p. 141-152, 1999.
156. KANWAR, S.; TEPPERMAN, B. L.; PAYNE, D.; SUTHERLAND, L. R.; KUBES, P. Time course of nitric oxide production and epithelial dysfunction during ischemia/reperfusion of the feline small intestine. **Circ Shock**, v. 42, n. 3, p. 135-140, 1994.
157. KARLSTEN, R.; GORDH, T.; POST, C. Local antinociceptive and hyperalgesic effects in the formalin test after peripheral administration of adenosine analogues in mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 70, n. 6, p. 434-438, 1992.
158. KAYATEKIN, B. M.; GÖNENÇ, S.; AÇIKGÖZ, O.; UYSAL, N.; DAYI, A. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. **Eur J Appl Physiol**, v. 87, p. 141-144, 2002.
159. KEIGHLEY, M. R.; STOCKBRUGGER, R. W. Inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18, n. 3, p. 66-70, 2003.
160. KESHAVARZIAN, A.; MORGAN, G.; SEDGHI, S.; GORDON, J. H.; DORIA, M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. **Gut**, v. 31, p. 786-790, 1990.

161. KESHAVARZIAN, A.; SEDGHI, S.; KANOFSKY, J.; LIST, T.; ROBINSON, C.; IBRAHIM, C.; WINSHIP, D. Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. **Gastroenterology**, v. 103, p. 177-185, 1992.
162. KETTLE, A. J.; GEDYE, C. A.; WINTERBOURN, C. C. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. **Biochem J**, v. 321, p. 503-508, 1997.
163. KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 502-512, 1994.
164. KIHARA, N.; DE LA FUENTE, S. G.; FUJINO, K.; TAKAHASHI, T.; PAPPAS, T. N.; MANTYH, C. R. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats. **Gut**, v. 52, n. 5, p. 713-719, 2003.
165. KIM, M. K.; CHOI, G. J.; LEE, H. S. Fungicidal property of Curcuma longa L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 6, p. 1578-1581, 2003.
166. KIMBALL, E. S.; WALLACE, N. H.; SCHNEIDER, C. R.; D'ANDREA, M. R.; HORNBY, P. J. Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16, n. 6, p. 811-818, 2004.
167. KIMURA, H.; HOKARI, R.; MIURA, S.; SHIGEMATSU, T.; HIROKAWA, M.; AKIBA, Y.; KUROSE, I.; HIGUCHI, H.; FUJIMORI, H.; TSUZUKI, Y.; SERIZAWA, H.; ISHII, H. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. **Gut**, v. 42, n. 2, p. 180-187, 1998.
168. KNIGGE, K. L. Inflammatory bowel disease. **Clin Cornerstone**, v. 4, n. 4, p. 49-60, 2002.
169. KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J**, v. 298, p. 249-258, 1994.
170. KOCH, L. G.; BRITTON, S. L. Genetic component of sensorimotor capacity in rats. **Physiol Genomics**, v. 13, n. 3, p. 241-247, 2003.

171. KOLIOS, G.; PETOUMENOS, C.; NAKOS, A. Mediators of inflammation: production and implication in inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v. 45, p. 1601-1609, 1998.
172. KOMATSU, H.; GHADISHAH, E.; ZENG, H.; KUHLENKAMP, J. F.; INOVA, M. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver evidence for a role of superoxide free radicals. **Am J Physiol**, v. 262, p. 6669-6676, 1992.
173. KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, L. S.; CHIA, T. F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacol Sin**, v. 24, n. 1, p. 7-21, 2003.
174. KONO, H.; RUSYN, I.; YIN, M.; GABELE, E.; YAMASHINA, S.; DIKALOVA, A.; KADIISKA, M. B.; CONNOR, H. D.; MASON, R. P.; SEGAL, B. H.; BRADFORD, B. U.; HOLLAND, S. M.; THURMAN, R. G. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. **J Clin Invest**, v. 106, p. 867-872, 2000.
175. KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**, v. 18, p. 412-416, 1959.
176. KRAUSE, J. E.; DIMAGGIO, D. A.; MCCARSON, K. E. Alterations in neurokinin 1 receptor gene expression in models of pain and inflammation. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 73, n. 7, p. 854-859, 1995.
177. KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology**, v. 87, p. 1344-1350, 1984.
178. KRAYCHETE, D. C.; GUIMARAES, A. C. Visceral hyperalgesia and chronic abdominal pain: diagnostic and therapeutic approach. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 53, n. 6, p. 833-853, 2003.
179. KWON, N. S.; STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. **J Exp Med**, v. 174, p. 761-767, 1991.
180. LACAZ, C. S. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.
181. LACAZ, C. S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica fungos**,

- actinomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo: Savier, 1991. Cap. 38. p. 616-651.
182. LACY, B. E.; LEE, R. D. Irritable bowel syndrome: a syndrome in evolution. **J Clin Gastroenterol**, v. 39, n. 4, p. S230-S242, 2005.
183. LAIRD, J. M.; MARTINEZ-CARO, L.; GARCIA-NICAS, E.; CERVERO, F. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. **Pain**, v. 92, n. 3, p. 335-342, 2001.
184. LANGMEAD, L.; FEAKINS, R. M.; GOLDTHORPE, S.; HOLT, H.; TSIRONI, E.; DE SILVA, A.; JEWELL, D. P.; RAMPTON, D. S. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral Aloe vera gel for active ulcerative colitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 19, n. 7, p. 739-747, 2004.
185. LANTÉRI-MINET, M.; BON, K.; DE POMMERY, J.; MICHIELS, J. F.; MENETREY, D. Cyclophosphamide cystitis as a model of visceral pain in rats: model elaboration and spinal structures involved as revealed by the expression of c-Fos and Krox-24 proteins. **Exp Brain Res**, v. 105, n. 2, p. 220-232, 1995.
186. LEVY, P. J.; KRAUSZ, M. M.; MANNY, J. Acute mesenteric ischemia: improved results – a retrospective analysis of ninety two patients. **Surgery**, v. 170, p. 372-380, 1990.
187. LI, X.; EISENACH, J. C. Alpha2A-adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 299, n. 3, p. 939-944, 2001.
188. LOEFFLER, J.; STEVENS, D. A. Antifungal drug resistance. **Clin Infect Dis**, v. 36, p. 31-41, 2003.
189. LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. **Dig Dis Sci**, v. 41, n. 6, p. 1204-1211, 1996.
190. LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992.
191. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

192. LUCHI, A. E. Wood anatomy of *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) from soils in different moisture levels. **Rev Bras Bot**, v. 27, n. 2, p. 271-280, 2004.
193. LUNDBERG, J. O.; HELLSTROM, P. M.; LUNDBERG, J. M.; ALVING, K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. **Lancet**, v. 344, p. 1673-1674, 1994.
194. MA, X. L.; WEYRICH, A. S.; LEFER, D. J.; LEFER, A. M. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. **Circ Res**, v. 72, n. 2, p. 403-412, 1993.
195. MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, p. 135-150, 1978.
196. MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 143-172, 1988.
197. MAGGI, C. A.; BEVAN, S.; WALPOLE, C. S.; RANG, H. P.; GIULIANI S. A comparison of capsazepine and ruthenium red as capsaicin antagonists in the rat isolated urinary bladder and vas deferens. **Br J Pharmacol**, v. 108, n. 3, p. 801-805, 1993.
198. MAGGI, C. A.; SANTICIOLI, P.; GEPPETTI, P.; PATACCHINI, R.; FRILLI, S.; ASTOLFI, M.; FUSCO, B.; MELI, A. Simultaneous release of substance P- and calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity from isolated muscle of the guinea pig urinary bladder. **Neurosci Lett**, v. 87, n. 1-2, p. 163-167, 1988.
199. MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **Eur J Immunol**, v. 25, p. 947-951, 1995.
200. MARTEAU, P.; LEPAGE, P.; MANGIN, I.; SUAU, A.; DORE, J.; POCHART, P.; SEKSIK, P. Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 20, n. 4, p. 18-23, 2004.
201. MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; SHANAHAN, F. Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, n. 1, p. 47-61, 2003.

202. MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; AUTORE, G.; MAIELLO, F. M.; DI CARLO, G.; CAPASSO, F. Acetic acid-induced colitis in normal and essential fatty acid deficient rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 272, n. 1, p. 469-475, 1995.
203. MATHESON, N. R.; WONG, P. S.; TRAVIS, J. Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 20, p. 325-330, 1981.
204. MATTOS, P. E. O. **Validação pré-clínica das atividades antinociceptiva, antiinflamatória, cicatrizante e antiespasmódica do látex do Croton urucurana Baillon (Sangra d'água)**. 131 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2001.
205. MAYER, E. A.; RAYBOULD, H. E. Role of visceral afferent mechanisms in functional bowel disorders. **Gastroenterology**, v. 99, n. 6, p. 1688-1704, 1990.
206. MEARIN, F.; CUCALA, M.; AZPIROZ, F.; MALAGELADA, J. R. The origin of symptoms on the brain-gut axis in functional dyspepsia. **Gastroenterology**, v. 101, n. 4, p. 999-1006, 1991.
207. MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Ver Biochem**, v. 52, p. 711-760, 1983.
208. MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.
209. MIAMPAMBA, M.; SHARKEY, K. A. Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. **Neurogastroenterol Motil**, v. 11, n. 3, p. 193-206, 1999.
210. MIDDLETON, S. J.; SHORTHOUSE, M.; HUNTER, J. O. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. **Lancet**, v. 341, p. 465-466, 1993.
211. MILLER, L. C.; TAINTER, M. L. Estimation of the ED₅₀ and error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 57, p. 261-264, 1944.
212. MILLER, M. J. S.; MACNAUGHTON, W. K.; ZHANG, X. J.; THOMPSON, J. H.; CHARBONNET, R. M.; BOBROWSKI, P.; LAO, J.; TRENTACOSTI, A. M.; SANDOVAL, M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine Sangre de Grado. **Am J Physiol**, v. 279, p. G192-G200, 2000.

213. MILLER, T. A.; LI, D.; KUO, Y. J.; SCHMIDT, K. L.; SHANBOUR, L. L. Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: effects of PGE₂ and ethanol. **Am J Physiol**, v. 249, p. G137-G144, 1985.
214. MILO, B.; RISCO, E.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; CAÑIGUERAL, S. Characterization of a Fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton urucurana*. **J Nat Prod**, v. 65, p. 1143-1146, 2002.
215. MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109-142, 1991.
216. MORALES, O. H. G.; ROCHE, N. P.; SÁNCHEZ, R. M. F. Enzimas geradores de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. **Rev Cubana Invest Biomed**, v. 17, n. 3, p. 190-197, 1998.
217. NALINI, S.; MATHAN, M. M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Oxygen free radical induced damage during intestinal ischemia/reperfusion in normal and xanthine oxidase deficient rats. **Mol Cell Biochem**, v. 124, n. 1, p. 59-66, 1993.
218. NAVARRO GARCIA, V. M.; GONZALEZ, A.; FUENTES, M.; AVILES, M.; RIOS, M. Y.; ZEPEDA, G.; ROJAS, M. G. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 87, n. 1, p.85-88, 2003.
219. NAVICKIENE, H. M.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D.; YOUNG, M. C.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000.
220. NEAL, K. R.; BARKER, L.; SPILLER, R. C. Prognosis in post-infective irritable bowel syndrome: a six year follow up study. **Gut**, v. 51, n. 3, p. 410-413, 2002.
221. NOA, M.; CARBAJAL, D.; MOLINA, V.; VALDES, S.; MAS, R. Comparative study of D-002 versus sulfasalazine on acetic acid-induced colitis in rats. **Drugs Exp Clin Res**, v. 26, p. 13-17, 2000.
222. NZEGWU, H. C.; LEVIN, R. J. Luminal capsaicin inhibits fluid secretion induced by enterotoxin *E. coli* STa, but not by carbachol, in vivo in rat small and large intestine. **Exp Physiol**, v. 81, n. 2, p. 313-315, 1996.
223. ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends Microbiol**, v. 11, p. 272-279, 2003.

224. OKUBO, S.; TODA, M.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against *Trichophyton*. **Nippon Saikingaku Zasshi**, v. 46, n. 2, p. 509-514, 1991.
225. OLIVAR, T.; LAIRD, J. M. Cyclophosphamide cystitis in mice: behavioural characterisation and correlation with bladder inflammation. **Eur J Pain**, v. 3, n. 2, p. 141-149, 1999.
226. OLIVER, C. N.; STARKE-REED, P. E.; STADMAN, E. R.; LIU, G. J.; CARNEY, J. M.; FLOYD, R. A. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 5144-5147, 1990.
227. OMAR, B.; MCCORD, J.; DOWNEY, J. Ischemia-reperfusion. In: Sies, H. (Ed.). **Oxidative stress: Oxidants and antioxidants**. London: Academic Press, 1991, p. 493-528.
228. O'MORAIN, C.; SMETHURST, P.; LEVI, J.; PETERS, T. J. Subcellular fractionation of rectal biopsy homogenates from patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 20, p. 209-214, 1985.
229. ONUMA, E. K.; DAS, K. M. Current medical therapy of inflammatory bowel disease. **Pract Gastroenterol**, p. 19-30, 1998.
230. OWENS, D. M.; NELSON, D. K.; TALLEY, N. J. The irritable bowel syndrome: long-term prognosis and the physician-patient interaction. **Ann Intern Med**, v. 122, n. 2, p. 107-112, 1995.
231. PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sci**, v. 75, n. 16, p. 1979-1987, 2004.
232. PALACIO, A.; CUÉTARA, M. S.; VALLE, A.; GONZÁLES, A.; ALMONDARAIM, I.; CASTILLO, M. J. R.; VASALLO, A. M.; MIGUENS, M. P. Cambios epidemiológicos observados en un decenio en las dermatofitosis del hospital universitario "12 de Octubre" de Madrid: nuevas especies emergentes. **Rev Iberoam Micol**, v. 16, p. 101-106, 1999.
233. PARMAR, N. S.; TARIA, M.; AGEEL, A. M. Gastric anti-ulcer and cytoprotective affect of selenium in rats. **Tox App Pharmacol**, v. 91, n. 1, p. 122-130, 1988.

234. PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Rev Soc Br Med Trop**, v. 35, p. 623-627, 2002.
235. PATTERSON, L. M.; ZHENG, H.; WARD, S. M.; BERTHOUD, H. R. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res**, v. 311, n. 3, p. 277-287, 2003.
236. PAYAN, D. G. Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. **Annu Rev Med**, v. 40, p. 341-352, 1989.
237. PEHLIVAN, M.; DALBELER, Y.; HAZINEDAROGLU, S.; ARIKAN, Y.; ERKEK, A. B.; GUNAL, O.; TURKCAPAR, N.; TURKCAPAR, A. G. An assessment of the effect of Ginkgo Biloba EGb 761 on ischemia reperfusion injury of intestine. **Hepatogastroenterology**, v. 49, n. 43, p. 201-204, 2002.
238. PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N.; BLAKE, D. A.; FARNSWORTH, N. R. South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity. **J Pharm Sci**, v. 68, p. 124-126, 1979.
239. PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clin Infect Dis**, v. 35, p. 1073-1080, 2002.
240. PERES, M. T. L. P.; DELLE MONACHE, F.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 56, p. 223-226, 1997.
241. PERES, M. T. L. P.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacochemical criteria used in their isolation. **Phytother Res**, v. 12, p. 209-211, 1998a.
242. PERES, M. T. L. P.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 171-174, 1998b.
243. PERNOW, B. Substance P. **Pharmacol Rev**, v. 35, n. 2, p. 85-141, 1983.
244. PERTOVAARA, A. Antinociception induced by alpha-2-adrenoceptor agonists, with special emphasis on medetomidine studies. **Prog Neurobiol**, v. 40, n. 6, p. 691-709, 1993.

245. PETTIBONE, D. J.; MUELLER, G. P. Alpha-adrenergic stimulation by clonidine increases plasma concentrations of immunoreactive beta-endorphin in rats. **Endocrinology**, v. 109, n. 3, p. 798-802, 1981.
246. PFEIFFER, C. J.; QIU, B. S. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on TNB-induced colitis in rats. **J Pharm Pharmacol**, v. 47, p. 827-832, 1995.
247. PHILLIPSON, J. D. A matter of some sensitivity. **Phytochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1319-1343, 1995.
248. PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American Dragon's Blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. **J Nat Prod**, v. 56, n. 6, p. 899-906, 1993.
249. PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; VAN POEL, B.; VINGERHOETS TOTTE, J.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. In vivo wound healing activity of Dragon's Blood (*Croton* spp.), a traditional South American drug, and its constituents. **Phytomedicine**, v. 2, p. 17-22, 1995.
250. PITTLER, M. H.; ERNST, E. Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. **Am J Gastroenterol**, v. 93 n. 7, p. 1131-1135, 1998.
251. PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease (1). **N Engl J Medicine**, v. 325, p. 928-937, 1991.
252. PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 347, n. 6, p. 417-429, 2002.
253. RACHMILEWITZ, D.; ELIAKIM, R.; ACKERMAN, Z.; KARMELI, F. Direct determination of colonic nitric oxide level - a sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol**, v. 93, n. 3, p. 409-412, 1998.
254. RACHMILEWITZ, D.; KARMELI, F.; OKON, E.; BURSZTYN, M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. **Gut**, v. 37, p. 247-255, 1995.
255. RACHMILEWITZ, D.; SIMON, P. L.; SCHWARTZ, L. W.; GRISWOLD, D. E.; FONDACARO, J. D.; WASSERMAN, M. A. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v. 97, p. 326-337, 1989.

256. RACHMILEWITZ, D.; STAMLER, J. S.; KARMELI, F.; MULLINS, M. E.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J.; XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Peroxynitrite-induced rat colitis--a new model of colonic inflammation. **Gastroenterology**, v. 105, p. 1681-1688, 1993.
257. RAJENDRA PRASAD, N.; ANANDI, C.; BALASUBRAMANIAN, S.; PUGALENDI, K. V. Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. **J Ethnopharmacol**, v. 91, p. 21-24, 2004.
258. RAO, S. S.; READ, N. W.; DAVISON, P. A.; BANNISTER, J. J.; HOLDSWORTH, C. D. Anorectal sensitivity and responses to rectal distention in patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 93, n. 6, p. 1270-1275, 1987.
259. RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
260. REITER, R. C. Evidence-based management of chronic pelvic pain. **Clin Obstet Gynecol**, v. 41, n. 2, p. 422-435, 1998.
261. REMICK, D. G.; VILLARETE, L. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. **J Leukoc Biol**, v. 59, p. 471-475, 1996.
262. RENZI, D.; MANTELLINI, P.; MAGGI, C. A.; FUCINI, C.; SURRENTI, C. Ruthenium red selectively antagonizes capsaicin-induced release of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from the human colon. **Neurosci Lett**, v. 126, n. 2, p. 134-136, 1991.
263. REPINE, J. E.; EATON, J. W.; ANDERS, M. W.; HOIDAL, J. R.; FOX, R. B. Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals, and human phagocytes in vitro. Detection with the anti-inflammatory agent, dimethyl sulfoxide. **J Clin Invest**, v. 64, n. 6, p. 1642-1651, 1979.
264. RIBBONS, K. A.; ZHANG, X. J.; THOMPSON, J. H.; GREENBERG, S. S.; MOORE, W. M.; KORNMEIER, C. M.; CURRIE, M. G.; LERCHE, N.; BLANCHARD, J.; CLARK, D. A. Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. **Gastroenterology**, v. 108, p. 705-711, 1995.
265. RICHTER, J. E.; BARISH, C. F.; CASTELL, D. O. Abnormal sensory perception in patients with esophageal chest pain. **Gastroenterology**, v. 91, n. 4, p. 845-852, 1986.

266. RIPON, J. W. Medical mycology. **The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988.
267. RODRIGUEZ, L. A.; RUIGOMEZ, A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. **BMJ**, v. 318, n. 7183, p. 565-566, 1999.
268. ROSLAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, n. 2, p. 235-242, 1990.
269. RUBIO, M. C.; REZUSTA, A.; TOMÁS, J. G.; RUESCA, R. B. Perspectiva micológica de los dermatofitos em el ser humano. **Rev Iberoam Micol**, v. 16, p. 16-22, 1999.
270. SAHPAZ, S.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M.; CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVE, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Med**, v. 60, n. 6, p. 538-540, 1994.
271. SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci Lett**, v. 235, n. 1-2, p. 73-76, 1997.
272. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, Capítulo 15, p. 301-332, 2001.
273. SCHICHO, R.; FLORIAN, W.; LIEBMANN, I.; HOLZER, P.; LIPPE, I. T. Increased expression of TRPV1 receptor in dorsal root ganglia by acid insult of the rat gastric mucosa. **Eur J Neurosci**, v. 19, n. 7, p. 1811-1818, 2004.
274. SCHULTSZ, C.; VAN DEN BERG, F. M.; TEN KATE, F. W.; TYTGAT, G. N.; DANKERT, J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. **Gastroenterology**, v. 117, n. 5, p. 1089-1097, 1999.
275. SCHWARZ, B.; SALAK, N.; HOFSTOTTER, H.; PAJIK, W.; KNOTZER, H.; MAYR, A.; HASIBEDER, W. Intestinal ischemic reperfusion syndrome: pathophysiology, clinical significance, therapy. **Wien Klin Wochenschr**, v. 111, n. 14, p. 539-548, 1999.

276. SEDGHI, S.; FIELDS, J. Z.; KLAMUT, M.; URBAN, G.; DURKIN, M.; WINSHIP, D.; FRET LAND, D.; OLYAEE, M.; GRISHAM, M. B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. **Lancet**, v. 344, p. 859-861, 1994.
277. SEGUNDO, C.; MARTINEZ, A.; ARENAS, R.; FERNANDEZ, R.; CERVANTES, R. A. Dermatomicosis por *Microsporium canis* em humanos y animales. **Rev Iberoam Micol**, v. 21, p. 39-41, 2004.
278. SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.
279. SEO, H. G.; TAKATA, I.; NAKAMURA, M.; TATSUMI, H.; SUZUKI, K.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N. Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dismutases in experimental colitis in rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 324, n. 1, p. 41-47, 1995.
280. SHAH, P. C.; KRAJDEN, S.; KANE, J.; SUMMERBELL, R. C. Tinea corporis caused by *Microsporium canis*: report of a nosocomial outbreak. **Eur J Epidemiol**, v. 4, n. 1, p. 33-38, 1988.
281. SHARON, P.; STENSON, W.F. Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats. Similarity to human inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 88, p. 55-63, 1985.
282. SI, J. M.; YU, Y. C.; FAN, Y. J.; CHEN, S. J. Intestinal microecology and quality of life in irritable bowel syndrome patients. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 12, p. 1802-1805, 2004.
283. SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287 p.
284. SILVA, M. V.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; FERREIRA, E. C.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SILVA, M. R. R. Growth inhibition effect of Brazilian cerrado plant extracts on *Candida* species. **Pharm Biol**, v. 39, p. 138-141, 2001.
285. SILVERMAN, D. H.; MUNAKATA, J. A.; ENNES, H.; MANDELKERN, M. A.; HOH, C. K.; MAYER, E. A. Regional cerebral activity in normal and pathological perception of visceral pain. **Gastroenterology**, v. 112, n. 1, p. 64-72, 1997.

286. SIMMONDS, N. J.; ALLEN, R. E.; STEVENS, T. R. J.; VAN SOMEREN, R. N. M.; BLAKE, D. R.; RAMPTON, D. S. Chemiluminescence assay of mucosal reactive metabolites in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 103, p. 186-196, 1992.
287. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.
288. SIMPSON, R.; ALON, R.; KOBZIK, L.; VALERI, C. R.; SHEPRO, D.; HECHTMAN, H. B. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. **Ann Surg**, v. 218, n. 4, p. 444-453, 1993.
289. SINGER, I.I.; KAWKA, D. W.; SCOTT, S.; WEIDNER, J. R.; MUMFORD, R. A.; RIEHL, T. E.; STENSON, W. F. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 111, n. 4, p. 871-885, 1996.
290. SINSKI, J. T.; FLOURAS, K. A survey of dermatophytes isolated from human patients in the United States from 1979 to 1981 with chronological listings of worldwide incidence of five dermatophytes often isolated in the United States. **Mycopathologia**, v. 85, n. 1-2, p. 97-120, 1984.
291. SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Activity - guided isolation of constituents of *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, based on the brine shrimp lethality bioassay. **Quím Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.
292. SNIDER, R.; LANDERS, S.; LEVY, M. L. The ringworm riddle: an outbreak of *Microsporum canis* in the nursery. **Pediatr Infect Dis J**, v. 12, n. 2, p. 145-148, 1993.
293. SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JUNIOR, J. G.; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. R. R. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. **Brazil J Microbiol**, v. 33, p. 247-249, 2002.
294. SOUZA-FIHO, M. V.; LIMA, M. V.; POMPEU, M. M.; BALLEJO, G.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. DE A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am J Pathol**, v. 150, n. 1, p. 247-256, 1997.

295. SOUZA, L. K.; DE OLIVEIRA, C. M.; FERRI PH, D. E.; OLIVEIRA JUNIOR, J. G.; DE SOUZA JUNIOR, A. H.; FERNANDES ODE, F.; SILVA MDO, R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 963-965, 2003.
296. SPATZ, L. Introduction. In: Spatz, L.; Bloom, A. D., eds. **Biological consequences of oxidative stress**. New York: Oxford University Press, 1992, p. 3-22.
297. SPILLER, R. C. Estimating the importance of infection in IBS. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 2, p. 238-241, 2003.
298. SPILLER, R. C.; JENKINS, D.; THORNLEY, J. P.; HEBDEN, J. M.; WRIGHT, T.; SKINNER, M.; NEAL, K. R. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. **Gut**, v. 47, n. 6, p. 804-811, 2000.
299. STENSON, W. Inflammatory bowel disease. In: Yamada, T.; Alpes, D.; Chung, O. eds. **Textbook of Gastroenterology**. Filadélfia: Pa:JB Lippincott, 1995. v. 1, p. 1754-1757.
300. SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Probiotics and gastrointestinal diseases. **J Intern Med**, v. 257, n. 1, p. 78-92, 2005.
301. SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Probiotics in human infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, n. 5, p. 625-627, 2002.
302. SWIDSINSKI, A.; LADHOFF, A.; PERNTHALER, A.; SWIDSINSKI, S.; LOENING-BAUCKE, V.; ORTNER, M.; WEBER, J.; HOFFMANN, U.; SCHREIBER, S.; DIETEL, M.; LOCHS, H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 44-54, 2002.
303. SYDNEY, M. M.; FINEGOLD, M. D.; ELLEN BARON, J. O. **Banley and Scott's Diagnostic Microbiology**. 11. ed. Filadélfia: Elsevier-Health Sciences Division, 2001. 1069 p.
304. TAKAHASHI, R. N.; PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 20, n. 5, p. 607-610, 1987.
305. TALLEY, N. J.; WEAVER, A. L.; TESMER, D. L.; ZINSMEISTER, A. R. Lack of discriminant value of dyspepsia subgroups in patients referred for upper endoscopy. **Gastroenterology**, v. 105, n. 5, p. 1378-1386, 1993.

306. TALLEY, N. J.; WEAVER, A. L.; ZINSMEISTER, A. R.; MELTON, L. J. 3RD. Onset and disappearance of gastrointestinal symptoms and functional gastrointestinal disorders. **Am J Epidemiol**, v. 136, n. 2, p. 165-177, 1992.
307. THOMPSON, N. P.; MONTGOMERY, S. M.; WADSWORTH, M. E.; POUNDER, R. E.; WAKEFIELD, A. J. Early determinants of inflammatory bowel disease: use of two national longitudinal birth cohorts. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 1, p. 25-30, 2000.
308. TIGNO, X. T.; GUMILA, E. In vivo microvascular actions of *Artemisia vulgaris* L. in a model of ischemia-reperfusion injury in the rat intestinal mesentery. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 23, n. 2-4, p. 159-165, 2000.
309. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2000. 827 p.
310. TURNAGE, R. H.; KADESKY, K. M.; BARTULA, L.; MYERS, S. I. Intestinal reperfusion up-regulates inducible nitric oxide synthase activity within the lung. **Surgery**, v. 118, n. 2, 288-293, 1995.
311. UBILLAS, R.; JOLAD, S. D.; BRUENING, R. C.; KERNAN, M. R.; KING, S. R.; SESIN, D. F.; BARRETT, M.; STODDART, C. A.; FLASTER, T.; KUO, J.; AYALA, F.; MEZA, E.; CASTAÑEL, M.; MCMEEKIN, D.; ROZHON, E.; TEMPESTA, M. S.; BARNARD, D.; HUFFMAN, J.; SMEE, D.; SIDWELL, R.; SOIKE, K.; BRAZIER, A.; SAFRIN, S.; ORLANDO, R.; KENNY, P. T. M.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K. SP-303, na antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). **Phytomedicine**, v. 1, p. 77-106, 1994.
312. UCHIDA, K.; KATO, Y.; KAWAKISHI, S. A novel mechanism for oxidative damage of prolyl peptides induced by hydroxyl radicals. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 169, p. 265-271, 1990.
313. VAISBERG, A. J.; MILLA, M.; PLANAS, M. D. C.; CORDOVA, J. L.; AGUSTI, E. R.; FERREYRA, R.; MUSTIGA, M. D. C.; CARLIN, L.; HAMMOND, G. B. Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. **Planta Med**, v. 55, p. 140-143, 1989.
314. VALLETTE, G.; JARRY, A.; LEMARRE, P.; BRANKA, J. E.; LABOISSE, C. L. NO-dependent and NO-independent IL-1 production by a human colonic epithelial cell line under inflammatory stress. **Br J Pharmacol**, v. 121, p. 187-192, 1997.

315. VELJACA, M.; LESCH, C. A.; PLLANA, R.; SANCHEZ, B.; CHAN, K.; GUGLIETTA, A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 272, n. 1, p. 417-422, 1995.
316. VENGE, P. Eosinophil activity in bronchial asthma. **Allergy Proc**, v. 15, n. 3, p. 139-141, 1994.
317. VERNE, G. N.; ROBINSON, M. E.; PRICE, D. D. Hypersensitivity to visceral and cutaneous pain in the irritable bowel syndrome. **Pain**, v. 93, n. 1, p. 7-14, 2001.
318. WALKER, E. A.; GELFAND, A. N.; GELFAND, M. D.; GREEN, C.; KATON, W. J. Chronic pelvic pain and gynecological symptoms in women with irritable bowel syndrome. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, v. 17, n. 1, p. 39-46, 1996.
319. WALLACE, J. K.; BRAQUET, P.; IBBOTSON, G. C.; MACNAUGHTON, W. K.; CIRINO, G. Assessment of the role of platelet activating factor in an animal model of inflammatory bowel disease. **J Lipid Med**, v. 1, p. 13-23, 1989.
320. WALLACE, J. L.; WHITTLE, B. J. Gastrintestinal damage induced by platelet-activating factor. Inhibition by the corticoid, dexamethasone. **Dig Dis Sci**, v. 33, n. 2, p. 225-232, 1988.
321. WANG, L.; FANG, X.; PAN, G. Intestinal infection and irritable bowel syndrome. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**, v. 41, n. 2, p. 90-93, 2002.
322. WARD, S. M.; BAYGUINOV, J.; WON, K. J.; GRUNDY, D.; BERTHOUD, H. R. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. **J Comp Neurol**, v. 465, n. 1, p. 121-135, 2003.
323. WEI, E. T.; KIANG, J. G.; BUCHAN, P.; SMITH, T. W. Corticotropin-releasing factor inhibits neurogenic plasma extravasation in the rat paw. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 238, n. 3, p. 783-787, 1986.
324. WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.
325. WHEAT, J. Endemic mycoses in AIDS: A clinical review. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, p. 146-159, 1995.
326. WHEELER, M. D.; KONO, H.; YIN, M.; RUSYN, I.; FROH, M.; CONNOR, H. D.; MASON, R. P.; SAMULSKI, R. J.; THURMAN, R. G. Delivery of Cu/Zn-

superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. **Gastroenterology**, v. 120, n. 5, p. 1241-1250, 2001.

327. WHITEHEAD, W. E.; PALSSON, O.; JONES, K. R. Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders: what are the causes and implications? **Gastroenterology**, v. 122, n. 4, p. 1140-1156, 2002.
328. WILSON, C.; GUPTA, R.; GILMOUR, D. G.; IMRIE, C. W. Acute superior mesenteric ischaemia. **Br J Surg**, v. 7, p. 279-281, 1987.
329. WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic Biol Méd**, v. 25, n. 4-5, p. 434-56, 1998.
330. YADAV, S. K.; JAIN, A. K.; TRIPATHI, S. N.; GUPTA, J. P. Irritable bowel syndrome: therapeutic evaluation of indigenous drugs. **Indian J Med Res**, v. 90, p. 496-503, 1989.
331. YAMADA, T.; SARTOR, R. B.; MARSHALL, S.; SPECIAN, R. D.; GRISHAM, M. B. Mucosal injury and inflammation in a model of chronic granulomatous colitis in rats. **Gastroenterology**, v. 104, p. 759-771, 1993.
332. YEH, S. Y. The effect of antihistaminic drugs on pentazocine antinociception in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, n. 4, p. 925-930, 1986.
333. YIANGOU, Y.; FACER, P.; DYER, N. H.; CHAN, C. L.; KNOWLES, C.; WILLIAMS, N. S.; ANAND, P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. **Lancet**, v. 357, n. 9265, p. 1338-1339, 2001.
334. YOUSSEF, N. N. IBD or IBS: when there is abdominal pain, does it really matter? **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 38, n. 4, p. 460-461, 2004.
335. ZHOU, H.; MINESHITA, S. The effect of beberine chloride on experimental colitis in rats in vivo and in vitro. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 294, p. 822-829, 2000.
336. ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Reperfusion injury. **Surg Clin North Am**, v. 72, n. 1, p. 65-83, 1992.