



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EFEITOS GASTROINTESTINAIS E
COMPORTAMENTAIS DO LUPEOL E DA DILACTONA DO ÁCIDO
VALONÉICO, ISOLADOS DE *CENOSTIGMA MACROPHYLLUM* TUL., EM
ROEDORES**

SILVÉRIA REGINA DE SOUSA LIRA

FORTALEZA-CE

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SILVÉRIA REGINA DE SOUSA LIRA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EFEITOS GASTROINTESTINAIS E
COMPORTAMENTAIS DO LUPEOL E DA DILACTONA DO ÁCIDO
VALONÉICO, ISOLADOS DE *CENOSTIGMA MACROPHYLLUM* TUL., EM
ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia

Orientador (a):

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos.

Co-orientador:

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

FORTALEZA

2010

L745e Lira, Silvéria Regina de Sousa

Estudo farmacológico dos efeitos gastrointestinais e comportamentais do lupeol e da dilactona do ácido valonéico, isolados de *Cenostigma macrophyllum* Tul., em roedores / Silvéria Regina de Sousa Lira. – Fortaleza, 2010.

198 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2010

1. Plantas Medicinais 2. Gastroenterologia 3. Sistema Nervoso Central I. Santos, Flávia Almeida (orient.) II. Título

CDD: 615.32

SILVÉRIA REGINA DE SOUSA LIRA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EFEITOS GASTROINTESTINAIS E
COMPORTAMENTAIS DO LUPEOL E DA DILACTONA DO ÁCIDO
VALONÉICO, ISOLADOS DE *CENOSTIGMA MACROPHYLLUM* TUL., EM
ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia

Orientador (a):

Profª. Dra. Flávia Almeida Santos.

Co-orientador:

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Flávia Almeida Santos (Orientadora- UFC)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Maria Bernardete de Sousa Maia (UFPE)

Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida (UFPI)

Universidade Federal do Piauí

Profª. Dra. Juvenia Bezerra Fontenele (UFC)

Universidade Federal do Ceará

Profª. Dr. Vietla Satyanarayana Rao (UFC)

Universidade Federal do Ceará

É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;

é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final .

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver..."

Martin Luther King

*A **Deus**, toda honra e toda glória por mais esta vitória conquistada em minha vida..*

*Aos meus pais, **Silvestre e Maria José** pelo amor sem limites, apoio incondicional e palavras de incentivo que norteiam toda minha trajetória de vida.*

*A minha irmã **Silvana**, meus irmãos **Sergio, Gerson e Gilson**, minhas cunhadas **Michelle, Ivonete e Ticiane** e minhas adoráveis sobrinhas **Susane, Bárbara, Geovana e Thainá** porque sei que posso sempre contar com vocês em tudo e todos os momentos.*

*Ao meu amado esposo **Alexandre**, por estar sempre ao meu lado oferecendo seu amor, carinho, conforto e atenção e por toda felicidade que traz a meu mundo.*

*A meu enteado **Thiago** que sempre me tratou com carinho e doçura e por compreender a distância que no momento nos separa.*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Flávia Almeida Santos, minha orientadora, pela oportunidade e disponibilidade em me auxiliar em muitos momentos durante a execução desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao pela a atenção a mim dispensada, pelo apoio imprescindível a realização deste projeto e principalmente por ser um exemplo de sabedoria e amizade que levarei comigo para sempre.

A Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida por ter me aberto as portas da pós-graduação desde o mestrado e por estar sempre presente em minha caminhada científica me incentivando e estendendo as mãos em momentos cruciais.

A Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça minha primeira “mãe científica”, exemplo de profissional competente e ser humano admirável.

A Profa. Dra. Mariana Helena Chaves e sua equipe pela amizade e fornecimento do material para estudo.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira pela amizade, incentivo e inúmeras contribuições desde a confecção do projeto inicial.

As Profas. Dra. Juvenia Bezerra Fontenele e Dra. Maria Bernarde e de Sousa Maia por atender prontamente nosso convite para participar da banca avaliadora, deixando seus afazeres para nos ajudar a aperfeiçoar este trabalho.

A Kristiana Mousinho, Cinthia Iamylle Fritz Brandão e família, Ana Carla de Carvalho, Marjorie Moreira Guedes e Deise Viviana Tenazoa Wong por serem meu refúgio nos momentos de incertezas e dificuldades e meu porto seguro longe de casa... adoro vocês.

A Cecília Carvalho, Roberta Dalcícolo, Otacílio Benvindo e José Roberto, por todos os momentos de descontração vividos juntos e fundamentais ao bom funcionamento dos neurônios.

Aos amigos que já fizeram parte do LPN, em especial Roberto César Lima Júnior, Caroline Melo Mourão, Alana Lima Fonteles, Thiago Moreira de Olinda, Danilo Gonçalves e Iana Bantim pela acolhida carinhosa, amizade e parceria na execução dos experimentos.

Aos pós-graduandos do LPN, Talita Cavalcante Moraes, Karine Carvalho, Natália Bitú, Julianne Frota e Célio Lima pela amizade que em tantos momentos os fizeram abrir mão de seus experimentos para que eu pudesse realizar os meus.

A todos os bolsistas de iniciação científica do LPN, pelo auxílio e amizade.

As técnicas de laboratório do LPN, Marta Braga, Nízia Rodrigues e Anyssa Quintino, pelo carinho, pela contribuição durante os experimentos e por manterem a ordem em nosso local de trabalho.

Aos demais funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pela disponibilidade em sempre atender nossas solicitações.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em especial do Departamento de Morfofisiologia Veterinária, por tornarem possível meu afastamento para realização deste curso e pelo incentivo constante a minha qualificação... vocês são demais.

Ao programa CAPES/PROCAD, pelo apoio financeiro, de extrema importância para realização deste trabalho.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta colaboraram no desenvolvimento desta pesquisa e para esta realização pessoal... o meu MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO:	22
1.1	Fisiologia e Anatomia do Trato gastrointestinal.....	22
1.1.1	Fisiologia da Secreção Gástrica.....	23
1.1.2	Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	26
1.2	Úlcera gástrica.....	29
1.3	Terapêutica da úlcera péptica.....	31
1.4	Plantas Medicinais.....	34
1.4.1	Considerações Gerais.....	34
1.4.2	Atividade de plantas sobre o trato gastrointestinal.....	36
1.4.3	Família Leguminosae e subfamília Caesalpinioideae.....	37
1.4.4	O gênero Cenostigma.....	38
1.5	Terpenóides.....	44
1.5.1	Lupeol.....	44
1.6	Taninos.....	46
1.6.1	Dilactona do ácido valonéico.....	47
2	JUSTIFICATIVA:	49
3	OBJETIVOS:	51
3.1	Objetivos Gerais.....	51
3.2	Objetivos Específicos.....	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1	Coleta e Identificação do Material.....	52
4.2	Isolamento da dilactona do ácido valoneico (DAV) e do lupeol.....	52
4.3	Animais Experimentais.....	52
4.4	Drogas e Reagentes.....	54
4.5	Avaliação do efeito do Lupeol e da DAV sobre o trato gastrointestinal.....	56
4.5.1	Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	56
4.5.2	Avaliação do efeito da DAV e Lupeol sobre os grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH).....	56
4.6	Investigação da atividade do Lupeol sobre o Sistema Nervoso Central.....	61
4.6.1	Teste do Campo Aberto.....	61
4.6.2	Teste do Rota Rod.....	61
4.6.3	Teste da potencialização do sono induzido por pentobarbital.....	61
4.6.4	Teste da suspensão da cauda.....	62
4.6.5	Teste de Catalepsia.....	62
4.6.6	Hiperlocomoção induzida por anfetamina em camundongos.....	62
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
6	RESULTADOS	64
6.1	Efeito do lupeol nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	64
6.2	Efeito da DAV nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	64
6.3	Papel dos Grupos Sulfidrílicos Não Protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	67
6.4	Papel dos Grupos Sulfidrilas Não Protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	67
6.5	Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do lupeol.....	69
6.6	Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DAV.....	70

6.7	Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	71
6.8	Papel dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	73
6.9	Papel dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	73
6.10	Papel dos canais de cálcio no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	76
6.11	Papel dos canais de cálcio no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	76
6.12	Papel do receptor α_2 adrenérgico no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	79
6.13	Papel do receptor α_2 adrenérgico no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	79
6.14	Papel dos receptores opióides no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	81
6.15	Papel dos receptores opióides no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	81
6.16	Efeito do Lupeol sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em ratos	84
6.17	Efeito da DAV sobre a secreção gástrica modelo ligação piloro em ratos.....	84
6.18	Efeito do tratamento com lupeol sobre a motilidade intestinal camundongos	86
6.19	Efeito do tratamento com DAV sobre o trânsito intestinal em camundongos	86
6.19.1	Efeito do tratamento com DAV sobre o trânsito intestinal de camundongos – participação de receptores opióides.....	89
6.19.2	Efeito do tratamento com DAV sobre o trânsito intestinal normal de camundongos – participação de receptores alfa ₂ adrenérgicos	89
6.20	Efeito do tratamento com DAV sobre o trânsito estimulado por óleo de rícino em camundongos.....	92
6.21	Efeito da administração de lupeol e DAV na atividade locomotora dos animais no campo aberto.....	93
6.22	Efeito da administração de DAV na coordenação motora dos animais no teste do Rota Rod.....	95
6.23	Efeito da administração de DAV sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital.....	97
6.24	Efeito do tratamento com DAV no teste de suspensão da cauda.	99
6.25	Efeito da administração da DAV no tempo de permanência na barra no teste da catalepsia	99
6.26	Efeito do tratamento com DAV na hiperlocomoção induzida por anfetamina em camundongos.....	102
7	DISCUSSÃO	103
8	CONCLUSÕES.....	118
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
10	ANEXOS	157
10.1	Artigo.....	157
10.2	Publicação na mesma linha de pesquisa:.....	157
10.3	Publicação em linha de pesquisa afim (produtos naturais):	157

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVEATURAS

%	Percentagem
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
Ach	Acetilcolina
AcOEt	Acetato de etila
Al	Alumínio
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AT	Adenosina trifosfato
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCK	Colecistocinina
CCK ₂	Receptor de colecistocinina tipo 2
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
COX	Ciclooxigenases
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
COX-3	Ciclooxigenase tipo 3
Cu	Cobre
Da	Daltons
DAV	Dilactona do ácido valonéico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EC	Células enterocromafins
ELC	Células enterocromafins “like”
E.P.M.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético sal dissódico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EP ₃	Receptor prostanóide tipo 3

EROs	Espécies reativas de oxigênio
et al.	...e colaboradores
EEtOH	Extrato etanólico
EH ₂ O	extrato aquoso
FAE	fase acetato de etila
Fe	Ferro
FHA	Fase hidroalcoólica
FRB	Fração rica em biflavonas
g	Gramas
GABA	Ácido gama aminobutírico
G _i	Proteína G inibitória
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
H ₂	Receptor de histamina tipo 2
H ⁺ K ⁺ ATPase	Bomba de prótons
HCl	Ácido clorídrico
HCO ₃	Bicarbonato
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p.	Intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K _{ATP}	Canais de potássio sensíveis a ATP
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metilester
M	Molar
M ₃	Receptor muscarínico tipo 3
MeOH/H ₂ O	Metanol/água
MDA	Malonilaldeído
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min.	Minuto
mL	Mililitro

mm ²	Milímetros quadrados
Mn	Manganês
NAC	N-acetilcisteína
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
nmoles	Nanomoles
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NP-SH	Grupos sulfidrílicos não-protéicos
°C	Grau centígrado
p	Probabilidade de erro
P.A.	Para análise
PACAP	Peptídeo ativador da adenilil ciclase pituitária
PCA1	Receptor do peptídeo ativador da adenilil ciclase pituitária
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PPis	Inibidores da bomba de proton
PKA	Proteína cinase A
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
s.c.	Sub-cutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SOD	Superóxido dismutase
SST	Somatostatina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Trato gastrointestinal
TNB	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
U.S.A.	United States of America

UV	Ultravioleta
VAPAC	Receptores do peptídeo intestinal vasoativo
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
v.o.	Via oral
vs	Versus
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA FIGURAS

Figura 01. Vias de sinalização dos principais mediadores da secreção ácida gástrica.

Figura 02. Terapêutica da úlcera péptica.

Figura 03. Mapa da distribuição de *Cenostigma*.

Figura 04. *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire.

Figura 05. Estrutura química de algumas substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Figura 06. Estrutura química de algumas substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Figura 07. 2-metil-1-3-butadieno (Isopreno)

Figura 08. Esquema de obtenção da dilactona do ácido valonéico (DAV) e do lupeol

Figura 09. Efeito gastroprotetor do Lupeol no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos

Figura 10. Efeito gastroprotetor da DAV no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

Figura 11. Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do lupeol.

Figura 12. Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DAV.

Figura 13. Papel dos receptores opióides no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

Figura 14. Papel dos receptores opióides no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

Figura 15. Efeito do tratamento com Lupeol no trânsito intestinal de camundongos.

Figura 16. Efeito do tratamento com DAV no trânsito intestinal de camundongos.

Figura 17. Efeito do tratamento com DAV no trânsito intestinal de camundongos – participação de receptores opióides.

Figura 18. Efeito do tratamento com DAV no trânsito intestinal de camundongos – participação de receptores alfa adrenérgico.

Figura 19A. Efeito do lupeol sobre a atividade locomotora espontânea no teste da movimentação espontânea.

Figura 19B. Efeito da DAV sobre a atividade locomotora espontânea no teste da movimentação espontânea.

Figura 20A. Efeito da DAV sobre o tempo de permanência dos animais na barra no teste do rota rod.

Figura 20B. Efeito da DAV sobre o número de queda dos animais no teste do rota rod.

Figura 21A. Efeito da DAV sobre a latência, em segundos, do sono induzido por pentobarbital .

Figura 21B. Efeito da DAV sobre a duração, em segundos, do sono induzido por pentobarbital .

Figura 22. Efeito da DAV sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda.

Figura 23A. Efeito da DAV sobre o tempo de permanência dos animais na barra no teste de catalepsia.

Figura 23B. Efeito do lupeol sobre o tempo de permanência dos animais na barra no teste de catalepsia.

Figura 24. Efeito da DAV sobre a hiperlocomoção induzida por anfetamina.

LISTA TABELAS

Tabela 1. Efeito do Lupeol e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

Tabela 2. Efeito da DAV e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

Tabela 3. Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do Lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Tabela 4. Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Tabela 5. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}), no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Tabela 6. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}), no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Tabela 7. Papel dos canais de cálcio, no efeito gastroprotetor do Lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Tabela 8. Papel dos canais de cálcio, no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Tabela 9. Papel dos receptores alfa 2 adrenérgico no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos..

Tabela 10. Papel dos receptores alfa 2 adrenérgico no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos..

Tabela 11. Efeito do lupeol e Cimetidina sobre o volume secretório gástrico e acidez gástrica total em ratos com piloro ligado.

Tabela 12. Efeito da DAV e Cimetidina sobre o volume secretório gástrico e acidez gástrica total em ratos com piloro ligado.

Tabela 13. Efeito do tratamento com DAV no trânsito intestinal estimulado com óleo de castor em camundongos.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Atividades farmacológicas já estudadas para *C. macrophyllum*.

RESUMO

O triterpeno lupeol e o tanino hidrolisável dilactona do ácido valonéico (DAV), componentes majoritários de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae), foram avaliados no modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol e em modelos comportamentais. O lupeol (3, 10 e 30mg/kg, v.o.) e a DAV (3, 10 e 30mg/kg, i.p.) atenuaram significativamente ($p < 0,05$) as lesões gástricas induzidas por etanol. No estudo mecanístico, o lupeol (30mg/kg) e a DAV (10mg/kg) mostraram ação antioxidante, prevenindo a depleção de grupos sulfidrila não protéicos e a participação do óxido nítrico, de prostaglandinas, de canais de potássio ATP-dependentes e canais de cálcio. Foi observada ainda a participação de receptores alfa-adrenérgicos, mas não de receptores opióides, no mecanismo gastroprotetor das substâncias. Tanto o lupeol (30 mg/kg) quanto a DAV (10mg/kg) reduziram a acidez gástrica total sem alterar o volume secretório gástrico no modelo de ligadura do piloro. Na avaliação sobre a motilidade intestinal normal, o tratamento com lupeol (3, 10 e 30mg/kg) não alterou o percentual de trânsito em relação ao controle, contudo a DAV (3, 10 e 30mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o percentual de trânsito, por um mecanismo que não envolve receptores opióides ou adrenérgicos. DAV (10 mg/kg) também foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) o trânsito estimulado por óleo de rícino. Nos modelos comportamentais, o lupeol (3, 10 e 30mg/kg, v.o.) não produziu alteração na atividade locomotora dos animais no teste da movimentação espontânea, entretanto o tratamento com DAV (3, 10 e 30mg/kg, i.p.) produziu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da atividade locomotora no mesmo teste, sem alterar a coordenação motora dos animais no teste do rota rod. O tratamento com DAV (3,10 e 30mg/kg) reduziu a latência e aumentou a duração do sono induzido por pentobarbital sódico, assim como aumentou o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda. A administração de DAV nas doses de 3, 10 e 30mg/kg induziu catalepsia nos animais e a dose de 10mg/kg foi capaz de inibir a hiperlocomoção induzida por anfetamina (5 mg/kg). Estes dados sugerem que tanto o lupeol quanto a DAV possuem um potencial efeito gastroprotetor possivelmente relacionado a um mecanismo antioxidante, ao aumento de grupos NP-SH, com participação do NO, das PGs, dos canais de K+ATP e do cálcio. A DAV demonstrou alterações comportamentais que sugerem um efeito depressor do Sistema Nervoso Central com possível envolvimento da dopamina.

Palavras Chaves: *Cenostigma macrophyllum*, lupeol, dilactona do ácido valonéico, gastroproteção, efeitos comportamentais.

ABSTRACT

The Lupeol triterpene and valoneic acid dilactone (VAD), two major chemical components isolated from *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae) were evaluated in the experimental model gastric lesion induced by ethanol and in animal models of behavioral. Both lupeol (3, 10 and 30 mg/kg, p.o.), and VAD (3, 10 and 30 mg/kg, i.p.) afforded significant gastroprotection ($p < 0,05$) against absolute ethanol-induced gastric lesions. In the mechanistic studies, lupeol (30mg/kg) and VAD (10mg/kg) demonstrated an antioxidant action by preventing the ethanol-evoked depletion of non-protein sulfhydryls (NP-SHs), the involvement of nitric oxide (NO), prostaglandins (PGs), and the ATP-dependent potassium and calcium channels. Also observed were the participation of α 2-adrenoceptors but not the opioid receptors in the gastroprotective effect of these substances. Lupeol (30 mg/kg) as well as DAV (10mg/kg) effectively reduced the total acidity ($p < 0,05$) in the stomach without altering the gastric secretory volume in pylorus-ligated rat. While normal intestinal transit was unaltered by lupeol (3, 10 e 30 mg/kg). VAD (3, 10 e 30 mg/kg) significantly ($p < 0,05$) reduced by a mechanism that do not involve either opioid or adrenergic receptors. In addition, VAD (10 mg/kg) was also able to inhibit significantly ($p < 0, 05$) the intestinal transit promoted by castor oil in mice. In open field test, lupeol (3, 10 e 30mg/kg) failed to demonstrate no significant change in locomotor activity of animals. However VAD (3, 10 e 30mg/kg) showed significant diminution ($p < 0,05$) of locomotor activity in this test, but did not affect the motor coordination in rota-rod test. Mice treated with VAD (3,10 and 30mg/kg) demonstrated reduced latency and increase duration of sleeping time induced by pentobarbital sodium and showed enhanced immobility time in tail-suspension test. VAD at the doses 3, 10 and 30 mg/kg induced catalepsy in animals and at 10 mg/kg, it could effectively counteract the hypermotility induced by amphetamine (5mg/kg). These results suggest that both lupeol and VAD can afforded gastroprotection against ethanol induced gastric injuri primarily through an antioxidant mechanism by restoring glutathione (NS-PH). The study further indicate the possible involvement of NO, PGs, KATP channel activation as well as membrane calcium. Besides the gastroprotection, DAV evidenced depressant effects in behavioral tests, possibly involving monoaminergic or adenosinergic systems which need to be clarified in a future study.

Key words: *Cenostigma macrophyllum*, lupeol triterpene, valoneic acid diterpene, gastroprotection, behavioral effects.

1 INTRODUÇÃO:

1.1 Fisiologia e Anatomia do Tratogastrointestinal.

O trato gastrointestinal (TGI) é um dos sistemas de fundamental importância para o organismo, considerando sua função de provê-lo de água, eletrólitos e alimentos e de excretar os resíduos gerados (BODE; BODE, 1997).

O TGI possui um sistema nervoso próprio, denominado Sistema Nervoso Entérico (SNE), que contém cerca de 100 milhões de neurônios, número esse, que se aproxima àquele existente na medula espinhal. O SNE começa no esôfago e estende-se ao ânus, controlando os movimentos e as secreções gastrointestinais. É formado pelo plexo mioentérico ou plexo de Auerbach (plexo externo situado entre as camadas muscular longitudinal e circular) e pelo plexo de Meissner ou submucoso (plexo interno localizado na submucosa), constituindo a inervação intrínseca do órgão. O plexo mioentérico é responsável pelo controle motor (peristaltismo) e o plexo submucoso é responsável pela regulação da secreção, do transporte de líquidos e pelo fluxo sanguíneo (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006; ZADORI, *et al.*, 2007).

Os neurônios pós-ganglionares são divididos em neurônios colinérgicos, que liberam acetilcolina (Ach) e neurônios não adrenérgicos e não colinérgicos, que liberam os neurotransmissores: peptídeo liberador de gastrina (GRP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo ativador da adenilil ciclase pituitária (PACAP), óxido nítrico (NO) e substância P. Estes neurônios atuam sobre células alvo de forma direta e indireta regulando a liberação de gastrina, histamina e somatostatina, os quais regulam a secreção ácida do estômago (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Anatomicamente o estômago é dividido em fundo, corpo e antro. O fundo está situado na região superior e tangencia a junção esofagogástrica; o corpo corresponde à maior parte do órgão; e o antro está situado na região proximal ao canal pilórico (DANGELO; FATTINI, 2007). Possui glândulas oxínticas e as glândulas pilóricas, que secretam diversas substâncias responsáveis pelos processos digestivos e homeostáticos do estômago.

As glândulas oxínticas estão localizadas na superfície interna do corpo e fundo do estômago, e são compostas por células produtoras de diversas substâncias: células mucosas (muco), células pépticas ou principais (pepsinogênio, o qual, quando em

contato com o ácido clorídrico, é convertido em pepsina atuando como enzima proteolítica), células parietais (ácido clorídrico), células D (somatostatina e amilina), e células enterocromafins (EC) (peptídeo natriurético atrial- ANP, serotonina e adrenomedulina), células enterocromafins “like” (ELC) (histamina). Enquanto as glândulas pilóricas estão localizadas na porção antral do estômago e possuem células mucosas (produtoras de muco), células G (gastrina) e também células A-“like” ou GR (grelina e obestatina) (CHEN, *et al.*, 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008).

1.1.1 Fisiologia da Secreção Gástrica

A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo em que múltiplos fatores centrais e periféricos contribuem para uma meta comum: a secreção de H^+ pelas células parietais. É regulada por uma complexa interação de sinais neurais, endócrinos e parácrinos do cérebro e do trato gastrointestinal (KONTUREK, *et al.*, 2004; PETRONILHO, *et al.*, 2009). Neurônios aferentes e eferentes providenciam uma comunicação bidirecional entre o SNC e o estômago além de uma grande variedade de neuropeptídeos, que agem centralmente e periféricamente para regular a secreção ácida gástrica (SCHUBERT, 2005) (Figura 1).

Os principais estimulantes da secreção do ácido são a acetilcolina (ACh), liberada de neurônios pós-ganglionares entéricos; a gastrina, liberada de células G do antro gástrico; e a histamina, liberada das ECL (Figura 1). O principal inibidor da secreção do ácido gástrico é a somatostatina liberada das células D da mucosa oxíntica e pilórica (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006).

Na via neuronal, o Sistema Nervoso Central (SNC) modula a atividade do SNE através da ACh, estimulando a secreção de ácido gástrico em resposta à antecipação ao alimento (odor, visão, salivação), o que caracteriza a “fase cefálica” da secreção ácida gástrica. As fibras eferentes que se originam nos núcleos motores dorsais descem até o estômago pelo nervo vago e fazem sinapse com células ganglionares do SNE (SCHUBERT, 2005).

A ACh é liberada pelos neurônios pós-ganglionares do nervo vago, interage com receptores muscarínicos M3 da membrana basolateral da célula parietal, ativando-os. A ativação do receptor colinérgico resulta na liberação de cálcio dos estoques mediada pela formação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) pela fosfolipase C, bem como da entrada de cálcio extracelular que é modulada por várias substâncias ativadas pela fosfolipase

A2. O cálcio se une a proteínas fixadoras de cálcio, como a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina que fosforila proteínas em cascata e ativa as proteínas quinases cálcio dependentes (PKC). A ativação da PKC permite a fosforilação de proteínas que irão ativar a H^+/K^+ -ATPase (a bomba de próton), estimulando diretamente a secreção do ácido (ATHMANN, *et al.*, 2000; AIHARA, *et al.*, 2005).

A ACh também age indiretamente através da interação com receptores muscarínicos M2 e M4 das células D e por inibição do ANP (CHEN, *et al.*, 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008). Estes processos impedem a secreção de somatostatina, removendo a regulação deste peptídeo sobre as células G, ECL e parietais (SCHUBERT, 2005).

A gastrina é produzida pela célula G do antro gástrico, mas também pode ser produzida em pequena quantidade no intestino delgado, no cólon e no pâncreas. Este hormônio é o principal mediador da secreção ácida estimulada pela alimentação e age principalmente liberando histamina das células ECL no corpo e fundo do estômago. Quando liberada da célula G, liga-se em receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2 (CCK-2) localizados na célula parietal, promovendo aumento dos níveis de cálcio intracelular, o qual estimulará a bomba de prótons (H^+/K^+ -ATPase), desencadeando a formação de ácido. Esses receptores também estão presentes nas células ECL, aos quais a gastrina pode ligar-se promovendo a liberação de histamina (ALY, *et al.*, 2004; BEALES, 2004).

A histamina é estocada principalmente em células ECL que comumente se localizam em estreita proximidade com as células parietais. Quando a histamina é liberada, ela estimula diretamente a secreção do ácido gástrico pela ligação em receptores H2 na célula parietal, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, resultando, com isso, no aumento dos níveis de AMPc e ativação da PKA. A ativação da via dependente de AMPc estimula a bomba de prótons na célula parietal, resultando na secreção de ácido (JAIN, *et al.*, 2007). Além disso, a histamina modula a secreção do ácido de maneira indireta, por atuar em receptores H3 na célula D do antro gástrico, inibindo a secreção de somatostatina (substância que tem função de inibir a secreção do ácido por suprimir a liberação de gastrina, mediante retroalimentação negativa); e atuar nas células G estimulando a liberação de gastrina (KONTUREK, *et al.*, 2004; ROULEAU, *et al.*, 2004).

Outros mediadores estão envolvidos na secreção gástrica, como o peptídeo liberador de gastrina (GPR) que é liberado das fibras pós-ganglionares do nervo vago e estimula diretamente a liberação de gastrina, e conseqüentemente, a secreção ácida e os neuropeptídeos PACAP e VIP que após liberados dos nervos não colinérgicos, ativam os receptores PCA1 e VAPAC2 presentes nas células ECL, resultando na liberação de histamina (ATHMANN, *et al.*, 2000; AIHARA, *et al.*, 2005; CHEN, *et al.*, 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008). Entretanto o PACAP e o VIP podem inibir a secreção ácida ao estimular direta ou indiretamente a secreção de somatostatina (LI, *et al.*, 2000; ZHENG, *et al.*, 1999).

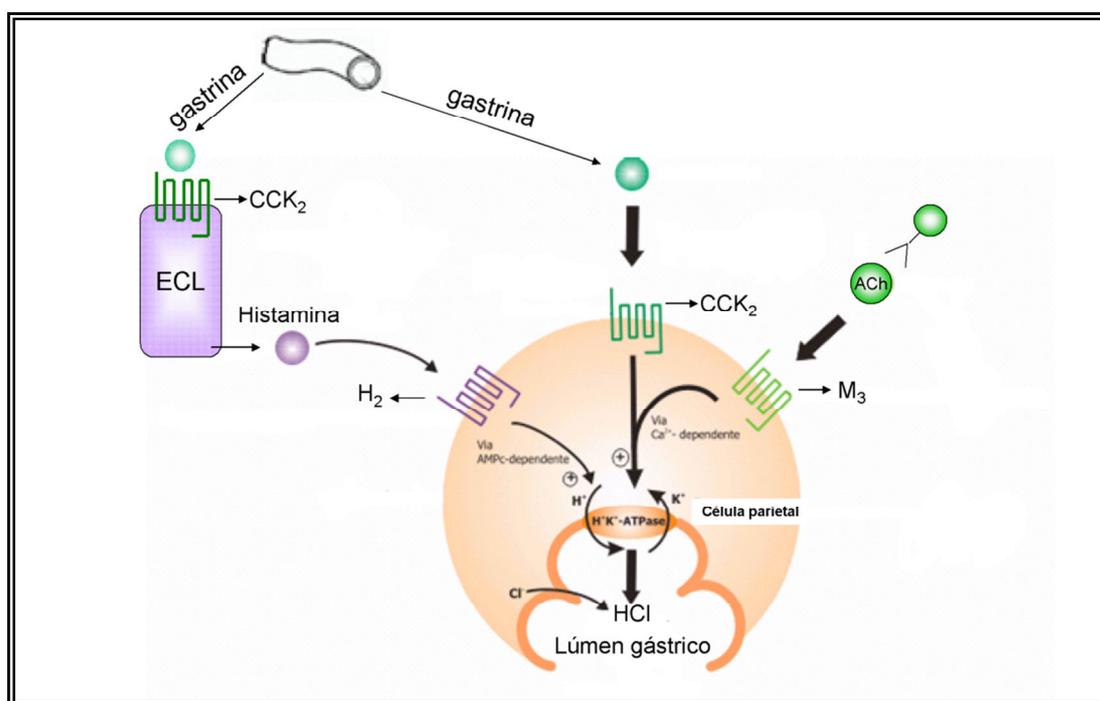


Figura 1. Vias de sinalização dos principais mediadores da secreção ácida gástrica. Adaptado de Olbe, *et al.* (2003).

A somatostatina é um peptídeo inibitório liberado pelas células D localizadas nas áreas do antro e do fundo do estômago. Dois mecanismos do efeito antisecretor da somatostatina têm sido reportados: a interação direta sobre as células parietais e a inibição da liberação de gastrina e histamina das células G e ECL. Ambos ocorrem através da ativação de receptores SST₂ de somatostatina localizados nas células ECL e parietal (LI, *et al.*, 2001; MAKHLOUF; SCHUBERT, 1990).

O receptor SST₂ está acoplado à proteína G inibitória (Gi) e também pode inibir a secreção ácida provocada pelos agonistas de Ca²⁺ e a liberação de histamina pelas células ECL (KUTCHAI, 1996; ATHMANN, *et al.*, 2000; KOMASAKA, *et al.*, 2002).

Segundo Komasa, *et al.* (2002), a inibição da liberação de histamina pelas células ECL tem papel mais importante na inibição da secreção ácida gástrica do que o efeito inibitório direto da somatostatina sobre as células parietais.

As prostaglandinas (PGEs) também atuam na regulação da secreção ácida via receptores EP₃ que acoplados a proteína Gi inibem a via da ACh, causando supressão da acidez gástrica nas células parietais (KATO, *et al.*, 2005).

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) pertence a uma família de genes que incluem a calcitonina, a adrenomedulina e a amilina. Seus receptores já foram identificados nas células D antral e oxíntica. Em resposta a alta acidez ou a infecção aguda por *Helicobacter pylori*, o CGRP ligado aos neurônios sensoriais estimula a somatostatina causando a inibição da secreção de gastrina e histamina e consequentemente, da secreção ácida (SCHUBERT; PEURA, 2008).

1.1.2 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

A barreira muco-bicarbonato é a primeira linha de defesa da mucosa gástrica. Esta barreira é formada pelo gel mucoso, bicarbonato e fosfolípidios surfactantes, os quais cobrem a superfície da mucosa. Esta camada retém o bicarbonato secretado pelas células superficiais epiteliais para que o microambiente permaneça neutro, prevenindo a penetração da pepsina e a digestão proteolítica da superfície epitelial (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2004).

O muco é secretado pelas células epiteliais da mucosa e contém 95% de água e 5% de mucina (glicoproteína). A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, como gastrina e secretina, bem como por prostaglandina E2 (PGE2) e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas, como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e sais de bile, causam dissipação do gel mucoso e da camada de fosfolípidios, causando a lesão da mucosa (LAINE, *et al.*, 2008).

O bicarbonato ajuda a manter uma zona de pH neutro na mucosa oferecendo uma barreira protetora contra a difusão do ácido. Sabe-se que a PGE2 estimula a secreção de bicarbonato no estômago, via ativação dos receptores EP1; e no duodeno de ratos, via ativação de receptores EP3 e EP4. Além disso, o fator liberador de corticotrofina, a melatonina, a uroguanilina, a orexina A, também estimulam a secreção de bicarbonato (AOI, *et al.*, 2004; NAKASHIMA, *et al.*, 2004).

As prostaglandinas endógenas têm um importante papel mediando muitos aspectos da defesa da mucosa gastrointestinal (MAITY *et al.*, 2003). São sintetizadas a partir do ácido araquidônico, através das enzimas ciclooxigenases (COX). Há duas formas de ciclooxigenase, a COX-1 e COX-2.

Já foram descritas variantes da COX-1 que retêm a atividade enzimática, uma das quais foi chamada de “COX-3” (HOOPERWERF; PASRICHA, 2006). Enquanto a isoforma COX-1 (constitutiva) produz a maior parte das prostaglandinas na mucosa gástrica normal, a COX-2 (induzida) atua como um fator importante durante a cicatrização das úlceras. Inicialmente acreditou-se que a COX-2 contribuía para a cicatrização das úlceras unicamente através da produção de prostaglandinas. Entretanto, estudos sugerem que a inibição da COX-2 aumenta o tempo de cicatrização das úlceras tanto por via dependente quanto independente de prostaglandinas (KATAOKA *et al.*, 2000; PERINI *et al.*, 2003).

As PGs inibem a secreção de ácido; estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidios, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa e aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa. Além disso, inibem a ativação de mastócitos e leucócitos, bem como a aderência de plaquetas no endotélio vascular. A diversidade de funções desempenhadas pelas PGs é decorrente de sua ligação com quatro diferentes tipos de receptores, denominados EP1, EP2, EP3 e EP4 (BUTTGEREIT, *et al.*, 2001; SULEYMAN, *et al.*, 2010).

A prostaglandina E2 (PGE2) e a prostaciclina (PGI2) constituem as principais prostaglandinas sintetizadas pela mucosa gástrica em humanos e animais. A PGE2 tem efeito estimulatório sobre a secreção de bicarbonato no estômago via receptores EP1, enquanto no duodeno, tal ação ocorre via receptores EP3 (TAKEUCHI, *et al.*, 1999), destacando-se, ainda, como um potente secretagogo de mucina em células epiteliais gástricas de ratos (TANI, *et al.*, 1997).

Outro fator importante de proteção é o fluxo sanguíneo adequado, devido à elevada atividade metabólica e necessidade de oxigênio da mucosa gástrica. O fluxo sanguíneo na mucosa mantém a estrutura e a função do estômago e está associado às doenças gástricas e cicatrização de lesões gastrointestinais. É regulado e modificado por sistemas e fatores metabólicos locais como prostaglandina, leucotrieno e outros mediadores químicos endógenos na mucosa. Um dos papéis do fluxo sanguíneo na mucosa é suprir a mucosa gástrica com oxigênio, nutrientes e hormônios, além de

participar da regulação da saída do ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato, remoção dos produtos e retrodifusão de íons hidrogênio. Esses eventos contribuem substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa (KAWANO; TSUJI, 2000).

Mais recentemente, tem sido descrito, o papel do óxido nítrico (NO) como um mediador fundamental nos mecanismos de defesa gástrica, devido a sua habilidade de aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa e a produção de muco, além de inibir a aderência de neutrófilos às células endoteliais (CORUZZI, *et al.*, 2000). Existem três diferentes isoformas de NOS, das quais, duas são constitutivamente expressas (cNOS) que são a óxido nítrico sintase neuronal - nNOS ou NOS-1 e óxido nítrico sintase endotelial - eNOS ou NOS-3, e uma é induzida (óxido nítrico sintase induzida - iNOS ou NOS-2) (LANAS, 2008).

Embora a produção de NO pela cNOS seja importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica, recentes estudos demonstram que o NO atua de maneira bifásica na resposta ulcerogênica da mucosa gastrointestinal dependendo da isoforma da NOS, ou seja, o NO produzido pela cNOS apresentaria em efeito protetor, e o NO originário da iNOS teria um efeito pró ulcerogênico (NISHIO, *et al.*, 2006). O NO também é importante no controle da secreção ácida e alcalina, no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e na secreção de muco gástrico (BAYIR, *et al.*, 2006).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e os radicais hidroxila são conhecidos por danificar vários componentes celulares incluindo os lipídios da membrana, proteínas, DNA e assim contribuir para a disfunção celular. Recentemente, os EROs têm despertado a atenção por desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da patogênese de lesões gástricas induzidas por estresse, etanol e AINEs. (SIERON, *et al.*, 2001; ODABASOGLU, *et al.*, 2006).

Em geral, o ambiente redox (oxidação-redução) do interior das células impede os danos causados pelos radicais livres. Este ambiente redox é mantido pela ação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GSH). Alterações no estado redox e depleção de antioxidantes pela exposição a agentes oxidantes levam ao estresse oxidativo e dano oxidativo (BAYIR, 2005).

A SOD existe sob a forma de três isoenzimas nas células humanas: a) SOD citosólica, contendo íons cobre e zinco, b) SOD extracelular, contendo íons cobre e zinco e c) SOD mitocondrial, contendo íons manganês. Esta enzima remove, por reação de dismutação, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é um radical livre muito reativo, formado pela redução do oxigênio molecular (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A catalase localiza-se principalmente nos peroxissomos, onde catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Tem também a função de detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e alcoóis pela redução do peróxido de hidrogênio. A catalase liga-se com NADPH, o qual protege a enzima da inativação e aumenta assim sua eficiência (KIRKMAN; GAETANI, 1984; KIRKMAN et al., 1999).

A Glutathione (GSH) é um tripeptídeo, que age como um antioxidante importante para a manutenção da integridade da mucosa do estômago. Os tióis endógenos tais como GSH são capazes de ligar-se a radicais livres e prevenir a formação das lesões produzidas por vários agentes ulcerogênicos. Assim a GSH tem importante participação na manutenção da integridade da mucosa gástrica e seu esgotamento pode resultar na acumulação de radicais livres que favorecem o surgimento de danos à membrana por peroxidação lipídica (MAITY, *et al.*, 2001; DEMIR, *et al.*, 2003; OLIVEIRA, *et al.* 2004).

A concentração relativamente elevada de grupos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH), que é principalmente glutathione reduzida (GSH, glicina γ -glutamil-cisteína), além de cisteína (CSH), coenzima A e outros tióis na mucosa gástrica, também indica suas possíveis implicações para a gastroproteção. Recentemente, Nagy et al. (2007) indicaram que sulfidrilas endógenas (SH) desempenham um papel importante na manutenção da integridade gastroduodenal e na proteção contra lesões quimicamente induzidas em células, tecidos e órgãos.

1.2 Úlcera gástrica

A úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes dos tecidos epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos. As úlceras do trato digestivo podem se

apresentar de três formas: úlcera péptica, que é a úlcera que se apresenta tanto no estômago como no duodeno, úlcera duodenal, que se apresenta apenas no duodeno e a úlcera gástrica que se apresenta apenas no estômago (MILANI; CALABRÒ, 2001).

As úlceras ocorrem mais freqüentemente no duodeno, onde mais de 95% ocorrem na sua primeira porção, e 90% estão localizadas próximo da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago, as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo, na pequena curvatura (25%). A incidência de úlceras gástricas parece ser ligeiramente maior em homens em relação às mulheres (1,3: 1), sendo que a faixa etária de maior ocorrência das úlceras duodenais é de 30-55 anos, e das úlceras gástricas é de 50-70 anos (ABITOL, 2005).

Na maioria dos casos a etiologia da úlcera é desconhecida, sendo geralmente aceito que é resultante de um desequilíbrio entre os fatores agressivos endógenos (ácido clorídrico e pepsina) ou exógenos (etanol, anti-inflamatórios esteroidais, fumo, estresse) e de mecanismo de defesa endógena (muco, bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, óxido nítrico), responsáveis pela integridade da mucosa (BELAICHE, *et al.*, 2002; RAMAKRISHNAN, *et al.*, 2007).

Diversos fatores de risco contribuem para a patogênese da úlcera gástrica, dos quais se pode destacar o consumo excessivo de álcool, o uso de AINEs, o tabagismo, o estresse e a infecção por *H.pylori*. Estes fatores, isolados ou em associação, contribuem de maneira significativa para o aumento da secreção de ácido clorídrico na mucosa gástrica e para a redução dos fatores de proteção da mesma, promovendo a formação de lesões ulcerativas (WOLFE; SACHS, 2000; YUAN; PADOL; HUNT, 2006)

O consumo excessivo de álcool representa uma das principais causas de úlcera péptica no homem, causando erosões hemorrágicas gástricas e gastrite caracterizada por edema, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (KO; CHO; LAM, 2004). Tais danos ocorrem devido à liberação de mediadores vasoativos (leucotrienos e histamina), formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em peroxidação lipídica e, conseqüentemente lesões da mucosa gástrica (REPETTO; LESLUY, 2002).

Os AINEs interrompem a barreira de muco e bicarbonato da mucosa gástrica normal contribuindo para a formação de ulceração gastrointestinal (WALLACE, 2001).

O principal mecanismo de formação das lesões independe da via de administração e resulta do distúrbio da síntese de PG pela inibição da isoenzima ciclooxigenase 1 (COX-1). No estômago, as PGs têm um papel vital na proteção, mantendo o fluxo sanguíneo da mucosa, estimulando a secreção de muco e bicarbonato e regulando a renovação celular e o reparo da mucosa. Alguns AINEs podem ainda danificar a mucosa gástrica por um efeito direto. Os AINEs ácidos, incluindo a aspirina, tornam-se lipossolúveis em pH baixos e se tomados oralmente, podem atravessar a barreira lipídica das células da mucosa gástrica. No pH intracelular, perdem a solubilidade lipídica e ficam presos, interrompendo funções celulares, talvez por inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial (HAWKINS; HANKS, 2000). Além disso, os AINEs causam interrupção do fluxo sanguíneo da mucosa induzindo isquemia microvascular e reduzem a produção de NO (ATAY, *et al.*, 2000).

O tabagismo representa um fator de risco para o desenvolvimento de úlceras. A nicotina presente nos cigarros não somente promove ulcerações como também potencializa as úlceras causadas por outros agentes (MAITY, *et al.*, 2003).

As lesões gástricas induzidas pela nicotina estão relacionadas com o aumento da secreção ácida do pepsinogênio via estimulação vagal, aumento da liberação de histamina, diminuição da secreção de muco e bicarbonato, redução da síntese de PGE₂ e geração de EROS (MAITY, *et al.*, 2003; SHIN, *et al.*, 2002).

Outro fator relevante na formação de úlceras é o estresse. Na sociedade de hoje estamos regularmente expostos a diferentes tensões físicas e psicológicas. Essas tensões desencadeiam ou modificam o curso clínico de diversos distúrbios gastrointestinais, incluindo úlcera péptica, síndrome do intestino irritável e doenças inflamatórias intestinais (KATO, *et al.*, 2010). As úlceras induzidas por estresse são devidas principalmente ao aumento da geração de radicais livres, além do aumento da secreção ácida (MILLER, 1987).

1.3 Terapêutica da úlcera péptica

A secreção ácida é reconhecida como um componente central da úlcera péptica, dessa forma o seu controle ainda é o principal alvo terapêutico para o tratamento dessa patologia.

Vários fármacos foram desenvolvidos com o intuito de neutralizar ou inibir a acidez, a exemplo dos antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas de H₂ e inibidores da bomba de prótons (**Figura 2**) (AIHARA, *et al.*, 2003; JAIN, *et al.*, 2007; SCHUBERT; PEURA, 2008).

Os antiácidos, a exemplo do bicarbonato de sódio, carbamato de cálcio, hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio que foram amplamente utilizados, mas não são eficazes como terapia primária para úlceras, pois só aliviam os sintomas e apresentam vários efeitos colaterais incluindo diarreia e interferência com a absorção de drogas (BEALL, *et al.*, 2006; JAIN, *et al.*, 2007).

Os anticolinérgicos (telenzepina e pirenzepina), antagonistas de receptores muscarínicos, surgiram como uma alternativa para diminuir a dor, por diminuição da motilidade e também diminuir a secreção ácida. No entanto, o uso destas drogas é limitado devido aos efeitos colaterais como boca seca, visão turva e taquicardia (AIHARA, *et al.*, 2003; JAIN, *et al.*, 2007).

A descoberta dos antagonistas H₂ revolucionou a terapêutica da úlcera. Drogas como a cimetidina, ranitidina e famotidina bloqueiam os receptores H₂ impedindo a ligação da histamina a seus receptores e inibindo a secreção ácida. Estas drogas são bem toleradas com poucos efeitos adversos, incluindo confusão mental, ginecomastia, nefrite intersticial e interação com enzimas do citocromo P450 (CHENTER; RODRIGUES-JÚNIOR, 2002; SCHUBERT; PEURA, 2008).

A identificação da H⁺, K⁺-ATPase, como bomba de próton da célula parietal responsável pela secreção de H⁺, representou um novo avanço no entendimento e tratamento das úlceras. Os inibidores da bomba de prótons (PPis) são os medicamentos mais eficazes no controle da secreção ácida atualmente disponíveis e os mais prescritos na terapêutica antiulcerogênica (DAJANI; KLAMUT, 2000). Os principais representantes desta classe são o omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol. Os PPis mesmo sendo considerados seguros e eficazes tem manifestado efeitos adversos relacionados com hipersecreção ácida rebote, má absorção, infecção e câncer (AIHARA *et al.*, 2003; RAGHUNATH; O'MORAIN; MCLOUGHLIN, 2005; JAIN *et al.*, 2007; SHUBERT; PEURA, 2008).

Quando a úlcera está associada à infecção por *Helicobacter pylori* o tratamento constitui uma combinação de PPis ou antagonistas H₂, mais antibióticos. No entanto as limitações desta terapêutica incluem náuseas, diarreias e tonturas (CHENTER;

RODRIGUESJÚNIOR, 2002; MAJUMDAR; BEBB; ATHERTON, 2007; JAIN *et al.*, 2007)

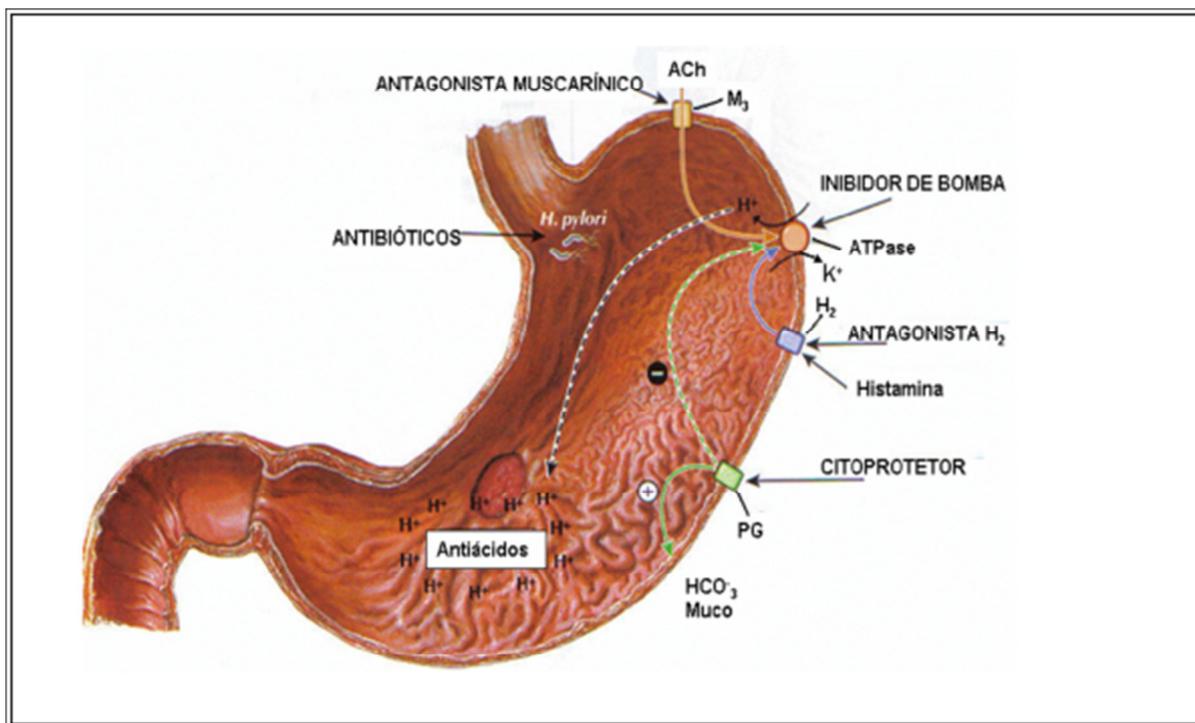


Figura 2. Terapêutica da úlcera péptica (Adaptado de Ralfa; Rawis; Beyzarov, 2006).

Apesar da evolução da terapêutica no tratamento das úlceras gástricas nos últimos anos com o desenvolvimento de novos fármacos, há ainda vários fatores limitantes quanto à eficácia, produção de efeitos colaterais e alta recorrência de úlceras (40-80%) um ano após o tratamento com antagonistas H_2 e os PPis (SZABO; VINCE, 2000; DEBASHIS *et al.*, 2002). Outro fator limitante é a supressão da secreção ácida prolongada resultante do uso por longos períodos de H_2 e PPis, provocando hipergastrinemia, que pode estar associada a formação de alterações pré-cancerígenas na mucosa gástrica e com a incidência de pneumonia (LA VECCHIA; TAVANI, 2002; LAHEIJ, *et al.*, 2004; JAIN, *et al.*, 2007).

Diante destas considerações, se torna necessário mais estudos para a compreensão desta doença, assim como a busca por métodos e drogas capazes de promover a sua remissão. Assim as plantas medicinais surgem como alternativa para uma nova abordagem terapêutica que tenha menos efeitos colaterais e menor índice de recidiva que os compostos já existentes no mercado.

1.4 Plantas Medicinais

1.4.1 Considerações Gerais

As plantas medicinais têm sido usadas como tratamentos tradicionais para numerosas doenças humanas durante milhares de anos e em muitas partes do mundo, seja no uso em rituais mágicos/religiosos ou como medicamento. Nas zonas rurais dos países em desenvolvimento, elas continuam a ser utilizadas como fonte primária de medicina e cerca de 80% das pessoas nestes países utiliza medicamentos tradicionais para os cuidados de saúde (CHITME, *et al.*, 2003; LI; OHIZUMI, 2004; KIM, 2005; FIRENZOULI, *et al.*, 2005;). Alguns dos primeiros registros do uso de plantas como drogas são encontradas no Artharvaveda, que é a base da Medicina Ayurveda na Índia (2000 aC), nas tábuas de argila na Mesopotâmia (1700 aC), e no Papiro Eber do Egito (1550 aC) (SNEADER, 2005; SCHMIDT, *et al.*, 2008).

Elas representam uma reserva praticamente inexplorada de substâncias úteis à humanidade e aproximadamente 420 mil espécies vegetais são conhecidas sendo que menos de 5% destas foram avaliadas para atividades biológicas. Diante deste quadro e também do fato de que uma única planta pode conter várias substâncias químicas diferentes, percebe-se a riqueza de entidades moleculares novas contidas no reino vegetal que ainda podem ser descobertas (BRAMWELL, 2000; VEERPOORTE, *et al.*, 2000; HOSTETTMANN; QUEIROZ VIEIRA, 2003).

Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, o Brasil se destaca como o país de maior diversidade genética vegetal do mundo, com um vasto manancial ainda por ser explorado sob o ponto de vista químico-farmacológico (BARBOSA-FILHO, *et al.*, 2007; CORRÊA, *et al.*, 2008; QUINTANS-JÚNIOR, *et al.*, 2008; SOUSA, *et al.*, 2008).

Na ciência moderna, o uso da manipulação de plantas resulta em alternativa eficaz para incrementar a produção de compostos valiosos no desenvolvimento de novos medicamentos. A pesquisa sistemática para obtenção de novos compostos com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos, sendo que os mais utilizados são: síntese de novas substâncias e a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, assim como a extração, o isolamento e a identificação de novos compostos de fontes naturais. Nesse sentido, as fontes de origem vegetal, apresentam um atrativo inigualável na busca

por substâncias ativas que possibilitem o descobrimento de novos potenciais fármacos (DREWS, 2000; SOUSA JÚNIOR, *et al.*, 2009).

Em uma extensa revisão de novas drogas introduzidas entre 1981 e 2002, Newman, *et al.* (2003) observaram que 28% das 868 novas entidades químicas eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais, com outros 24% criadas em torno de um protótipo de um produto natural. Além de produtos lançados, pelo menos 70 produtos naturais relacionados já estão na fase de ensaios clínicos (BUTLER, 2005; NEWMAN, *et al.*, 2003).

São definidos como produtos naturais, compostos com atividade biológica derivados de plantas, animais e microorganismos (BAKER, *et al.*, 2007). Muitos produtos naturais e seus derivados modificados sinteticamente têm sido desenvolvidos com sucesso para o uso clínico no tratamento de doenças humanas em quase todas as áreas terapêuticas e representam um percentual acima de 50% das drogas usadas mundialmente na clínica (NEWMAN; CRAGG, 2007).

No Brasil, a possibilidade de implantação da fitoterapia no sistema público de saúde vem sendo considerada desde 1988 e faz parte das diretrizes da I Conferência Nacional de Assistência Farmacêutica (CNMAF, 2003). A partir de então, várias iniciativas pontuais para estabelecer a fitoterapia na rede pública de saúde vêm ocorrendo, destacando-se o Programa de Fitoterapia do Ceará, alicerçado no Projeto Farmácias Vivas, idealizado pelo Prof. Francisco José de Abreu Matos e recentemente instituído no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (MATTOS, 2001; BRASIL, 2010).

O Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu em 2006 uma política que regulamenta a utilização de plantas medicinais e recursos fitoterápicos (Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos). Esta política tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. (BRASIL, 2007). Outra iniciativa que contribuiu ainda mais para o desenvolvimento deste setor de estudos foi a publicação em 2008 da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

No decorrer dos últimos anos os setores de estudos com plantas medicinais têm evoluído no Brasil e entre 2003 e 2008 foram apresentados 25 pedidos de patentes de composições farmacêuticas a base de plantas medicinais como *Copaifera genus*, *Cordia*

verbenacea, *Erythrina mulungu*, e *Physalis angulata*. Há ainda inúmeras pesquisas em desenvolvimento nas instituições de ensino e centros de pesquisas, boa parte voltada para a avaliação do potencial terapêutico de alguns metabólitos secundários tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, taninos e lignanas, pois muitas destas substâncias têm grande possibilidade de aproveitamento como futuros fármacos (FILHO; YUNES, 1998; GUARRERA, 2005; BALBANI, *et al.*, 2009).

1.4.2 Atividade de plantas sobre o trato gastrointestinal

Várias publicações em todo o mundo relatam o efeito benéfico de diversas plantas sobre o sistema gastrointestinal. Elas têm demonstrado eficácia no tratamento da hiperacidez, úlceras gástricas, duodenais e distúrbios da motilidade, além de apresentar ação antibacteriana sobre *Helicobacter pylori* (GAWRON-GZELLA; WITKOWSKA-BANASZCZAK; DUDEK, 2005).

A atividade antiulcerogênica de várias plantas da flora nacional e de seus princípios ativos vem sendo comprovada em estudos científicos, destacando-se os resultados obtidos no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará (LPN/UFC) com o monoterpene cineol (SANTOS; RAO, 2001), com a resina bruta e a mistura de triterpenos α - e β -amirina isolada de *Protium heptaphyllum* (OLIVEIRA, *et al.*, 2004a; OLIVEIRA, *et al.*, 2004b), a flavona isolada de *Lonchocarpus araripensis* (CAMPOS, *et al.*, 2008), ácido centipédico, um diterpeno isolado de *Egletes viscosa* (GUEDES, *et al.*, 2008), quebrachitol, isolado de *Magonia glabrata* (OLINDA, *et al.*, 2008), mangiferina, uma glicosilxantona isolada de *Mangifera indica* L. (CARVALHO, *et al.*, 2008) e os ácidos anacárdicos, isolados de *Anacardium occidentale* (MORAIS, *et al.*, 2010).

Estudos em outros centros de pesquisas também relatam a eficácia de muitas plantas no tratamento de lesões gástricas, dentre elas *Alchornea castaneaefolia* (HIRUMA-LIMA, *et al.*, 2006), *Maytenus robusta* (ANDRADE, *et al.*, 2007), *Hancornia speciosa* (MORAES, *et al.*, 2008), *Nigella sativa* (AL MOFLEH, *et al.*, 2008) e *Herissantia crispa* (LIMA, *et al.*, 2009). Muitas destas atividades estão relacionadas aos metabólitos secundários, que apresentam estruturas químicas diversas e conseqüentemente, mecanismos de ação distintos. Estes mecanismos, entretanto, estão geralmente relacionados à estimulação dos fatores de proteção da mucosa gástrica, como a síntese de prostaglandinas, a secreção de muco e bicarbonato, ou ainda a

inibição de agentes agressores como a secreção ácida (LEWIS; HANSON, 1991; LEWIS; SHAW, 2001; BORRELI; IZZO, 2000 KHENNOUF, *et al.*, 2003a).

Dentre estes metabólitos, os fitocompostos denominados polifenóis, incluindo os taninos, as antocianidinas e outros flavonóides têm se destacado devido a sua grande variedade de efeitos biológicos incluindo atividade antioxidante, antiproliferativa, anti-inflamatória, antinociceptiva, antialérgica e hepatoprotetora (MIDDLETON, *et al.*, 2000). Os taninos, particularmente, vêm despertando interesse do ponto de vista nutricional e medicinal devido a sua potente capacidade antioxidante e possível efeito protetor da saúde humana, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares e câncer (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000; SEERAM, *et al.*, 2005;). Outros compostos que merecem destaque são os triterpenos pentacíclicos, dentre os quais, o lupeol que se encontra amplamente distribuído em vários gêneros taxonômicos (ex.: *Fragaria*, *Vitis*, *Mangifera*) e tem demonstrado uma grande diversidade de atividades biológicas (CHATURVEDI; BHUI; SHUKLA, 2008). Do ponto de vista químico, estes compostos estão presentes em espécies de várias famílias, com destaque para a Leguminosae. (FREIRE, 1994).

1.4.3 Família Leguminosae e subfamília Caesalpinioideae

A família Leguminosae Adams é a terceira maior família das Angiospermas após Orchidaceae e Asteraceae (BARROSO 1984), compreende 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS *et al.* 2005). Possui representantes distribuídos em todos os continentes e no Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 1500 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). Nos tratamentos taxonômicos relacionados à Leguminosae (POLHILL 1981; LEWIS, *et al.*, 2005) são geralmente reconhecidas três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Na análise química esta família apresenta-se particularmente rica em flavonóides e compostos biossinteticamente relacionados, como rotenóides e isoflavonóides. Os alcalóides, terpenóides e esteróides são exemplos de outras classes de substâncias também presentes em muitos exemplares. Os taninos têm frequência muito baixa se comparada aos flavonóides, tendo sido relatadas poucas ocorrências em Caesalpinioideae (HEGNAUER; BARKMEYER, 1993, MAISELS, 1994; ZARUCHI, 1994; BONNET, *et al.*, 1996, DESMARCHELIER, *et al.*, 2001; CINTRA, *et al.*, 2005).

Quanto à subfamília *Caesalpinioideae*, destacam-se como gêneros importantes: *Cassia* que tem como exemplo as espécies conhecidas popularmente como fedegoso (*Cassia spectabilis*), cigarreira (*Cassia multijuga*), mata-pasto (*Cassia tora*), sene (*Cassia angustifolia*) e chuva-de-ouro (*Cassia ferruginea*); *Caesalpinia*, cujo representante mais conhecido é o Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*), *Bauhinia*, conhecida como pata-de-vaca (*Bauhinia bongardi*), *Copaifera*, popularmente conhecida como copaíba (*Copaifera duckei* Dwyer), entre outras (SANTOS; TEIXEIRA, 2001; Lorenzi; Abreu, 2002; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002)

O uso medicinal de plantas desta subfamília reside nas suas propriedades antioxidante (KHALIL, *et al.*, 2008), acaricida (FERNANDES; FREITAS, 2007), antibacteriana e antifúngica (SAINATH, *et al.*, 2009), antidiarréica (MBAGWU; ADEYEMI, 2008), antiofídica (MENDES, *et al.*, 2008), anti-inflamatória, analgésica e antipirética (DONGMO, *et al.*, 2001; ARCHANA, *et al.*, 2005) laxativa e adstringente, além do seu emprego no tratamento de ferimentos. Outras atividades farmacológicas também são descritas, tais como antiulcerogênica, hipoglicemiante e antimicrobiana (BACCHI, *et al.*, 1995).

1.4.4 O gênero *Cenostigma*

O gênero *Cenostigma* Tul, pertence à subfamília *Caesalpinioideae*, subordinada à tribo *Caesalpinieae* e compreende quatro espécies denominadas *Cenostigma tocaninum* Ducke Tul. *Cenostigma gardnerianum* Tul., *Cenostigma macrophyllum* Tul. e *Cenostigma sclerophyllum* Tul. Somente esta última ocorre fora dos limites brasileiros, tendo sido encontrada no chaco paraguaio. Estas espécies apresentam hábitos arbóreos e arbustivos, distribuídas nas formações de mata, cerrado e caatinga das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (Figura 3) (FREIRE, 1994; WARWICK, 2009).

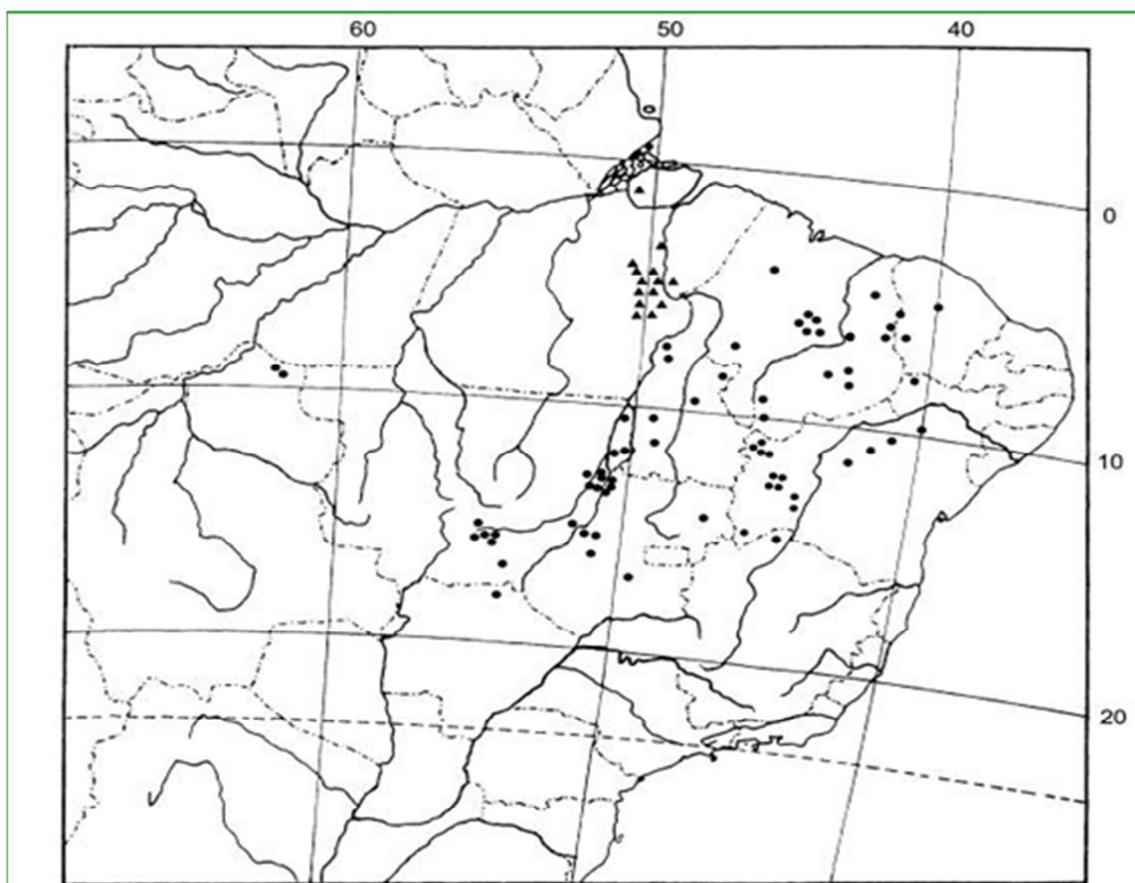


Figura 3. Mapa da distribuição de *Cenostigma*: *C.tocantinum* (triângulos); *C.macrophyllum* (pontos); material cultivado não incluído (WARWICK, 2009).

A *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata*. Teles Freire (Figura 4) é conhecida popularmente como “caneleiro”, “caatingueira”, “pau de rato” dentre outros. Caracteriza-se por ser um arbusto de caule semi-ereto, sulcado, ocorrendo nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, vegetando em ambiente de cerrado. No Nordeste, encontra-se em áreas de mata no Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco e Bahia. É de ampla distribuição na cidade de Teresina-PI onde é utilizada como planta ornamental e, por esta razão foi escolhida como símbolo da cidade (decreto nº 2407 de 13/08/1993; FREIRE, 1994).

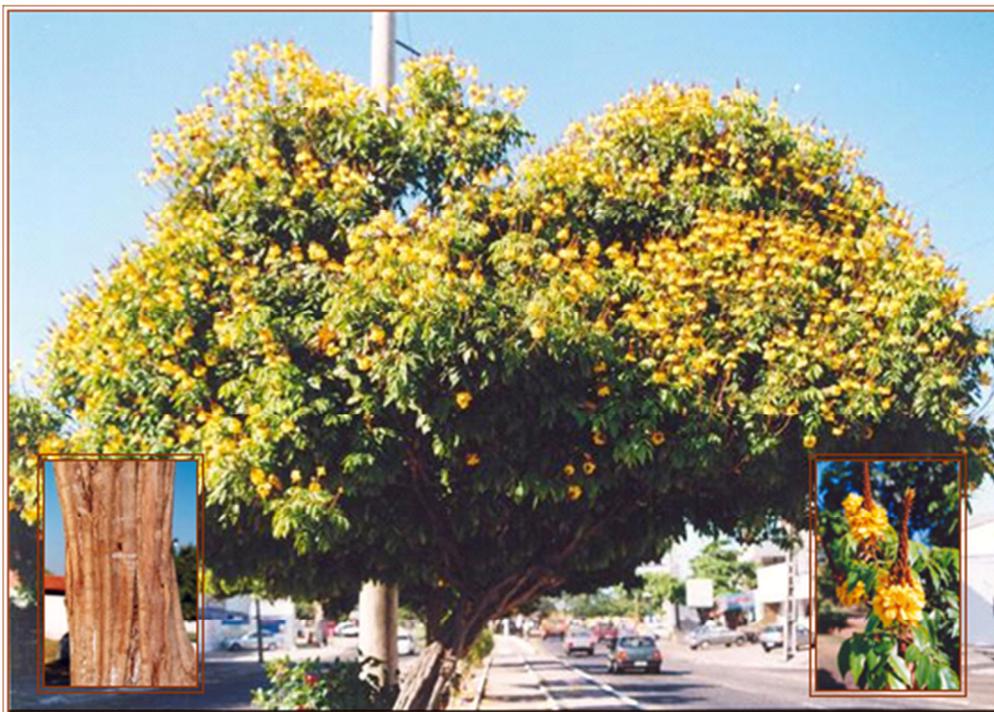


Figura 4. *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire. Em destaque o caule e as flores. Fonte: Acervo do Fotógrafo Antonio Quaresma, 2001.

Das espécies conhecidas, apenas *C. gardnerianum* e *C. macrophyllum* possuem estudos fitoquímicos. Do extrato acetato de etila obtido das cascas do caule e das folhas de *C. gardnerianum* foram isolados flavonóis (quercetina), flavonas (vitexina, agatisflavona), cumarinas (escoparona), ácido elágico, ácido gálico e seus derivados: galato de metila e ácido 2-C-S-D-glicosil-4-metoxigálico (ALVES, 2007). Nos estudos com *Cenostigma macrophyllum* foram isolados e identificados alguns compostos (Figuras 5 e 6) presentes nos extratos etanólicos das folhas e da casca do caule, como triterpenos (ácido 3-4-seco-16-S-hidroiolean-18-en-3-óico e lupeol), esteróides livres e glicosilados (sitosterol, estigmasterol, 3S-O-S-D glicopiranosilsterol), tocoferóis (α , β , γ , δ) e biflavonas (agatisflavona, amentoflavona e 7 metoxiamentoflavona), além do ácido elágico, ferulato de alquila e a dilactona do ácido valonéico (SANTOS, 2001; COSTA, 2002; COSTA, 2003; COSTA, 2005; SILVA, 2006a).

Um levantamento etnofarmacológico realizado no trópico semi-árido do Piauí cita o uso popular das folhas, flores e casca do caule desta espécie para tratamento de doenças intestinais e estomacais, em especial gastrites, úlceras e como espasmolíticas (SANTOS, 2001). Mais recentemente estudos com extratos de folhas e casca do caule da *C. macrophyllum* atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, antibacteriana, antiulcerogênica, hepatoprotetora e antioxidante (Quadro 1).

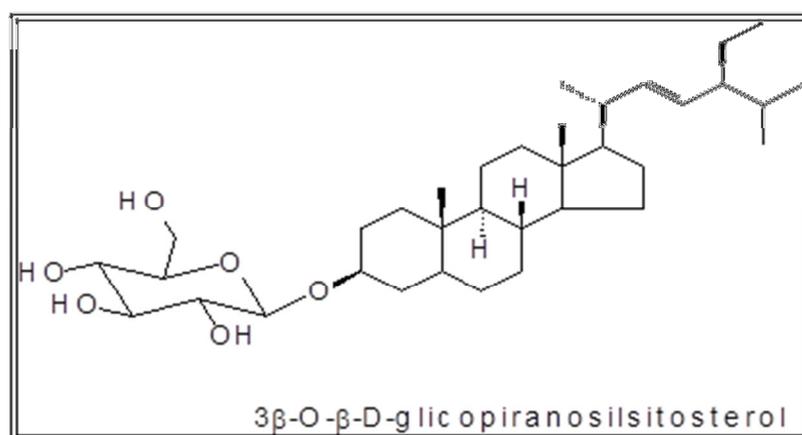
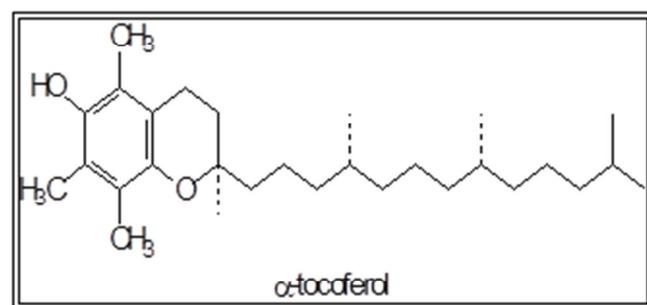
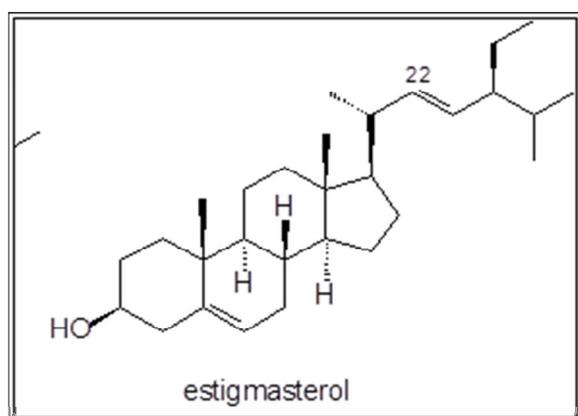
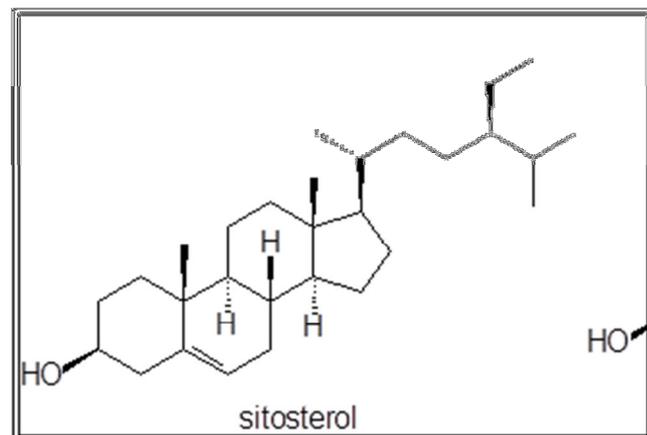
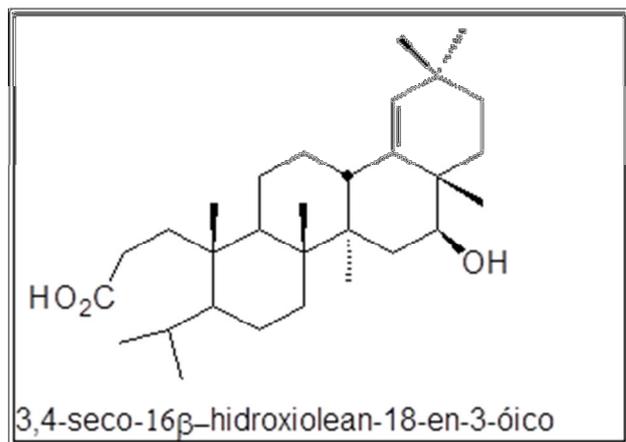


Figura 5. Estrutura química de algumas substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

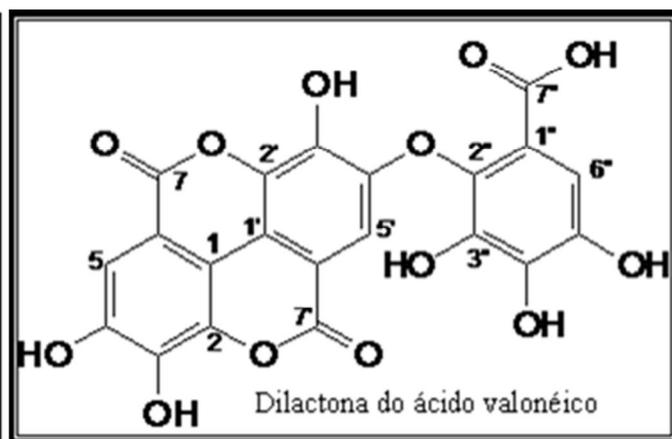
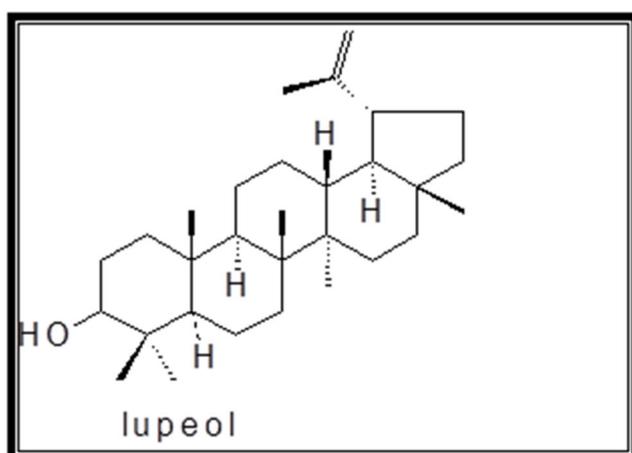
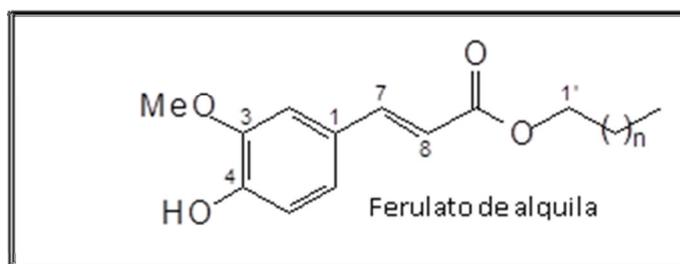
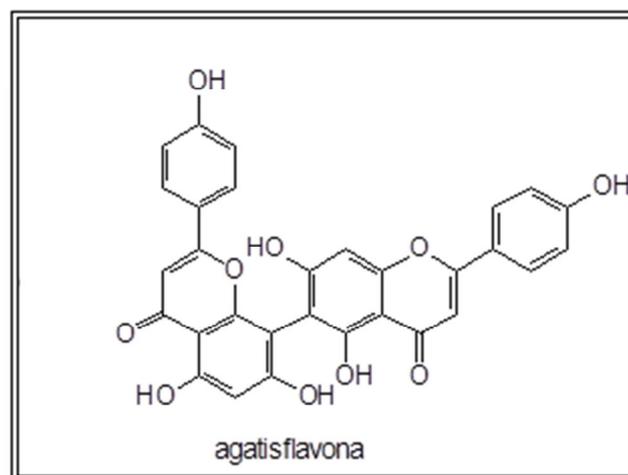
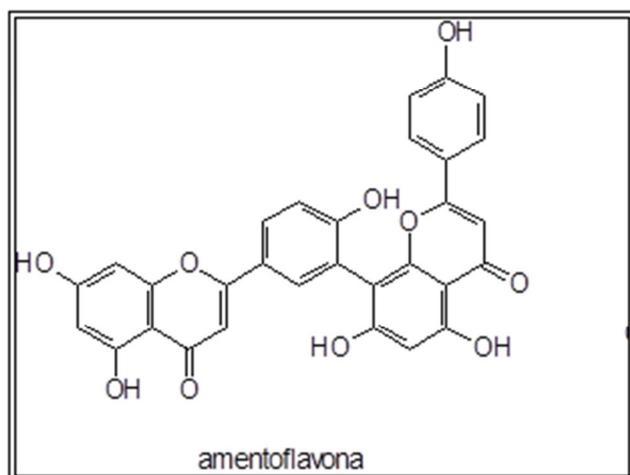


Figura 6. Estrutura química de algumas substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Quadro 1 – Atividades farmacológicas já estudadas de *C. macrophyllum*.

Ação	Parte da planta	Preparação	Modelo experimental	Referência
Antinociceptiva	Folha	FHA	Estímulo mecânico (Filamentos de Von Frey)	Silva, 2006b
		EEtOH, FHA e FRB	Nocicepção induzida por formalina	Santos, 2001a Alencar, 2002 Silva, 2006b Costa, 2005
	Casca do caule	EEtOH, FAE	Nocicepção induzida por formalina e capsaicina	Rocha, 2002 Pereira, 2005
Anti-edematogênica	Folha	EEtOH, FHA FAE	Edema de pata induzido por carragenina	Santos, 2001a
	Casca do caule	EEtOH		Rocha, 2002
Antiulcerogênica	Folha	EEtOH, EH ₂ O, FAE F. MeOH	Úlceras induzidas por indometacina e etanol	Costa, 2005 Oliveira, 2000
	Casca do caule	EEtOH EH ₂ O		Almeida, 2002
Antibacteriana	Folha	EEtOH	Ação sobre cepas bacterianas Gram positivas e negativas	Silva <i>et al.</i> , 2004 Costa, 2005
Hepatoprotetora	Folhas	FRB	Hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno	
Espasmolítica	Casca do caule	EEtOH	Duodeno isolado de rato	Silva, 2006a
Antioxidante	Casca do caule	EEtOH, DAV	DPPH	Silva, 2006ac

EEtOH: extrato etanólico; FHA: fase hidroalcoólica da partição do extrato etanólico; FRB : fração rica em bivaflonas proveniente da fase hidroalcoólica; EH₂O: extrato aquoso; FAE: fase acetato de etila da partição do extrato etanólico.

1.5 Terpenóides

O grupo dos terpenóides compreende cerca de 15.000 a 20.000 estruturas já identificadas. Ele se distingue das outras classes de metabólitos secundários vegetais pela sua origem, a partir do mevalonato e isopentenil pirofosfato, além da natureza lipofílica de suas estruturas.

Quimicamente, os terpenóides são caracterizados como hidrocarbonetos insaturados, com diferentes quantidades de oxigênios ligados ao seu esqueleto isoprênico. A nomenclatura dos terpenóides depende do número de estruturas isoprênicas (**Figura 07**) e dos átomos de carbono presentes na molécula, assim as classes principais de terpenos são os hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀), os diversos triterpenóides são agrupados em famílias: esqualenos, lanostanos, damaranos (tetranortriterpenóides e quassinóides), lupanos, oleananos, ursanos e hopanos (DEWICK, 2000; CONNOLY; HILL, 2002; WAGNER; ELMADFA, 2003).

Os triterpenos apresentam diversas atividades biológicas, entre as quais se destacam: cardioprotetora (SUDHAHAR, *et al.*, 2007), gastroprotetora (PERTINO, *et al.*, 2007; GUEDES, *et al.*, 2008), anti-inflamatória (MEDEIROS, *et al.*, 2007), antitumoral (BRAGA, *et al.*, 2007), leishmanicida (DELGADO-MENDEZ, *et al.*, 2008) e anti-hiperglicêmica (SATO, *et al.*, 2007).

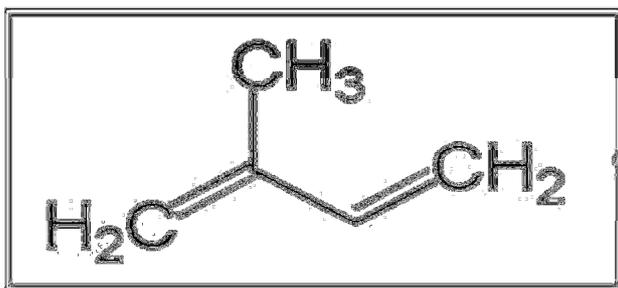


Figura 07. 2-metil-1,3-butadieno (isopreno)

1.5.1 Lupeol

O lupeol é um triterpeno pentacíclico da família dos lupanos, encontrado em plantas comestíveis, como azeitona, figo, manga, morango, uvas vermelhas e em plantas medicinais usadas em diversos continentes (SALEM, *et al.*, 2001).

Este composto tem apresentado diversas atividades farmacológicas e uma baixa toxicidade, pois a administração de até 2 g/kg, por via oral a ratos e camundongos não

produziu efeitos adversos significativos ou mortalidade (PATOCKA, 2003). Foi observada atividade anti-inflamatória em modelos de inflamação aguda e crônica em ratos e camundongos, que não envolve a inibição de ciclooxigenase, mas possivelmente está relacionada a uma ação imunossupressora, a uma diminuição da migração celular para o sítio da inflamação e à redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias. O lupeol não demonstrou atividade analgésica ou antipirética (KWEIFIO-OKAI, *et al.*, 1995; GEETHA; VARALAKSHMI, 1998; FERNANDEZ, *et al.*, 2001; AGARWAL; RANGARI, 2003). Entretanto Pereira, *et al.* (2010) demonstraram atividade analgésica do lupeol no modelo de nocicepção induzida por glutamato em camundongos.

Estudos mais recentes demonstram que o lupeol também possui atividades anti-mutagênica e anti-malária em testes *in vitro* e *in vivo* (SALEEM *et al.*, 2001), atividade inibidora de proteínas quinases, serina proteases e da DNA topoisomerase II, um alvo para a quimioterapia anti-câncer (WADA; IIDA; TANAKA, 2001; HODGES, 2003). O lupeol induz a diferenciação e inibe o crescimento do melanoma e células leucêmicas, causa apoptose de células cancerígenas do pâncreas e da próstata (HATA; HORI; TAKAHASHI, 2003; ARATANECHMUGE, *et al.*, 2004; SALEEM, *et al.*, 2005 a; SALEEM, *et al.*, 2005 b), inibe a promoção do tumor em dois estágios da carcinogênese da pele do rato, modulando diversas vias de sinalização (SALEEM *et al.*, 2004) e possui atividade hepatoprotetora (SUNITHA, *et al.*, 2001; SUDHAHAR, *et al.*, 2006).

A administração de lupeol produziu uma queda acentuada no nível de oxalato nos rins e também foi eficaz em neutralizar a toxicidade dos radicais livres, provocando um decréscimo significativo da peroxidase e aumento do nível da capacidade antioxidante no modelo da urolitíase em ratos (MALINI, *et al.*, 2000; BASKAR, *et al.*, 1996). Sudhahar, *et al.* (2006) observaram que o tratamento com lupeol e linoleato de lupeol diminuiu os níveis de peroxidação lipídica e aumentou as defesas enzimática e não enzimática antioxidantes, favorecendo a melhoria de alterações oxidativas na fase inicial da aterosclerose hipercolesterolêmica em ratos. Um efeito cardioprotetor também foi observado por Sudhahar, *et al.* (2007) em experimentos realizados com ratos.

1.6 Taninos

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (HASLAM, 1966). Encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontrados nas raízes, folhas, frutos e sementes. Atuam como um sistema de defesa das plantas contra ataques microbianos e de animais devido à sua adstringência e à capacidade de formar complexos com proteínas e polissacarídeos (SANTOS, 2000). As plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional, para tratar diversas moléstias orgânicas como a diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragia, problemas estomacais e renais, e processos inflamatórios (SIMÕES, *et al.*, 2004). Segundo De Mello e Santos (2004) esses compostos podem apresentar atividade bactericida, fungicida, moluscicida e antiviral.

As atividades farmacológicas dos taninos podem estar relacionadas à habilidade destes compostos em complexar-se com proteínas, polissacarídeos e íons metálicos (Fe, Mn, Cu, Al, Ca) e/ou à sua propriedade antioxidante (SIMÕES, *et al.*, 2003; DE MELLO; SANTOS, 2004). A complexação com proteínas se dá através de interações não-específicas como pontes de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos, bem como através de ligações covalentes. Quimicamente formam uma família complexa de compostos polifenólicos, solúveis em água, com peso molecular entre 500 e 3.000 Da (LEKHA; LONSANE 1997). No entanto, estes valores mudam quando ocorre polimerização para formar taninos condensados ou hidrolisáveis atingindo valores em torno de 40.000 Da (SPENCER, *et al.* 1988; KHANBABAEE; REE, 2001). Recentemente, foi proposta uma repartição em quatro grupos: taninos condensados, taninos complexos, galotaninos e elagitaninos (KHANBABAEE; REE, 2001).

Taninos condensados são polímeros de flavan-3-ol ou flavan - 3,4-diol que não contêm resíduos de açúcar ou proantocianidinas são constituídos por unidades flavanol: flava-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianinas). Eles estão presentes em maior quantidade nos alimentos normalmente consumidos (LEKHA; LONSANE 1997). Os taninos complexos são os compostos resultantes da ligação de catequinas ou epicatequinas com ácidos gálico ou elágico, devido à reação catalisada pela luz, calor e oxigênio. Um exemplo é o galato de catequina, contendo moléculas de taninos condensados e hidrolisáveis (AGUILERA-CARBO, 2008).

Galotaninos são taninos hidrolisáveis formados a partir de unidades de ácido gálico (galoil) ligadas a um núcleo glicosídico (KHANBABAEI; REE, 2001). São sensíveis à hidrólise por enzimas (atividade enzimática), ácidos ou álcalis (HUANG, *et al.* 2005) e para ser considerado como hidrolisável, um tanino deve ter pelo menos três grupos galoil esterificados com um poliol. O ácido tânico é um galotanino típico (SÁNCHEZ-ALVARADO, 2001).

Os elagitaninos são constituídos por glucose como núcleo central ligado a unidades de ácido hexahidroxi-difênico que, devido à desidratação espontânea, é normalmente isolado na sua forma dilactona estável (GALVEZ, *et al.*, 1997).

1.6.1 Dilactona do ácido valonéico

A dilactona do ácido valoneico (DAV) é um derivado de elagitanino, com estrutura contendo o ácido elágico esterificado, por meio de acoplamento oxidativo, com o ácido gálico.

O ácido gálico possui comprovada atividade anti-inflamatória, além de atividade antimutagênica, anticancerígena e antioxidante. O ácido elágico tem demonstrado atividade antiviral, antitumoral, antimutagênica e antioxidante, sendo utilizado como aditivo seguro de comidas em alguns países, incluindo o Japão (SOONG; BARLOW, 2006).

A DAV é de ocorrência pouco comum, tendo sido relatado em *Epilobium hirsutum* (Onagraceae) (BARAKAT, *et al.* 1997), *Shorea laevifolia* (Dipterocarpaceae) (HIRANO, *et al.* 2003), *Mallotus japonicus* (Euphorbiaceae) (HATANO, *et al.* 1990), espécies de *Quercus* (Fagaceae) e *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. (Lythraceae) (KAKUDA, *et al.* 2004; CANTOS, *et al.* 2003).

Esta substância apresenta ação inibitória sobre as enzimas 5α -redutase (HIRANO, *et al.* 2003) e xantina oxidase (HATANO, *et al.* 1990). Pode ser utilizada para diminuir os níveis de ácido úrico, mostrando-se mais eficaz que o alopurinol. Estudos de Hatano, *et al.* (1990) relatam que entre alguns compostos isolados de *Mallotus japonicus*, o ácido elágico e a DAV possuíam atividade inibidora de xantina oxidase maiores que os demais compostos, sendo a atividade da DAV bem superior a de todos os outros. Esta atividade inibitória não estaria relacionada à ligação não específica dos taninos a proteínas, pois a DAV apresentou uma baixa taxa de ligação a hemoglobina e uma alta atividade inibidora de xantina oxidase. Em outro relato Unno;

Sugimoto; Kakuda (2004) demonstraram que a DAV isolada das folhas de *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. também inibiu a atividade da xantina oxidase de maneira concentração dependente, com IC_{50} de $2,5\mu M$, enquanto o alopurinol, inibidor padrão de xantina oxidase, teve a IC_{50} de $10,4\mu M$. Em estudo recente, Silva, *et al.* (2006c) demonstraram que a DAV possui atividade antioxidante superior a rutina o teste do DPPH.

2 JUSTIFICATIVA:

A utilização de plantas é uma prática generalizada baseada na credence popular e nas formações culturais, e apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, estima-se que 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (YUNES; CALIXTO, 2001; CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008).

Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, como a fitoquímica, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a etnobotânica e a etnofarmacologia, que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes povos e etnias; e a farmacologia, que estuda os efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados (MACIEL, *et al.*, 2002; VENDRUSCOLO, *et al.*, 2005). Nos últimos anos, no Brasil, várias pesquisas foram realizadas com contribuições relevantes sobre o assunto, não só quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (JORGE, *et al.*, 2004; DUARTE, *et al.*, 2004; LIMA, *et al.*, 2006).

A degradação ambiental associada à escassa literatura sobre algumas espécies faz com que informações importantes a respeito do uso tradicional se percam antes de serem cientificamente comprovadas (SRITHI, *et al.*, 2009).

Neste contexto inserimos a *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata*, pois embora existam relatos a respeito do uso popular da espécie, não existiam dados na literatura referentes à sua composição química e/ou atividades farmacológicas, o que levou o grupo envolvido em estudos químicos e farmacológicos de produtos naturais da Universidade Federal do Piauí (UFPI) a estudar esta espécie, assim desde 1997 vários estudos fitoquímicos e farmacológicos foram realizados pelo Departamento de Química da UFPI. Os estudos fitoquímicos esclareceram a composição química da espécie, demonstrando a existência de taninos, flavonóides, terpenóides, esteróides, biflavonas, carotenos e tocoferóis nos extratos da folha e da casca desta espécie, sendo estas substâncias reconhecidas como possuidoras de diversas atividades farmacológicas (SILVA, 2006a). Enquanto os ensaios farmacológicos preliminares revelaram que os extratos possuíam atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, antibacteriana, antiulcerogênica e hepatoprotetora (SANTOS, 2001; COSTA, 2003; COSTA, 2005; SILVA *et al.*, 2006b).

Em continuidade a estes estudos foram isolados dois constituintes majoritários na espécie e objetos deste estudo: o lupeol e a DAV. O lupeol tem sido isolado em várias espécies da família Caesalpinoideae, dentre elas a *Cenostigma macrophyllum*, e apesar dos diversos estudos já realizados, sua atividade sobre o trato gastrointestinal ainda não havia sido investigada. A dilactona do ácido valonéico (DAV), de ocorrência rara e inédita para o gênero *Cenostigma* possui poucos relatos na literatura sobre suas atividades farmacológicas.

Com base nos estudos supracitados, em observações preliminares realizadas no LPN e levando-se em conta os relatos de uso popular da espécie, resolvemos investigar a participação do lupeol e da DAV na atividade antiulcerogênica e sobre o comportamento dos animais, visando contribuir para o estudo farmacológico da espécie, bem como para a validação do uso popular de forma racional e segura.

3 OBJETIVOS:

3.1 Objetivos Gerais

- Caracterizar os efeitos do lupeol e da DAV isolados de *Cenostigma macrophyllum Tul.* no trato gastrointestinal e em modelos comportamentais em roedores.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito antiulcerogênico do lupeol e da DAV no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, avaliando a participação dos grupos NP-SH, PGs, NO, canais K_{ATP} dependente, canais de Cálcio;
- Verificar o envolvimento de receptores adrenérgicos e opióides no efeito gastroprotetor do lupeol e da DAV no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos;
- Estudar o efeito do lupeol e da DAV sobre a secreção gástrica, utilizando o modelo de ligadura do piloro em ratos;
- Verificar a ação do lupeol e da DAV sobre o trânsito intestinal em camundongos.
- Avaliar a atividade do lupeol e da DAV no modelo do campo aberto e de catalepsia em camundongos;
- Averiguar a influência do tratamento com DAV na coordenação motora dos animais, usando o teste do rota rod em camundongos;
- Analisar o efeito do tratamento com DAV no tempo de sono induzido por pentobarbital, no teste da suspensão da cauda e na hiperlocomoção induzida por anfetamina em camundongos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e Identificação do Material

O material vegetal (cascas de *Cenostigma macrophyllum*) foi obtido na cidade de Teresina-PI e identificado no Departamento de Biologia da UFPI. A identificação foi realizada pelo botânico Maurício Teles Freire do Departamento de Biologia da UFPI e uma exsicata da espécie (n° 10374) foi depositada no Herbário Graziela Barroso – UFPI.

4.2 Isolamento da dilactona do ácido valoneico (DAV) e do lupeol

As cascas do caule, secas e trituradas (1,7 kg) foram submetidas à extração com etanol. Ao extrato etanólico (EtOH) foi adicionado água e feita a partição sucessiva com éter etílico e acetato de etila para obtenção das fases aquosa, etérea e acetato de etila (AcOEt). A fase etérea foi suspensa em metanol e água (MeOH/H₂O - 9:1) e extraída com hexano, obtendo-se as fases hexânica, hidroalcoólica e dois precipitados (ppt1 e ppt2). O ppt1 foi identificado como sendo a DAV (**Figura 8**). A fase hexânica foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, eluídas com hexano e as frações obtidas 1-104 foram secas em rotavapor, analisadas por CCDC e reunidas em 23 grupos, às frações 18-32 foram recromatografadas em coluna de Sephadex, eluídas com hexano, fornecendo o Lupeol (**Figura 8**). Estes procedimentos foram realizados no Departamento de Química da UFPI pela equipe da Prof^a. Dra. Mariana Helena Chaves.

4.3 Animais Experimentais

Para os ensaios farmacológicos foram utilizados camundongos albinos, variedade Swiss Webster, adultos, machos, pesando entre 25-30 g e ratos albinos, variedade Wistar, adultos, machos, pesando entre 180-200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais selecionados foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com livre acesso à água e ração (Fri-lab) e em condições controladas de temperatura (23±2°C) e ciclos de claro/escuro de 12 em 12h, com a fase de claro de 06:00 às 18:00 horas.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob número 10/09.

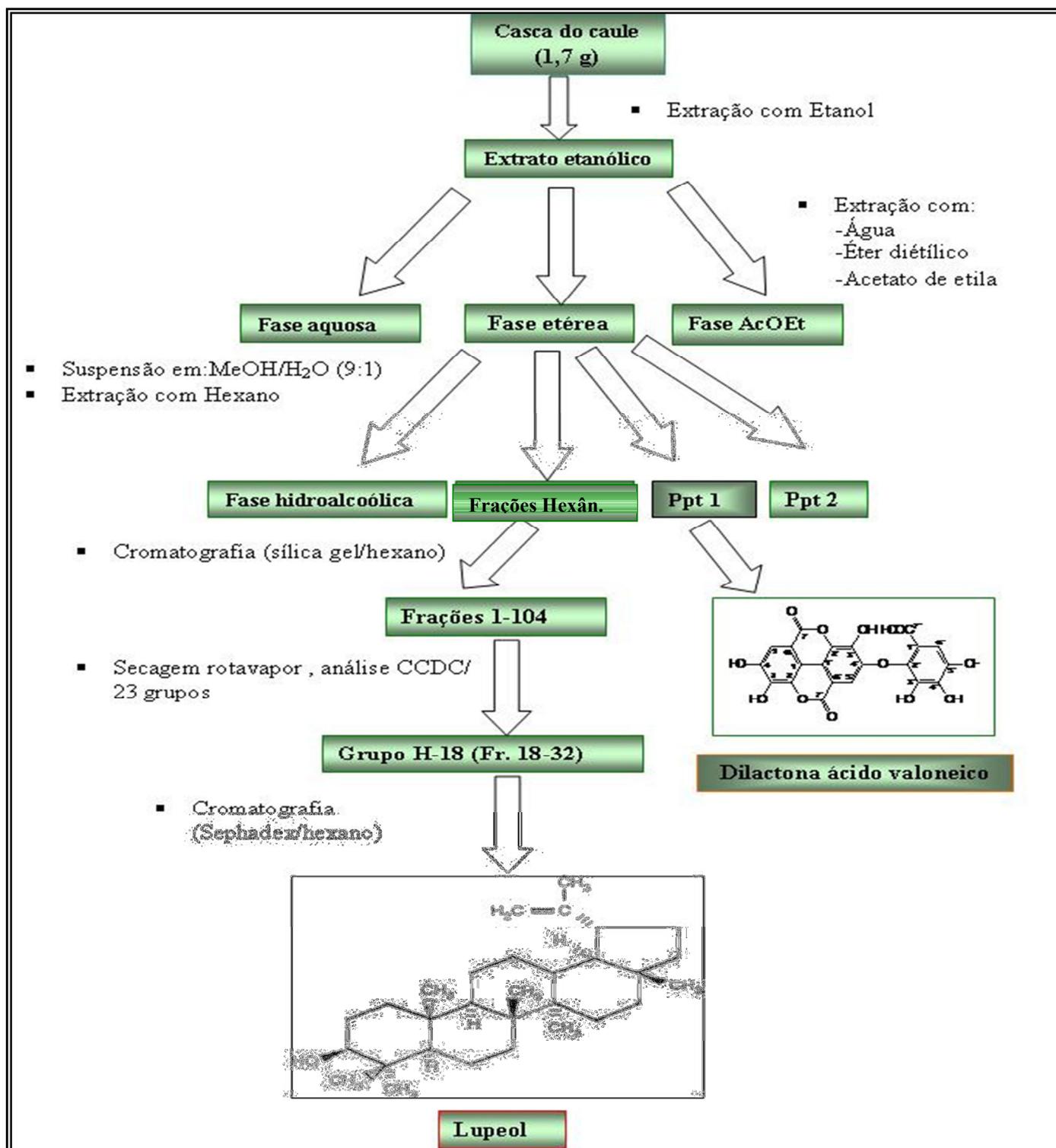


Figura 8 - Esquema de obtenção da dilactona do ácido valonéico (DAV) e do lupeol.

4.4 Drogas e Reagentes

Droga e Reagente	Origem
Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico	Sigma, USA
Ácido ditio bis-2-nitrobenzóico (DTNB)	Sigma, USA
Ácido tricloroacético	Sigma, USA
Álcool etílico absoluto 96%	Sigma, USA
Anfetamina	Sigma, USA
Cimetidina	Hexal , Brasil
Clonidina	Sigma, USA
Cloreto de cálcio	Vetec, Brasil
Cloreto de sódio	Vetec, Brasil
Cloreto de potássio	Vetbrands, Brasil
Cloridrato de ketamina (Dopalen®)	Bayer, Brasil
Cloridrato de xilazina (Rompun®)	Sigma, USA
Diazepam	União Química, Brasil
Diazóxido	Sigma, USA
Fenolftaleína	Sigma, USA
Glibenclamida	Sigma, USA
Glutationa reduzida	Sigma, USA
Haloperidol (Haldol ®)	Jassen Cilag, Brasil
Hidróxido de sódio	Vetec, Brasil
Indometacina	Continental Pharma, Itália
Ioimbina	Sigma, USA

Droga e Reagente	Origem
Imipramina	Cristália, Brasil
L-arginina	Sigma, USA
Loperamida (Imosec ®)	Jassen-Cilag, Brasil
Misoprostol (Cytotec®)	Cristália, Brasil
Morfina (Sulfato de Morfina - Dimorf®)	Sigma, USA
N-acetilcisteína	Sigma, USA
N- (1-naphthyl) ethylenediamida dihydrocloridrato	Sigma, USA
N-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME)	Sigma, USA
Naloxona	Sigma, USA
Óleo de rícino	Sigma, USA
Pentobarbital	Abbot Riedel, Al emanha
Tween 80	Sigma, USA
Verapamil	Hexal , Brasil

4.5 Avaliação do efeito do Lupeol e da DAV sobre o trato gastrointestinal

4.5.1 Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos (Robert, et al., 1979).

Neste protocolo foram utilizados camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos (n=8), que foram tratados com veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (3, 10 ou 30 mg/kg, v.o.), DAV (3, 10 ou 30 mg/kg, i.p.) ou N-acetilcisteína (NAC, 300 mg/kg, i.p.). Etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.) foi administrado 60 ou 30 min. após os tratamentos, por via oral (v.o) ou intraperitoneal (i.p.) respectivamente. Decorridos 30 minutos após o etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e o percentual de área gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (Image J[®]). A área ulcerada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico.

4.5.2 Avaliação do efeito da DAV e Lupeol sobre os grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) (Sedlak; Lindsay, 1968)

Para avaliar uma possível ação antioxidante no efeito gastroprotetor do lupeol e da DAV, grupos de camundongos Swiss (n=8), machos, 25-30g, foram tratados com o veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (30 mg/kg, v.o.), DAV (10 mg/kg, i.p.) ou NAC (300 mg/kg, i.p.) 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo tratado apenas com solução salina 0,9% foi incluído no estudo. Após 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados e seus estômagos retirados. A porção glandular de cada estômago foi removida e homogeneizada com EDTA 0,02M gelado, para preparação do homogenato a 10%. Em seguida, a uma alíquota de 4 mL do homogenato foi adicionado 3,2 mL de água destilada e 0,8 mL de ácido tricloroacético 50% e então as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. Um volume de 2 mL foi então retrado do sobrenadante e adicionado 4 mL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 100 µL de DTNB 0,01 M. A absorbância foi medida dentro de 5 min a 412 nm. A concentração de NP-SH foi calculada através de uma curva padrão de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em µg de NP-SH/g de tecido.

4.5.2.1 Estudo do envolvimento do óxido nítrico (NO)

Para verificar o envolvimento do NO no efeito gastroprotetor de lupeol e DAV, camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30g, divididos em grupos (n=8), foram tratados com o veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (30 mg/kg, v.o.), DAV (10mg/kg, i.p.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou L-NAME (20 mg/kg, i.p.). Os tratamentos foram realizados 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Para avaliar o papel do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico do lupeol e da DAV, foram realizadas combinações onde L-NAME (20 mg/kg, i.p.) foi administrado 15 min antes do lupeol, DAV ou L-arginina. Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e analisados como o descrito anteriormente (item 4.7.1).

4.5.2.2 Estudo do envolvimento das prostaglandinas (PGs)

Neste protocolo foram utilizados camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos (n=8), tratados com o veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (30 mg/kg, v.o.), DAV (10 mg/kg, i.p.) ou misoprostol (50 µg/kg, v.o.), 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). A indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi administrada 2h antes da administração do lupeol (30 mg/kg, v.o.), DAV (10 mg/kg, i.p.) ou do misoprostol (50 µg/kg, v.o.). Após 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e analisados conforme o descrito anteriormente (item 4.7.1).

4.5.2.3 Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}), no efeito gastroprotetor do lupeol e da DAV.

Neste protocolo foram utilizados camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos (n=8), foram tratados com veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (30mg/kg, v.o.), DAV (10mg/kg,i.p.) ou diazóxido (3 mg/kg, i.p.) 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/ animal). Para avaliar a possível participação dos canais de K_{ATP} no efeito gastroprotetor do lupeol, foram realizadas combinações nas quais a glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 30 min antes do tratamento com lupeol (30mg/kg, v.o.), DAV (10mg/kg,i.p.) ou diazóxido

(3 mg/kg, i.p.). Após 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e analisados segundo metodologia já descrita no item 4.7.1.

4.5.2.4 Papel dos canais de cálcio, no efeito gastroprotetor do lupeol e da DAV

Grupos (n=8) de camundongos Swiss, com peso de 25-30 g, foram tratados com o veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (30 mg/kg, v.o.), DAV (10 mg/kg,i.p.), cloreto de cálcio (50 mg/kg, i.p.) ou verapamil (5 mg/kg, i.p.), 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Nos tratamentos combinados o verapamil (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 20 minutos antes da administração do lupeol (30 mg/kg, v.o.), da DAV (10 mg/kg,i.p.) ou do cloreto de cálcio (50 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e analisados conforme já descrito anteriormente.

4.5.2.5 Estudo do envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos (Gyires *et al.*, 2000a)

Camundongos machos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (30 mg/kg; v.o.), DAV (10 mg/kg,i.p.), clonidina (0,05 mg/kg, v.o.) ou ioimbina (2 mg/kg, s.c.). Após 30 minutos (i.p.) ou 60 minutos (v.o.) dos tratamentos receberam etanol absoluto (0,2 mL/animal; v.o.). O papel dos receptores α_2 -adrenérgicos foi investigado pela administração de ioimbina (2 mg/kg, s.c.) 20 minutos antes do lupeol, da DAV ou da clonidina. Após 30 minutos da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados e a área de lesão gástrica glandular foi determinada através do método descrito anteriormente.

4.5.2.6 Estudo do envolvimento dos receptores opióides (Gyires *et al.*, 2000a).

Camundongos machos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com o veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (30 mg/kg; v.o.), DAV (10mg/kg, i.p.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.) 60 ou 30 minutos antes de receberem etanol absoluto (0,2 mL/animal , v.o.). O papel dos receptores opióides foi investigado pela administração de naloxona (2 mg/kg, i.p.)

15 min antes do lupeol (30 mg/kg, v.o.), DAV (10mg/kg, i.p.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.). Após 30 minutos da administração da DAV ou morfina e 60 minutos após a administração do lupeol os animais receberam etanol absoluto (0,2 mL/animal; v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após administração do etanol, e a área de lesão gástrica glandular determinada através do método descrito anteriormente no item 4.7.1.

4.5.2.7 Avaliação da atividade antissecreatória gástrica em ratos (Reitman et al., 1970)

Para avaliar uma possível atividade antissecreatória gástrica do lupeol e da DAV, ratos Wistar, machos, pesando entre 150- 200g, em jejum de sólidos de 12 h, com livre acesso à solução de glicose 5%, foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, i.p.) mais ketamina (90 mg/kg, i.p.), fixados em decúbito dorsal e realizada uma incisão de 2 cm na região epigástrica, o estômago foi localizado e o piloro amarrado. Veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (30 mg/kg), DAV (10mg/kg) ou cimeidina (100 mg/kg) foram administrados, por via intraduodenal, em um volume de 2,5 mL/kg, imediatamente após a ligadura do piloro. A incisão foi fechada e os animais foram deixados em repouso por 4 horas, após este período foram sacrificados, a cárdia foi amarrada para evitar perda do material secretado e o estômago foi removido, lavado em água destilada, seco com papel de filtro e mantido em béquer sobre placa de gelo. O estômago foi seccionado ao longo da grande curvatura, e o suco gástrico recolhido em tubo de ensaio imerso em gelo. Os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 30 min. O sobrenadante do suco gástrico foi transferido para uma proveta e o volume foi verificado. A acidez total foi determinada através de titulação com NaOH 0,1N utilizando fenolftaleína como indicador ácido-básico.

4.5.2.8 Efeito do tratamento com Lupeol e DAV sobre o trânsito intestinal (Stickney; Northup, 1959)

Este método utiliza-se de carvão ativado como marcador e a velocidade do trânsito intestinal é medida pelo deslocamento deste marcador após um tempo pré-determinado da sua administração oral e os resultados expressos em relação ao comprimento total do intestino delgado.

Neste protocolo foram utilizados camundongos machos em jejum de sólidos de 12 horas, com fornecimento livre de água. Grupos de 8 animais foram tratados com veículo lupeol (2% de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.), veículo DAV (salina 0,9%, 10 mL/kg, i.p.), lupeol (3,10 e 30 mg/kg, v.o.), DAV (3,10 e 30 mg/kg, i.p.), loperamida (5 mg/kg, i.p.) ou clonidina (0,05mg/kg, i.p.). Decorridos 30 ou 60 minutos dos tratamentos, foi administrado 10% de carvão ativado em 5% de goma arábica (0,1 ml/10 g, v.o.). Após 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o estômago e o intestino delgado removidos. Com auxílio de uma régua, o comprimento total do intestino delgado (do piloro à válvula íleo-cecal) e a distância percorrida pelo carvão ativado (última porção que contenha pelo menos 1cm contínuo destemarcador) foi medida. O percentual de percurso do carvão em função do comprimento total do intestino foi determinado pela fórmula:

$$\text{Trânsito Intestinal (\%)} = \frac{\text{Distância percorrida pelo carvão}}{\text{Comprimento total do intestino delgado}} \times 100$$

A participação dos receptores opióides e adrenérgicos foi realizada através da administração prévia de naloxona (2mg/kg, s.c.) ou ioimbina (2 mg/kg, s.c.) 15 ou 20 minutos antes dos tratamentos, respectivamente.

4.5.2.9 Avaliação do efeito da DAV sobre o trânsito intestinal estimulado.

O óleo de rícino, extraído das sementes da *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), tem no ácido ricinoléico o principal componente químico responsável pela ação laxante do óleo, pois reduz a absorção de líquido e eletrólitos e estimula o peristaltismo intestinal (BAGGIO, 2004).

Neste protocolo foram utilizados camundongos machos em jejum de sólidos de 12h e com fornecimento livre de água. Grupos de 8 animais foram tratados com o veículo (salina 0,9%), DAV (10 mg/kg, i.p.) e loperamida (5 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral óleo de rícino (0,4ml/animal) e após 10 minutos deste, foi administrado 10% de carvão ativado em 5% de goma arábica (0,1 ml/10 g, v.o.). Os animais foram observados quanto ao tempo de aparecimento das primeiras fezes marcadas com o carvão.

4.6 Investigação da atividade do Lupeol e da DAV sobre o Sistema Nervoso Central

4.6.1 Teste do Campo Aberto (Hall, 1941; Archer, 1973)

O aparato utilizado para o experimento consiste de uma caixa de acrílico com paredes transparentes e piso preto (30 x 30 x 15 cm), dividida em 9 quadrantes iguais. Camundongos machos, pesando 25-30 g, divididos em grupos (n=8-10) foram tratados com os veículos (2% de Tween 80 em salina e salina 0,9%), lupeol (3,10 e 30 mg/kg, v.o.), DAV (3,10 e 30 mg/kg, i.p.) ou diazepam (1mg/kg, i.p.). Após 30 min (i.p) ou 60 min (v.o.) da administração dos tratamentos, cada animal foi colocado no centro do campo aberto e a unidade de medida foi número de quadrantes nos quais o animal colocou as quatro patas, registrado durante 5 minutos, após um minuto de ambientação. Após a retirada de cada animal a caixa era limpa com álcool a 70%.

4.6.2 Teste do Rota Rod (Dunham; Miya, 1957)

Neste protocolo os camundongos foram tratados com DAV (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após os tratamentos, os animais foram colocados em um aparelho de *rota rod* (RR 2002, Insight equipamentos), sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por o período de 1 minuto. Foram registrados o tempo, em segundos (s), de permanência do animal na barra giratória e o número de quedas, com três reconduções, no máximo.

4.6.3 Teste da potencialização do sono induzido por pentobarbital (Carlini *et al.*, 1986)

Camundongos, divididos em grupos de oito animais, foram tratados com salina 0,9% (Veículo), DAV (3, 10 e 30mg/kg, i.p.) e Diazepam (1mg/kg i.p.). Trinta minutos após os tratamentos os animais receberam uma injeção de pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.), foram colocados em décubito dorsal e registrados os parâmetros de latência, ou seja, o período compreendido entre a administração do barbitúrico e à perda do reflexo postural e duração do sono, que é o período entre a perda e a recuperação deste reflexo. Sendo que para ambos os parâmetros foram feitos registros após três tentativas. O tempo de corte do teste foi de 240 minutos.

4.6.4 Teste da suspensão da cauda (Steru, *et al.* 1985)

Os camundongos receberam DAV (3,10 e 30 mg/kg, i.p.) ou imipramina (10 mg/kg) e após 30 minutos foram suspensos e presos por uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma localizada 58 cm acima da bancada, durante 6 minutos. O parâmetro observado foi o tempo, em segundos, de imobilidade do animal.

4.6.5 Teste de Catalepsia (Costall; Naylor, 1974)

Para este protocolo os camundongos foram divididos em grupos (n=8) e tratados com veículo, lupeol (3,10 e 30 mg/kg, v.o.), DAV (3,10 e 30 mg/kg, i.p.) ou haloperidol (1 mg/kg, i.p.). Aos 30 ou 60 minutos após os tratamentos os animais foram colocados com as duas patas dianteiras sobre uma barra de vidro, colocada na posição vertical a 5 cm da mesa, o tempo de permanência do animal nesta posição foi registrado em segundos. Os resultados foram convertidos para minuto e expressos em escores em relação ao tempo de permanência na barra, assim: 0 = 0-0,08 min.; 1 = 0,09-0,35 min.; 2 = 0,36-0,80 min.; 3 = 0,81-1,42 min.; 4 = 1,43-2,24. O tempo de corte foi de 120 s e o animal foi reconduzido a barra por no máximo três vezes.

4.6.6 Hiperlocomoção induzida por anfetamina em camundongos (Przegalinski *et al.*, 2001)

Camundongos Swiss machos, pesando 25-30 g, divididos em grupos (n=8-10) foram tratados com DAV (10 mg/kg, i.p.) e trinta minutos após a administração dos tratamentos, cada animal recebeu uma injeção de anfetamina (5 mg/kg, s.c.). Transcorridos 20 minutos, o animal foi colocado no centro da caixa de movimentação e o número de invasões, consideradas quando o animal coloca as quatro patas no mesmo quadrado foi registrado durante 5 minutos, após um minuto de ambientação. Após a retirada de cada animal a caixa era limpa com álcool a 70%.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 4.0 (USA). Os dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação múltipla dos dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman Keul. Para os dados não-paramétricos, os resultados foram expressos como mediana (mínimo - máximo) e analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS.

6.1 Efeito do lupeol nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

A administração oral de etanol (96%, 0,2ml/animal) em animais tratados com veículo causou um dano severo na mucosa gástrica. A lesão no grupo controle foi $25,39 \pm 2,25 \text{ mm}^2$. O pré-tratamento com lupeol nas doses de 3, 10 e 30mg/kg demonstrou uma proteção da mucosa contra o dano induzido por etanol em $15,53 \pm 1,32$; $12,35 \pm 1,32$; $7,40 \pm 0,58 \text{ mm}^2$ respectivamente, correspondendo a inibições de 38, 51 e 70%. A NAC (300 mg/kg, i.p.), usado como controle positivo, reduziu de forma significativa o dano gástrico para $12,74 \pm 0,58 \text{ mm}^2$, correspondendo a uma inibição de 50% (**Figura 9**).

6.2 Efeito da DAV nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

Os animais que receberam apenas veículo mostraram, após a administração oral do etanol absoluto, extensa área de lesão da mucosa gástrica ($24,54 \pm 1,37 \text{ mm}^2$). A DAV nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, i.p., reduziu de forma significativa a área ulcerada para $15,30 \pm 2,92$; $13,61 \pm 2,02$ e $5,45 \pm 1,53 \text{ mm}^2$, respectivamente, correspondendo a inibições de 38, 44 e 77%. A administração de NAC (300 mg/kg, i.p.), controle positivo, reduziu significativamente as lesões gástricas para $6,80 \pm 1,14 \text{ mm}^2$, correspondendo a uma inibição de 72% (**Figura 10**).

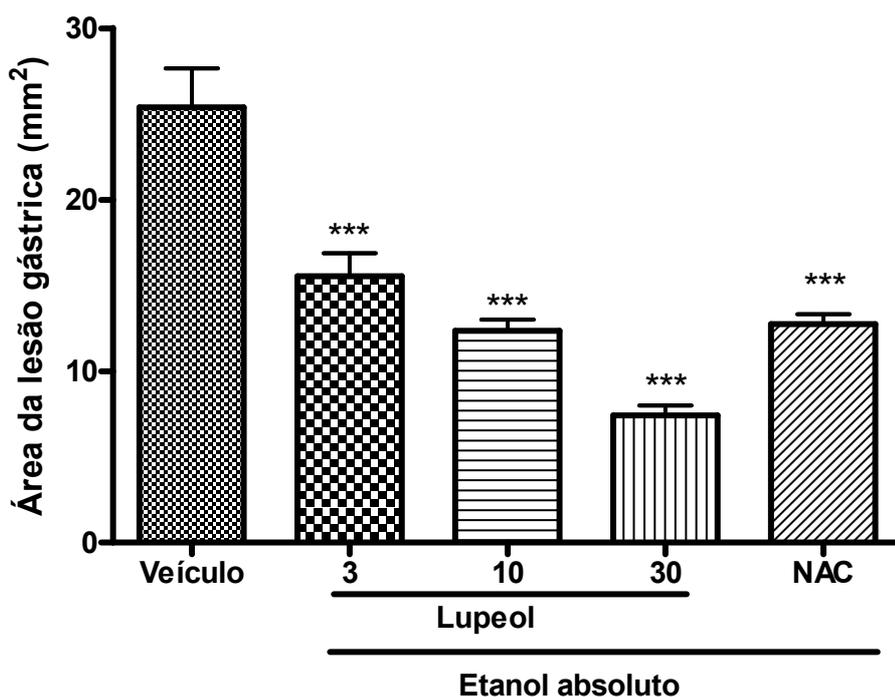


Figura 9 - Efeito gastroprotetor do lupeol no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Veículo (2% Tween 80 em salina 0,9%, 10 ml/kg, i.p.), lupeol (3,10, 30 mg/ kg, v.o.) ou NAC (300 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min (i.p.) e 60 min (v.o.) antes da administração de etanol absoluto (0,2 ml/animal). A área gástrica lesionada foi determinada por planimetria (mm²). Os dados representam a média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

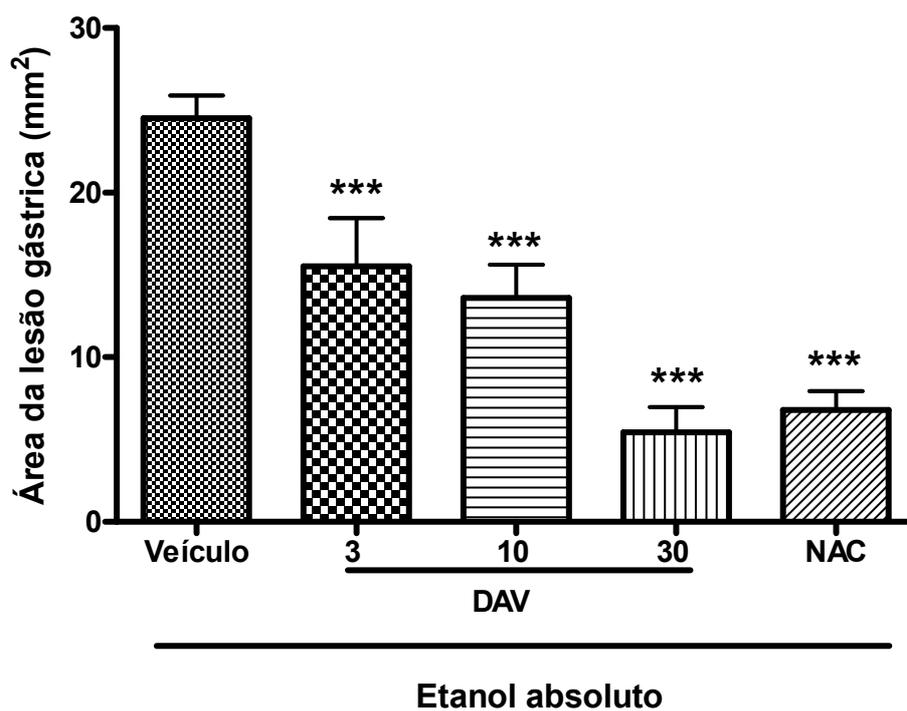


Figura 10 - Efeito gastroprotetor da DAV no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Veículo (solução salina 0,9%, 10 ml/kg, i.p.), DAV (3,10, 30 mg/kg, i.p.) ou NAC (300 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 ml/animal). O percentual de área gástrica lesionada foi determinado por planimetria (mm²). Os dados representam a média ± E.P.M. ***p < 0,001 vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.3 Papel dos Grupos Sulfidrílicos Não Protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

Os animais que receberam etanol apresentaram uma significativa redução ($p < 0,001$) nos níveis de NP-SH ($290,00 \pm 8,70 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao controle que recebeu apenas o veículo ($499,50 \pm 31,13 \mu\text{g/g}$ de tecido). O lupeol (30 mg/kg) foi capaz de atenuar, de forma significativa ($p < 0,05$), a depleção dos grupos sulfidrila produzida pelo etanol ($368,30 \pm 33,84 \mu\text{g/g}$ de tecido). A N-acetilcisteína (300 mg/kg , i.p.) inibiu significativamente ($p < 0,001$) a depleção dos grupos sulfidrila ($439,20 \pm 11,91 \mu\text{g/g}$ de tecido) produzida pelo etanol (**Tabela 1**).

6.4 Papel dos Grupos Sulfidrila Não Protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

Houve uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis de NP-SH ($73,33 \pm 4,01 \mu\text{g/g}$ de tecido), nos animais que receberam etanol absoluto quando comparado ao controle que recebeu apenas o veículo ($119,60 \pm 5,41 \mu\text{g/g}$ de tecido). O tratamento com DAV (10 mg/kg , i.p.) e com N-acetilcisteína (300 mg/kg , i.p.) atenuaram de forma significativa ($p < 0,05$) ($91,79 \pm 2,07 \mu\text{g/g}$ de tecido e $97,27 \pm 7,64 \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) a depleção dos grupos sulfidrila produzida pelo etanol (**Tabela 2**).

Tabela 1. Efeito do lupeol e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	NP-SH ($\mu\text{g/g}$ tecido)
Controle veículo	-	499,50 \pm 31,13
Controle etanol	-	290,00 \pm 8,7 ^a
Lupeol	30	368,30 \pm 33,84 ^b
NAC	300	439,20 \pm 11,91 ^c

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis gástricos de Grupos Sulfidrila Não-Proteicos (NP-SH) (n=8). Veículo (2% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) e lupeol (30 mg/kg, v.o.) foram administrados 60 min antes e N-acetilcisteína (NAC, 300 mg/kg, i.p.) 30 min antes da administração de etanol absoluto. ^ap<0,001 vs controle veículo; ^b p<0,05 vs controle etanol; ^c p<0,001 vs controle etanol (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 2. Efeito da DAV e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) na úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	NP-SH ($\mu\text{g/g}$ tecido)
Controle veículo	-	119,60 \pm 5,41
Controle etanol	-	73,30 \pm 4,01 ^a
DAV	10	91,79 \pm 2,07 ^b
NAC	300	97,27 \pm 7,64 ^b

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis gástricos de Grupos Sulfidrila Não-Proteicos (NP-SH) (n=8). Veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg), DAV (30 mg/kg, v.o.) e N-acetilcisteína (NAC, 300 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes da administração de etanol absoluto. ^ap<0,001 vs controle veículo; ^b p<0,05 vs controle etanol (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.5 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do lupeol.

A administração de lupeol (30 mg/kg, v.o.) e de L-Arginina (600 mg/kg, i.p.), um aminoácido que é substrato para a síntese de óxido nítrico, reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) as lesões gástricas induzidas por etanol para $8,15 \pm 0,77 \text{ mm}^2$ e $11,24 \pm 0,69 \text{ mm}^2$, respectivamente, quando comparado ao controle veículo ($25,14 \pm 4,01 \text{ mm}^2$).

Os animais tratados com L-NAME (20 mg/kg, i.p.), um inibidor não seletivo da Óxido Nítrico Sintase (NOS), aumentaram de maneira significativa ($p < 0,05$) o percentual de área gástrica ulcerada ($32,06 \pm 4,21 \text{ mm}^2$), em relação ao grupo veículo ($25,14 \pm 4,01 \text{ mm}^2$). O L-NAME (20 mg/kg, i.p.) reverteu de forma significativa ($p < 0,05$) os efeitos gastroprotetores do lupeol ($22,77 \pm 2,38 \text{ mm}^2$) e da L-arginina ($20,99 \pm 2,74 \text{ mm}^2$) (Figura 11).

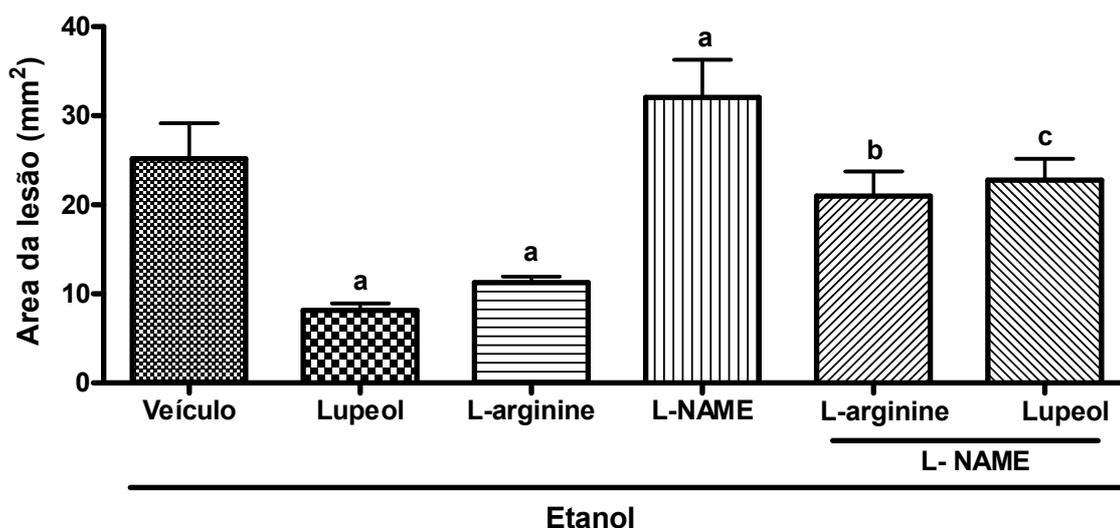


Figura 11 - Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do lupeol. Veículo (2 % de Tween 80 em salina, 10 mL/kg, v.o.) e lupeol (30 mg/kg, v.o.) foram administrados 60 min antes e L-NAME (20 mg/kg, i.p.) ou L-arginina (600 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). L-NAME (20 mg/kg, i.p.) foi administrado 15 min antes do lupeol (30 mg/kg, v.o.) ou L-arginina (600 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada ($n=8$). ^a $p < 0,05$ vs veículo; ^b $p < 0,05$ vs L-arginina; ^c $p < 0,01$ vs lupeol (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.6 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DAV

Em comparação com o veículo ($23,82 \pm 2,00 \text{mm}^2$), o tratamento com DAV (10 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a área gástrica lesionada ($16,92 \pm 2,75 \text{mm}^2$). A L-Arginina (600 mg/kg, i.p.), um aminoácido que é substrato para a síntese de óxido nítrico, também reduziu ($16,59 \pm 3,29\%$), significativamente ($p < 0,05$) a área ulcerada, quando comparado ao grupo veículo ($23,82 \pm 2,00 \text{mm}^2$). O L-NAME (20 mg/kg, i.p.), um inibidor não seletivo da Óxido Nítrico Sintase (NOS), aumentou significativamente ($p < 0,05$) a lesão ($36,51 \pm 2,31 \text{mm}^2$), em relação ao grupo veículo. O L-NAME (20 mg/kg, i.p.) bloqueou de forma significativa ($p < 0,01$) os efeitos da DAV ($37,03 \pm 2,45 \text{mm}^2$) e da L-Arginina ($29,64 \pm 4,58 \text{mm}^2$). Os resultados obtidos com a avaliação do papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DAV, no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, estão na **Figura 12**.

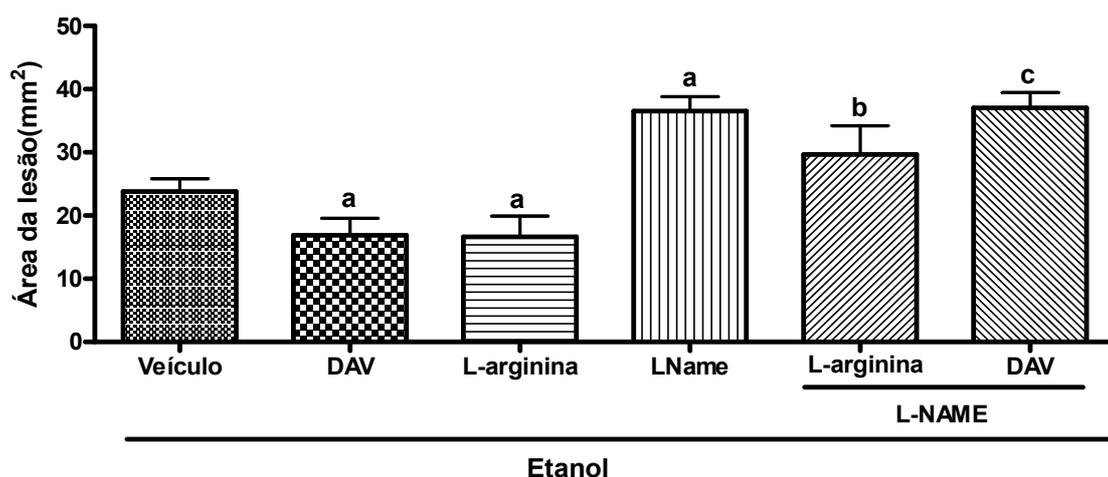


Figura 12. Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DAV. Veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, i.p.), DAV(10 mg/kg, i.p.), L-NAME (20 mg/kg, i.p.) ou L-Arginina (600 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). L-NAME (20 mg/kg, i.p.) foi administrado 15 min antes do DAV ou L-Arginina. Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs veículo; ^b $p < 0,05$ vs L-Arginina ; ^c $p < 0,01$ vs DAV (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.7 Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

Os resultados obtidos com o modelo que avalia o papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do lupeol estão demonstrados na **Tabela 3**.

Os animais que receberam apenas veículo antes da administração oral do etanol absoluto apresentaram uma extensa área gástrica ulcerada ($20,65 \pm 1,00 \text{ mm}^2$). Lupeol (30 mg/kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) a lesão gástrica ($4,76 \pm 0,44 \text{ mm}^2$) em comparação com veículo ($20,65 \pm 1,00 \text{ mm}^2$). O efeito gastroprotetor do lupeol (30 mg/kg, v.o.) foi bloqueado ($15,30 \pm 0,90 \text{ mm}^2$) de forma significativa ($p < 0,001$) na presença de indometacina (10 mg/kg, v.o.), um anti-inflamatório não esteroideal. Misoprostol (50 $\mu\text{g/kg}$, v.o.), um análogo das prostaglandinas do tipo E1 (PGE1), também reduziu de maneira significativa ($p < 0,001$) as lesões gástricas ($3,40 \pm 0,84 \text{ mm}^2$), quando comparado ao grupo controle ($20,65 \pm 1,00 \text{ mm}^2$). Indometacina (10 mg/kg, v.o.) reverteu ($19,21 \pm 1,00 \text{ mm}^2$), significativamente ($p < 0,001$), o efeito gastroprotetor do misoprostol (50 $\mu\text{g/kg}$, v.o.).

Tabela 3 - Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg/ $\mu\text{g/kg}$)	Área de Lesão Gástrica (mm^2)
Veículo	-	$20,65 \pm 1,00$
Lupeol	30	$4,76 \pm 0,44^a$
Misoprostol	50	$3,40 \pm 0,84^a$
Indometacina	10	$24,85 \pm 1,79^a$
Indometacina+ Lupeol	10+30	$15,30 \pm 0,90^b$
Indometacina+ Misoprostol	10+50	$19,21 \pm 1,00^c$

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada ($n = 8$). Veículo (2 % de Tween 80 em salina 0,9%), lupeol (30 mg/kg, v.o.) e misoprostol (50 $\mu\text{g/kg}$, v.o.) foram administrados 60 min da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Indometacina foi administrada, por via oral, 2 h antes do etanol absoluto, lupeol ou misoprostol. ^a $p < 0,05$ vs veículo; ^b $p < 0,05$ vs lupeol; ^c $p < 0,05$ vs misoprostol (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.8 Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Na **Tabela 4** observamos os resultados obtidos na avaliação do papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da DAV.

Animais tratados com veículo antes da administração oral do etanol absoluto apresentaram extenso percentual de área gástrica ulcerada ($21,80 \pm 2,07 \text{ mm}^2$). A administração de DAV (10 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) a lesão gástrica ($13,49 \pm 1,48 \text{ mm}^2$) em comparação com o grupo veículo ($21,80 \pm 2,07 \text{ mm}^2$). Essa gastroproteção da DAV foi bloqueada ($25,76 \pm 3,27 \text{ mm}^2$) de forma significativa ($p < 0,001$) na presença de indometacina (10 mg/kg, v.o.), um anti-inflamatório não esteroideal. O análogo de PGE1, Misoprostol (50 $\mu\text{g/kg}$, v.o.), também reduziu de maneira significativa ($p < 0,001$) a lesão gástrica ulcerada ($5,90 \pm 1,75 \text{ mm}^2$), quando comparado veículo ($21,80 \pm 2,07 \text{ mm}^2$). A Indometacina reverteu ($17,60 \pm 0,82 \text{ mm}^2$), significativamente ($p < 0,001$), o efeito gastroprotetor do misoprostol.

Tabela 4 - Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg/ $\mu\text{g/kg}$)	Área de Lesão Gástrica (mm^2)
Veículo	-	$21,80 \pm 2,07$
DAV	10	$13,49 \pm 1,48^a$
Misoprostol	50	$5,90 \pm 1,75^a$
Indometacina	10	$22,97 \pm 1,75$
Indometacina+ DAV	10+10	$25,76 \pm 3,27^b$
Indometacina+ Misoprostol	10+50	$17,60 \pm 0,82^c$

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada (n=8). Veículo (salina 0.9%), DAV (10 mg/kg, i.p.) e misoprostol (50 $\mu\text{g/kg}$, v.o.) foram administrados 30 min (i.p.) e 60 min (v.o.) antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Indometacina foi administrada, por via oral, 2 h antes do etanol absoluto, DAV ou misoprostol. ^a $p < 0,05$ vs veículo; ^b $p < 0,05$ vs DAV; ^c $p < 0,05$ vs misoprostol (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.9 Papel dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol

Os resultados do papel dos canais de potássio no efeito gastroprotetor do lupeol podem ser observados na **Tabela 5**.

O lupeol reduziu de forma significativa ($p < 0,001$), a lesão gástrica ($6,63 \pm 0,81 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo controle veículo ($16,68 \pm 0,66 \text{ mm}^2$). O efeito gastroprotetor do lupeol foi bloqueado ($16,89 \pm 0,78 \text{ mm}^2$) de forma significativa ($p < 0,001$) na presença de glibenclamida (5 mg/kg, i.p.), um bloqueador de canais de potássio ATP-dependentes. Diazóxido (3 mg/kg, i.p.), que promove a abertura de canais de K^+_{ATP} , reduziu significativamente ($p < 0,001$) a área gástrica ulcerada ($4,90 \pm 0,48 \text{ mm}^2$), quando comparado ao grupo veículo ($16,68 \pm 0,66 \text{ mm}^2$). A glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) reverteu ($12,82 \pm 0,65 \text{ mm}^2$) de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$) o efeito gastroprotetor do diazóxido (3 mg/kg, i.p.).

6.10 Papel dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesão gástrica induzida por etanol

Os resultados do papel dos canais de potássio no efeito gastroprotetor da DAV podem ser observados na **Tabela 6**.

O tratamento com DAV foi capaz de reduzir, de forma significativa ($p < 0,001$), a lesão gástrica ($11,08 \pm 1,22 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo veículo ($17,07 \pm 0,63 \text{ mm}^2$). Este efeito gastroprotetor foi bloqueado ($16,89 \pm 0,78 \text{ mm}^2$) significativamente ($p < 0,001$) na presença de glibenclamida (5 mg/kg, i.p.), um bloqueador de canais de potássio ATP-dependentes. Diazóxido (3 mg/kg, i.p.), que promove a abertura de canais de K^+_{ATP} , também reduziu significativamente ($p < 0,001$) a área gástrica ulcerada ($4,90 \pm 0,48 \text{ mm}^2$), quando comparado ao grupo veículo ($16,68 \pm 0,66 \text{ mm}^2$). O tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) reverteu ($12,82 \pm 0,65 \text{ mm}^2$) de forma significativa ($p < 0,001$) o efeito gastroprotetor do diazóxido (3 mg/kg, i.p.).

Tabela 5. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}), no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Área de Lesão Gástrica (mm ²)
Veículo	-	16,68±0,66
Lupeol	30	6,63±0,81 ^a
Diazóxido	3	4,90±0,48 ^a
Glibenclamida	5	19,63±0,81 ^a
Glibenclamida + Lupeol	5+30	16,89±0,78 ^b
Glibenclamida + Diazóxido	5+3	12,82±0,65 ^c

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área de lesão gástrica (n=8). Veículo (2% de Tween 80 em sal ina, v.o.), lupeol (30 mg/kg, v.o.), diazóxido (3 mg/kg, i.p.) e glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 min antes do lupeol ou diazóxido. ^ap<0,001 vs veículo; ^bp<0,001 vs lupeol; ^cp< 0,001 vs diazóxido (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 6. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K^+_{ATP}), no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Área de Lesão Gástrica (mm ²)
Veículo	-	17,07±0,63
DAV	10	11,08±1,22 ^a
Diazóxido	3	4,90±0,48 ^a
Glibenclamida	5	19,63±0,81 ^a
Glibenclamida + DAV	5+10	20,27±1,67 ^b
Glibenclamida + Diazóxido	5+3	12,82±0,65 ^c

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área de lesão gástrica (n=8). Veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (10 mg/kg, i.p.), diazóxido (3 mg/kg, i.p.) e glibenclamida (5 mg/kg,i.p.) foram administrados 30 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal ,v.o.). Glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 min antes da DAV ou diazóxido. ^ap<0,001 vs veículo; ^bp<0,001 vs DAV; ^cp< 0,001 vs diazóxido (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.11 Papel dos canais de cálcio no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

O grupo tratado apenas com veículo antes da administração oral do etanol absoluto, apresentou uma área gástrica ulcerada de $29,95 \pm 3,53 \text{ mm}^2$. O tratamento com lupeol (30 mg/kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a área de lesão gástrica ($15,13 \pm 2,39 \text{ mm}^2$). O efeito gastroprotetor do lupeol (30 mg/kg, v.o.) foi bloqueado ($37,34 \pm 5,80 \text{ mm}^2$) de forma significativa ($p < 0,05$) na presença de verapamil (5 mg/kg, i.p.), um bloqueador de canais de cálcio. Cloreto de cálcio (CaCl_2 , 50 mg/kg, i.p.), reduziu de maneira significativa ($p < 0,05$) a área gástrica ulcerada ($6,19 \pm 2,54 \text{ mm}^2$), quando comparado ao grupo veículo ($29,95 \pm 3,53 \text{ mm}^2$). Verapamil (5 mg/kg, v.o.) reverteu ($15,63 \pm 2,20 \text{ mm}^2$), significativamente ($p < 0,05$), o efeito gastroprotetor do CaCl_2 (50 mg/kg, v.o.) (**Tabela 7**).

6.12 Papel dos canais de cálcio no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

O grupo tratado com veículo antes da administração v.o do etanol absoluto apresentou uma área gástrica ulcerada de $30,90 \pm 1,88 \text{ mm}^2$. O tratamento com DAV (10 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a área de lesão gástrica ($18,66 \pm 2,36 \text{ mm}^2$). O efeito gastroprotetor da DAV (10 mg/kg, i.p.) foi bloqueado ($25,89 \pm 3,35 \text{ mm}^2$) de forma significativa ($p < 0,05$) com verapamil (5 mg/kg, i.p.), um bloqueador de canais de cálcio. Uma redução significativa ($2,69 \pm 0,98 \text{ mm}^2$) também foi observada nos animais tratados com Cloreto de cálcio (CaCl_2 , 50 mg/kg, i.p.) em relação ao veículo ($30,90 \pm 1,88 \text{ mm}^2$). Verapamil (5 mg/kg, v.o.) reverteu ($25,89 \pm 3,35 \text{ mm}^2$) significativamente ($p < 0,05$), o efeito gastroprotetor do CaCl_2 (50 mg/kg, v.o.) (**Tabela 8**).

Tabela 7 - Papel dos canais de cálcio, no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Área de Lesão Gástrica (mm ²)
Veículo	-	29,95 ± 3,53
Lupeol	30	15,13 ± 2,39 ^a
CaCl ₂	50	6,19 ± 2,54 ^a
Verapamil	5	51,03 ± 11,28 ^a
Verapamil + Lupeol	5+30	37,34 ± 5,80 ^{b c}
Verapamil + CaCl ₂	5+50	15,63 ± 2,20 ^{b d}

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área de lesão gástrica (n=8). Os animais foram tratados com veículo (2 % de Tween 80 em sal ina, 10 mL/Kg, v.o.), lupeol (30 mg/kg, v.o.), CaCl₂ (50 mg/kg, i.p.) ou verapamil (5mg/kg, i.p.) 30 min. (i.p.) ou 60 min. (v.o.) antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Verapamil (5 mg/kg, i.p.) foi administrado 15 min antes do lupeol (30 mg/kg, v.o.) ou CaCl₂ (50 mg/kg, i.p.). ^a p<0.01 vs veículo; ^b p<0.05 vs. verapamil; ^c p<0,05 vs lupeol; ^d p<0,05 vs CaCl₂ (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 8. Papel dos canais de cálcio, no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Área De Lesão Gástrica (mm ²)
Veículo	-	30,90 ± 1,88
DAV	10	18,66 ± 2,36 ^a
CaCl ₂	50	2,69 ± 0,98 ^a
Verapamil	5	57,70 ± 3,49 ^a
Verapamil + DAV	5+10	25,89 ± 3,35 ^{b c}
Verapamil + CaCl ₂	5+50	13,74 ± 1,80 ^{b d}

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área de lesão gástrica (n=8). Os animais foram tratados com veículo (salina, 10 mL/Kg, i.p.), DAV (10 mg/kg, i.p.), CaCl₂ (50 mg/kg, i.p.) ou verapamil (5mg/kg,i.p.) 30 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal , v.o.). Verapamil (5 mg/kg, i.p.) foi administrado 15 min antes da DAV (10 mg/kg, i.p.) ou CaCl₂ (50 mg/kg, i.p.). ^a p<0.01 vs veículo; ^b p<0.05 vs. verapamil; ^c p<0,05 vs DAV ;^d p<0,05 vs CaCl₂ (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.13 Papel do receptor α_2 adrenérgico no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol

O tratamento dos animais com clonidina (0,05 mg/kg, v.o.) ou com lupeol (30 mg/kg, v.o.) promoveu uma redução significativa ($p < 0,001$) da lesão gástrica induzida pelo etanol ($4,93 \pm 0,79 \text{ mm}^2$; $8,51 \pm 1,25 \text{ mm}^2$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle veículo ($29,86 \pm 1,31 \text{ mm}^2$). O pré-tratamento com Ioimbina (2 mg/kg, s.c.), um antagonista α_2 adrenérgico, reverteu significativamente ($p < 0,05$) a gastroproteção da clonidina ($11,43 \pm 1,63 \text{ mm}^2$) e do lupeol ($14,55 \pm 0,87 \text{ mm}^2$) (**Tabela 9**).

6.14 Papel do receptor α_2 adrenérgico no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesão gástrica induzida por etanol

O tratamento dos animais com clonidina (0,05 mg/kg, v.o.) ou com DAV (10 mg/kg, i.p.) promoveu uma redução significativa ($p < 0,001$) da lesão gástrica induzida pelo etanol ($15,13 \pm 2,41 \text{ mm}^2$; $16,64 \pm 2,41 \text{ mm}^2$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle veículo ($35,16 \pm 2,76 \text{ mm}^2$). O pré-tratamento com Ioimbina (2 mg/kg, s.c.) reverteu significativamente ($p < 0,05$) a gastroproteção da clonidina ($30,57 \pm 3,68 \text{ mm}^2$) e da DAV ($28,74 \pm 2,06 \text{ mm}^2$) (**Tabela 10**).

Tabela 9. Papel dos receptores α_2 adrenérgico no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Área de Lesão Gástrica (mm ²)
Veículo	-	29,86±1.31
Lupeol	30	8,51± 1,25 ^a
Clonidina	0,05	4,93 ± 0.79 ^a
Ioimbina + Clonidina	2+0,05	11.43 ± 1.63 ^b
Ioimbina + Lupeol	2+30	14.55 ± 0.87 ^c

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área de lesão gástrica (n=8). Os animais foram tratados com veículo (2% de Tween 80 em salina, v.o.), lupeol (30 mg/kg, v.o.) ou clonidina (0,05 mg/kg, v.o.) 60 min antes da administração do etanol absoluto (0,2ml/animal). A Ioimbina (2 mg/kg, s.c.) foi administrada 30 min antes de clonidina ou lupeol. ^a p<0.001 vs veículo; ^b p<0.01 vs. clonidina; ^c p<0,05 vs lupeol (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 10. Papel dos receptores α_2 adrenérgico no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Área de Lesão Gástrica (mm ²)
Veículo	-	35,16 ±2,76
DAV	10	16,64 ± 2.41 ^a
Clonidina	0,05	15,13 ± 2,41 ^a
Ioimbina + Clonidina	2+0,05	30,57 ± 3.68 ^b
Ioimbina + DAV	2+10	28,74 ± 2,06 ^c

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) da área de lesão gástrica (n=8). Os animais foram tratados com veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (10 mg/kg, i.p.) ou clonidina (0,05 mg/kg, v.o.) 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes da administração de etanol absoluto (0,2ml/animal). A ioimbina (2 mg/kg, s.c.) foi administrada 30 min antes da DAV ou clonidina. ^a p<0.01 vs veículo; ^b p<0.05 vs. clonidina; ^c p<0,05 vs DAV (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.15 Papel dos receptores opióides no efeito gastroprotetor do lupeol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol

O tratamento dos animais com lupeol (30 mg/kg, v.o.) ou morfina (5 mg/kg, i.p.) reduziu de maneira significativa ($p < 0,001$) a lesão gástrica induzida pelo etanol ($15,35 \pm 2,45 \text{ mm}^2$ e $4,62 \pm 1,02 \text{ mm}^2$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle veículo ($28,10 \pm 2,24 \text{ mm}^2$). O pré-tratamento com naloxona (2 mg/kg, s.c.) reverteu significativamente ($p < 0,05$) a gastroproteção da morfina ($21,72 \pm 3,87 \text{ mm}^2$), mas não do lupeol ($16,81 \pm 2,78 \text{ mm}^2$) (**Figura 13**).

6.16 Papel dos receptores opióides no efeito gastroprotetor da DAV em modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

O tratamento dos animais com DAV (10 mg/kg, i.p.) ou morfina (5 mg/kg, i.p.) produziu uma redução significativa ($p < 0,001$) na lesão gástrica induzida pelo etanol ($19,12 \pm 2,91 \text{ mm}^2$ e $7,98 \pm 1,51 \text{ mm}^2$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle veículo ($35,06.86 \pm 3,94 \text{ mm}^2$). O pré-tratamento com naloxona (2 mg/kg, s.c.) reverteu significativamente ($p < 0,05$) a gastroproteção da morfina ($23,92 \pm 4,23 \text{ mm}^2$), mas não da DAV ($20,48 \pm 3,72 \text{ mm}^2$) (**Figura 14**).

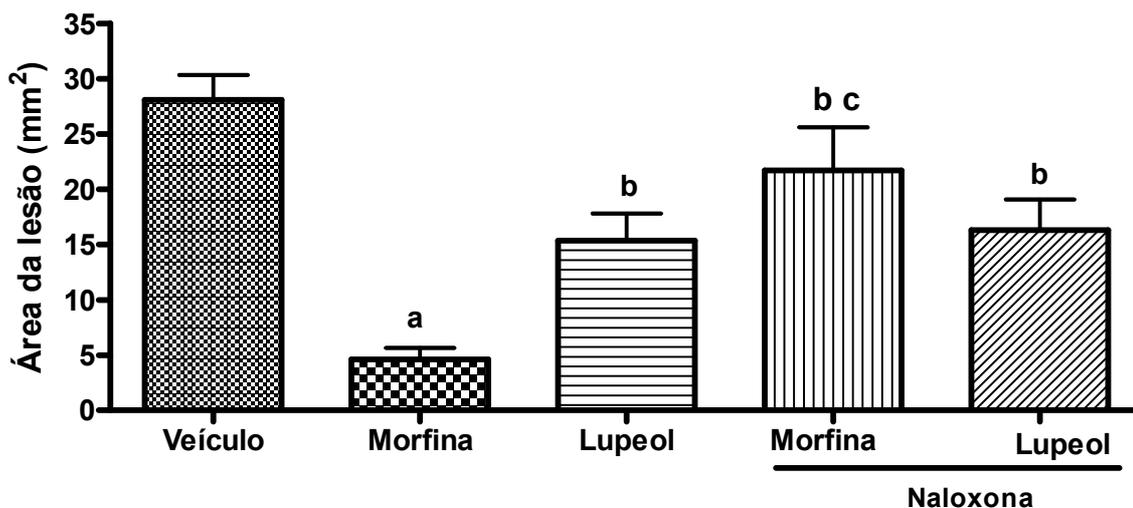


Figura 13. Papel dos receptores opióides no efeito gastroprotetor do lupeol. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da área de lesão gástrica (n=8). Os animais foram tratados com veículo (2% de Tween 80 em salina, v.o.), lupeol (30 mg/kg, v.o.) ou morfina (5 mg/kg, i.p.) 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes da administração do etanol absoluto (0,2ml/animal, v.o.). A naloxona (2 mg/kg, s.c.) foi administrada 20 min antes do lupeol ou morfina. ^a $p < 0.001$ vs veículo; ^b $p < 0.05$ vs. veículo; ^c $p < 0,05$ vs morfina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

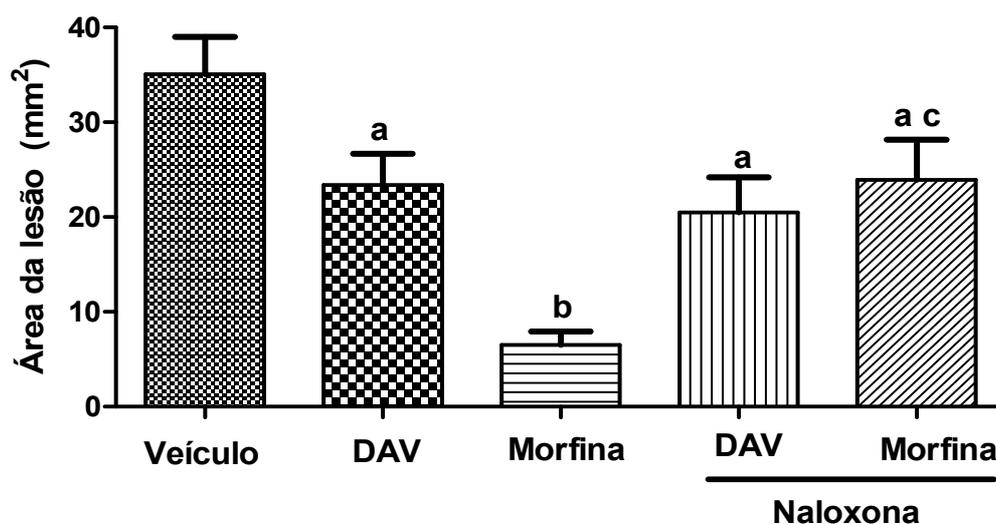


Figura 14. Papel dos receptores opióides no efeito gastroprotetor da DAV. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da área de lesão gástrica (n=8). Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, i.p.), DAV (10 mg/kg, i.p.) ou morfina (5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da administração de etanol absoluto (0,2ml/animal, v.o.). A naloxona (2 mg/kg, s.c.) foi administrada 30 min antes da DAV ou morfina. ^ap<0.05 vs veículo; ^bp<0.001 vs. veículo; ^cp<0,05 vs morfina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.17 Efeito do Lupeol sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em ratos

O tratamento com lupeol (30 mg/kg), administrado por via intraduodenal, em ratos com piloro ligado por 4 horas, não alterou o volume secretório gástrico ($1,20 \pm 0,10\text{mL}$), quando comparado ao veículo ($1,30 \pm 0,17\text{mL}$). A cimetidina (100 mg/kg), um conhecido antagonista H_2 , produziu uma diminuição significativa no volume ($0,83 \pm 0,09\text{mL}$) em relação ao veículo.

O lupeol (30 mg/kg) entretanto inibiu significativamente ($p < 0,05$) a acidez total gástrica ($10,83 \pm 0,83 \mu\text{Eq} [\text{H}^+]/\text{h}$) em relação ao grupo tratado com veículo ($25,58 \pm 3,84 \mu\text{Eq} [\text{H}^+]/\text{h}$) o que também ocorreu com a administração de cimetidina (100 mg/kg), que reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) a acidez ($13,33 \pm 1,05 \mu\text{Eq} [\text{H}^+]/\text{h}$), quando comparada ao veículo (**Tabela 11**).

6.18 Efeito da DAV sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em ratos

A administração intraduodenal da DAV (10 mg/kg), em ratos com piloro ligado por 4 horas, não alterou significativamente o volume secretório gástrico ($1,86 \pm 0,24 \text{mL}$), quando comparado ao veículo ($1,70 \pm 0,24 \text{mL}$).

O tratamento com DAV, entretanto foi capaz de inibir, significativamente ($p < 0,05$), a acidez total gástrica ($8,33 \pm 0,83 \mu\text{Eq} [\text{H}^+]/\text{h}$) em relação ao grupo veículo ($12,50 \pm 1,33 \mu\text{Eq} [\text{H}^+]/\text{h}$). Cimetidina (100 mg/kg), um conhecido antagonista H_2 , reduziu significativamente ($p < 0,05$) o volume secretório gástrico ($0,65 \pm 0,12 \text{mL}$) e a acidez gástrica ($6,07 \pm 0,50 \mu\text{Eq} [\text{H}^+]/\text{h}$) em comparação com o veículo (**Tabela 12**).

Tabela 11. Efeito do lupeol e cimetidina sobre o volume secretóriogástrico e acidez gástrica total em ratos com piloro ligado.

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume Secretório Gástrico (mL)	Acidez Total Gástrica ($\mu\text{Eq [H+]/h}$)
Controle (veículo)	-	1,30 \pm 0,17	25,58 \pm 3,84
Lupeol	30	1,20 \pm 0,10	10,83 \pm 0,83*
Cimetidina	100	0,83 \pm 0,09*	13,33 \pm 1,05*

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais do volume secretório gástrico (mL) e da acidez gástrica total ($\mu\text{Eq [H+]/h}$). Veículo (2% de Tween 80 em salina 0,9%), lupeol (30 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) foram administrados, por via intraduodenal, imediatamente após a ligação do piloro. Os animais foram sacrificados 4 horas após a ligação do piloro. * $p < 0,05$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul)

Tabela 12. Efeito do DAV e cimetidina sobre o volume secretório gástrico e acidez gástrica total em ratos com piloro ligado.

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume Secretório Gástrico (mL)	Acidez Total Gástrica ($\mu\text{Eq [H+]/h}$)
Controle (veículo)	-	1,70 \pm 0,24	12,50 \pm 1,33
DAV	10	1,86 \pm 0,24	8,33 \pm 0,83*
Cimetidina	100	0,65 \pm 0,12*	6,07 \pm 0,50*

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais do volume secretório gástrico (mL) e da acidez gástrica total ($\mu\text{Eq [H+]/h}$). Veículo (salina 0,9%), DAV (10 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) foram administrados, por via intraduodenal, imediatamente após a ligação do piloro. Os animais foram sacrificados 4 horas após a ligação do piloro. * $p < 0,05$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.19 Efeito do tratamento com lupeol sobre a motilidade intestinal de camundongos

Nos animais tratados com veículo, o carvão ativado percorreu $61,14 \pm 2,73\%$ do intestino. A administração de lupeol nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg não causou alteração significativa no trânsito intestinal ($59,60 \pm 2,73$; $55,60 \pm 2,91$; $54,41 \pm 4,85\%$, respectivamente) quando comparado ao veículo. A loperamida (5 mg/kg, i.p.) foi capaz de diminuir significativamente este parâmetro ($19,09 \pm 2,77\%$) em relação ao veículo **(Figura 15)**.

6.20 Efeito do tratamento com DAV sobre o trânsito intestinal em camundongos

Nos animais tratados com veículo o carvão ativado percorreu $70,79 \pm 1,11\%$ do intestino dos animais. A administração de DAV nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg reduziu significativamente o percentual percorrido pelo marcador ($29,75 \pm 3,55$; $21,85 \pm 2,26$; $15,87 \pm 2,85\%$ respectivamente) quando comparado ao veículo. A loperamida (5 mg/kg, i.p.) também diminuiu de forma significativa ($16,65 \pm 1,55\%$) o trânsito intestinal em relação ao veículo **(Figura 16)**.

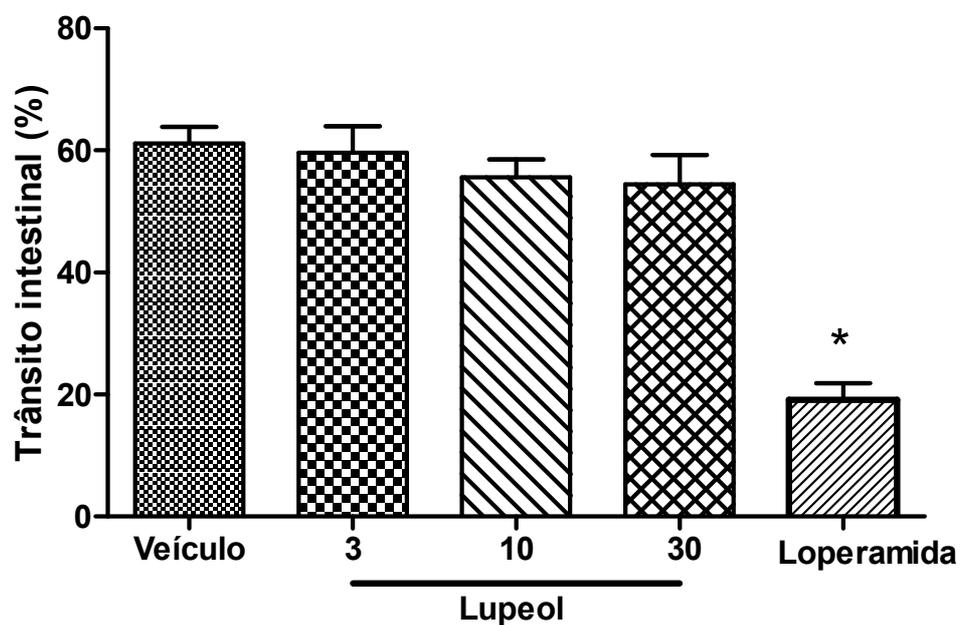


Figura 15. Efeito do tratamento com lupeol no trânsito intestinal de camundongos. Veículo (2% de Tween 80 em salina 0,9%,v.o.), lupeol (3, 10 e 30 mg/kg, v.o) e loperamida (5 mg/kg, i.p) foram administrados 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes da administração do carvão. Os animais foram sacrificados 30 min após a administração do carvão. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do percentual da distância percorrida pelo carvão (n=8). * $p < 0,05$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

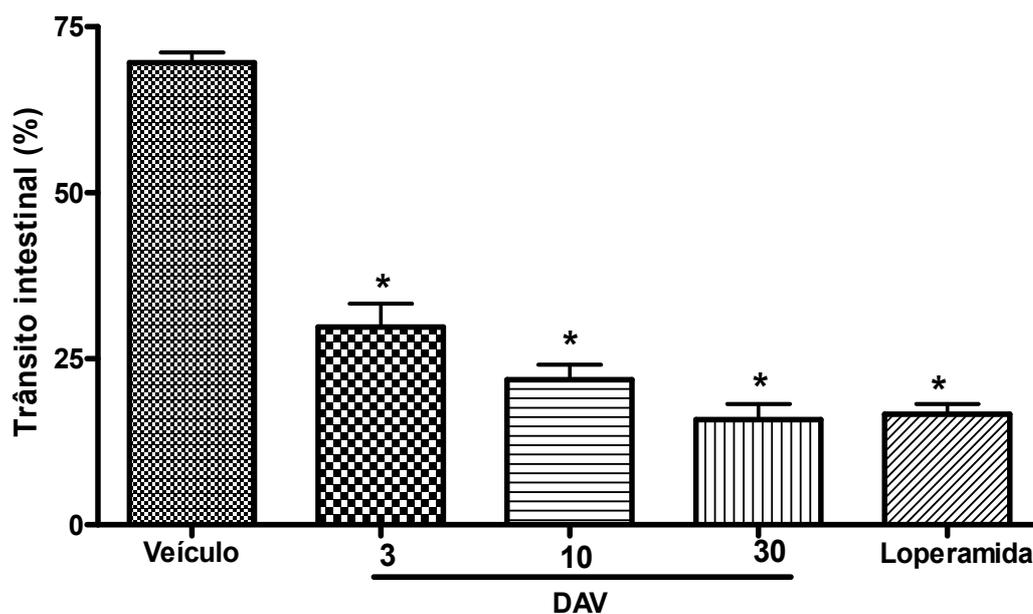


Figura 16. Efeito do tratamento com DAV no trânsito intestinal de camundongos. Veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) e loperamida (5 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do carvão. Os animais (n=8/grupo) foram sacrificados 30 minutos após a administração do carvão. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do percentual da distância percorrida pelo carvão. * $p < 0,05$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.20.1 Efeito do tratamento com DAV sobre o trânsito intestinal de camundongos – participação de receptores opióides

Nos animais tratados com veículo o carvão ativado percorreu $69,58 \pm 1,53\%$ do intestino dos animais. A administração de DAV na dose de 10 mg/kg diminuiu significativamente ($18,02 \pm 1,56\%$) o trânsito intestinal quando comparado ao veículo. Este efeito não foi revertido pelo tratamento com naloxona ($18,72 \pm 0,86\%$). O tratamento com loperamida, um conhecido agonista opióide, também diminuiu significativamente o trânsito intestinal ($17,20 \pm 1,78\%$), este efeito entretanto foi revertido pelo pré-tratamento com naloxona ($67,19 \pm 0,90\%$) (**Figura 17**).

6.20.2 Efeito do tratamento com DAV sobre o trânsito intestinal normal de camundongos – participação de receptores alfa₂ adrenérgicos

Nos animais tratados com veículo o carvão ativado percorreu o $71,53 \pm 2,35\%$ do intestino dos animais. A administração de DAV na dose de 10 mg/kg diminuiu significativamente ($29,77 \pm 4,10\%$) o trânsito intestinal quando comparado ao veículo. Este efeito não foi revertido pelo tratamento com Ioimbina ($23,50 \pm 3,07\%$). O tratamento com clonidina, um conhecido agonista alfa₂ adrenérgico, também diminuiu significativamente o trânsito intestinal ($29,77 \pm 4,10\%$). Este efeito, entretanto foi revertido pelo pré-tratamento com ioimbina ($67,55 \pm 4,20\%$) (**Figura 18**).

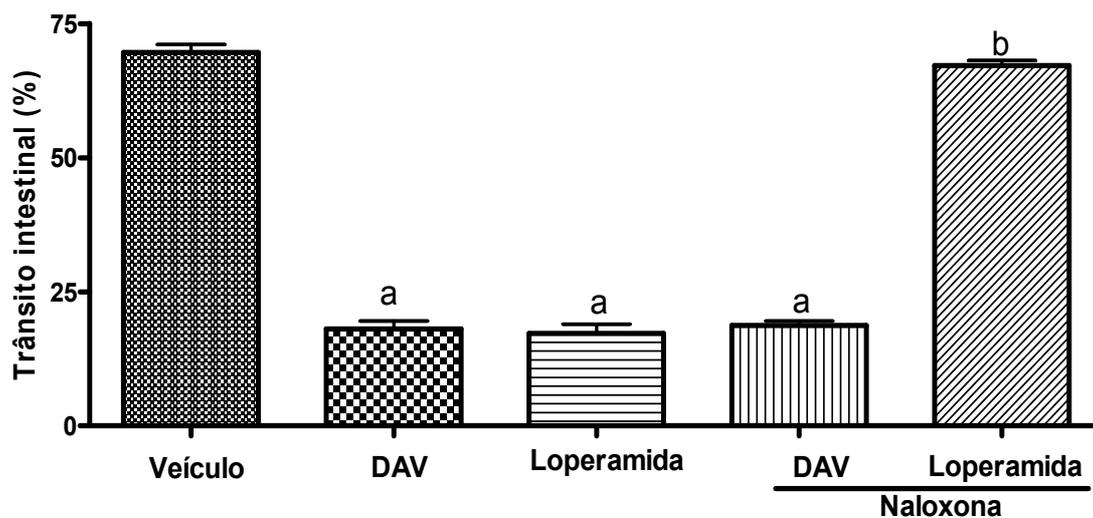


Figura 17. Efeito do tratamento com DAV no trânsito intestinal de camundongos: participação de receptores opióides. Veículo (salina 0,9%), DAV (10 mg/kg,i.p.) e loperamida (5 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do carvão. Os animais (n=8/grupo) foram sacrificados 30 minutos após a administração do carvão. A naloxona foi administrada 20 min antes de DAV e loperamida. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do percentual da distância percorrida pelo carvão. ^a $p < 0,05$ vs veículo; ^b $p < 0,05$ vs loperamida (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

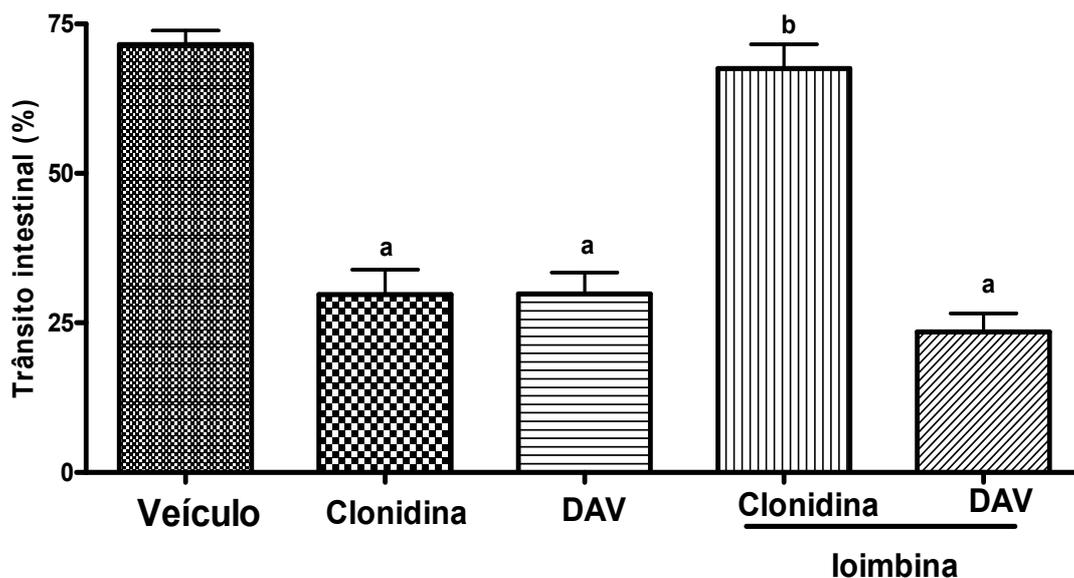


Figura 18. Efeito do tratamento com DAV no trânsito intestinal de camundongos: participação de receptores α_2 adrenérgicos. Veículo (salina 0,9%), DAV (10 mg/kg, i.p.) e clonidina (1 mg/kg, s.c.) foram administrados 30 min antes do carvão. Os animais ($n=8$ /grupo) foram sacrificados 30 minutos após a administração do carvão. A ioimbina foi administrada 20 min antes de DAV e clonidina. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do percentual da distância percorrida pelo carvão. ^a $p < 0,05$ vs veículo; ^b $p < 0,05$ vs clonidina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.21 Efeito do tratamento com DAV sobre o trânsito estimulado por óleo de rícino em camundongos

Nos animais tratados com veículo o tempo para o aparecimento das fezes marcadas com carvão ativado foi de $42,54 \pm 3,21$ min. A administração de DAV na dose de 10 mg/kg significativamente aumentou este tempo ($150,10 \pm 13,37$ min) quando comparado ao veículo. O tratamento com loperamida, um agonista opióide, usado como controle positivo, também aumentou significativamente o tempo de aparecimento do marcador nas fezes ($178,80 \pm 0,78$ min) (**Tabela 13**).

Tabela 13. Efeito do tratamento com DAV no trânsito intestinal estimulado com óleo de rícino em camundongos

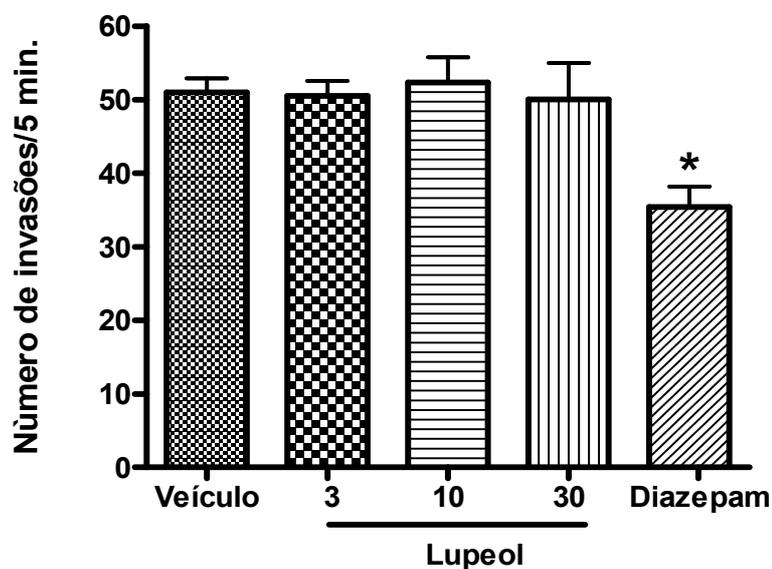
Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo para aparecimento do marcador nas fezes (min)
Veículo	-	$42,54 \pm 3,21$
DAV	10 mg/kg	$150,10 \pm 13,37^*$
Loperamida	5 mg/kg	$178,80 \pm 0,78^*$

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do tempo de aparecimento do marcador (carvão ativado) nas fezes. Os animais foram tratados com veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (10 mg/kg, i.p.) e loperamida (5mg/kg, i.p.) 30 min antes da administração de óleo de rícino (0,4ml/animal, v.o.). O carvão ativado foi administrado 10 min após o óleo de rícino. Os animais (n=8/grupo) foram sacrificados 30 minutos após a administração do carvão. * $p < 0,05$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.22 Efeito da administração de lupeol e DAV na atividade locomotora dos animais no campo aberto

O parâmetro analisado neste teste foi à atividade locomotora espontânea (ALE), caracterizada pelo número de invasões. Os animais tratados com o lupeol (3, 10 e 30 mg/kg) não apresentaram nenhuma alteração neste parâmetro ($50,50 \pm 2,04$; $52,33 \pm 3,39$; $50,00 \pm 4,90$ no. de invasões/5min, respectivamente) em relação ao veículo ($51,00 \pm 1,91$ no. de invasões/5min) (**Figura 19A**). Enquanto a administração de DAV (3, 10 e 30 mg/kg) em todas as doses testadas produziu uma significativa redução da ALE ($24,50 \pm 3,40$; $4,67 \pm 1,43$; $3,57 \pm 2,07$ no. de invasões/5min), com relação ao veículo ($54,78 \pm 1,78$ no. de invasões/5min) (**Figura 19B**). O diazepam (2mg/kg, i.p.), usado como droga padrão, reduziu significativamente a ALE para $35,40 \pm 2,77$ o número de invasões/5min (**Figura A**) e para $41,56 \pm 2,91$ no. de invasões/5min (**Figura B**).

A



B

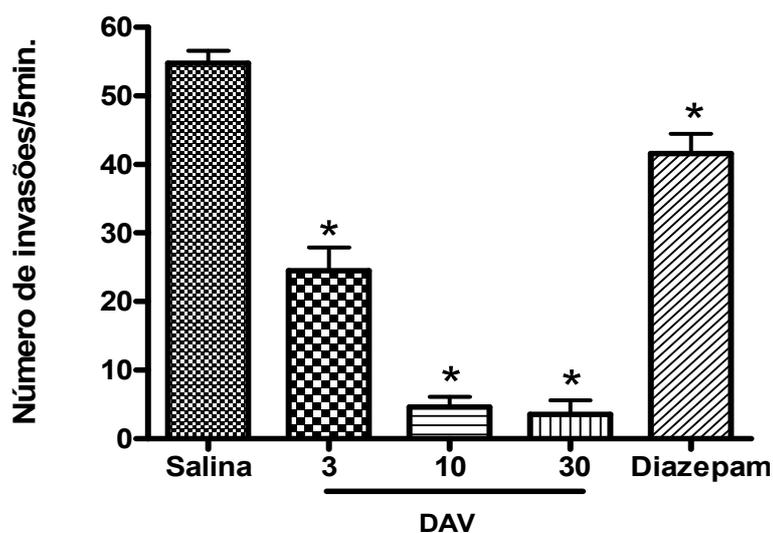


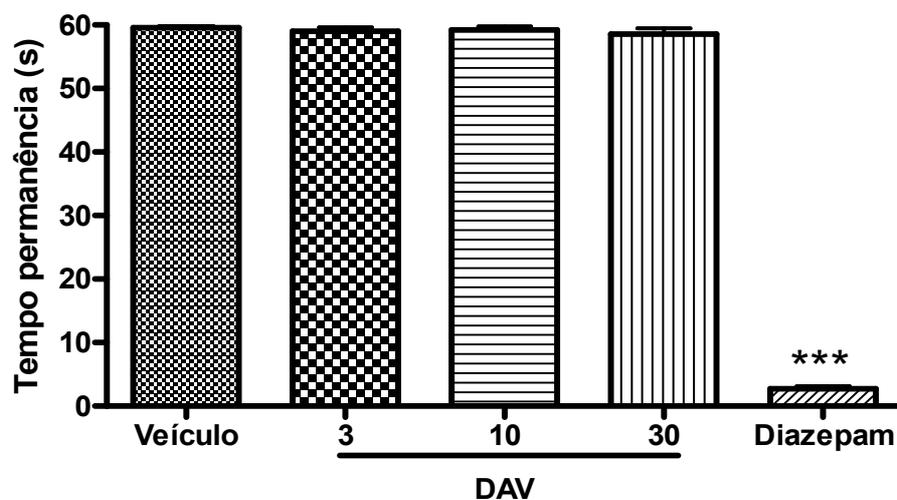
Figura 19. Efeito do Lupeol e da DAV sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto. **A.** Veículo (2% Tween 80 em salina 0,9%,v.o.), lupeol (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do início do experimento. **B.** Veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do início do experimento. Os valores expressam a média \pm E.P.M do número de invasões durante 5 minutos (n=10). * $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.23 Efeito da administração de DAV na coordenação motora dos animais no teste do Rota Rod.

A administração intraperitoneal de DAV (3, 10 e 30mg/kg) não alterou a permanência dos animais no aparelho de *Rota rod* ($59,00 \pm 0,63$; $59,20 \pm 0,58$ e $58,60 \pm 0,87$ s, respectivamente) quando comparado ao veículo ($59,06 \pm 0,40$ s). O diazepam (2mg/kg,i.p.), usado como controle positivo, reduziu de forma significativa o tempo de permanência dos animais na barra ($2,80 \pm 0,37$ s) quando comparado ao veículo (**Figura 20A**).

A administração intraperitoneal de DAV (3, 10 e 30mg/kg) reduziu de forma significativa o número de quedas dos animais no aparelho de *Rota rod* ($0,60 \pm 0,24$; $0,40 \pm 0,24$ e $0,20 \pm 0,20$ quedas, respectivamente) em relação ao controle ($1,40 \pm 0,23$ quedas). O diazepam aumentou significativamente o número de quedas ($2,80 \pm 0,20$ quedas) em relação ao controle (**Figura 20B**).

A



B

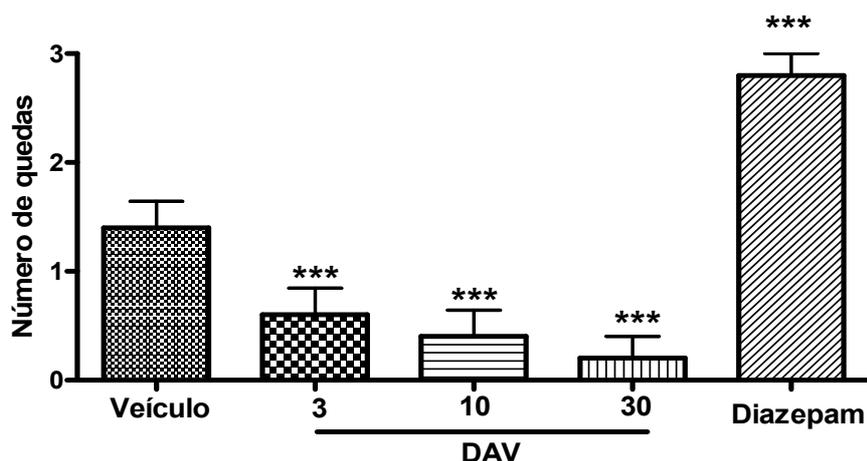


Figura 20. Efeito da DAV no teste do *Rota rod*. **A.** Efeito da DAV sobre o tempo de permanência dos animais no teste do *Rota rod*. Os valores expressam a média \pm E.P.M do tempo de permanência dos animais na barra durante 2 minutos ($n = 10$). **B.** Efeito da DAV sobre o número de quedas dos animais no teste do *Rota rod*. Os valores expressam a média \pm E.P.M do número de quedas dos animais durante 2 minutos ($n = 10$). Veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do início do experimento. *** $p < 0,001$ vs veículo; *** $p < 0,001$ vs DAV (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

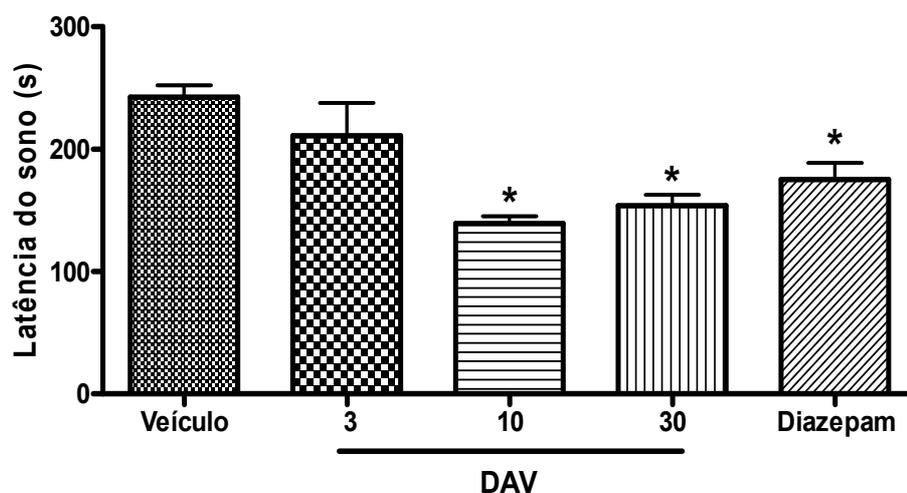
6.24 Efeito da administração de DAV sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital

Neste experimento foram avaliados dois parâmetros, o tempo de latência do sono (s), que corresponde ao tempo que o animal leva para adormecer e a duração total do sono (min).

Apenas as doses de 10 e 30 mg/kg, i.p., reduziram significativamente a latência do sono dos animais ($139,00 \pm 6,19$ e $153,80 \pm 8,10$ s, respectivamente) em relação ao grupo tratado com veículo ($242,60 \pm 9,40$ s). O diazepam, usado como controle positivo, produziu uma diminuição da latência do sono ($175,00 \pm 13,92$ s) quando comparado ao veículo (**Figura 21A**).

DAV (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente a duração do sono ($60,50 \pm 8,21$; $72,43 \pm 5,01$ e $80,67 \pm 1,20$ min) em relação ao grupo veículo ($49,00 \pm 3,66$ min). O diazepam (2mg/kg,i.p.), usado como controle positivo, produziu um aumento na duração do sono ($115,30 \pm 12,66$ min) quando comparado ao veículo (**Figura 21B**).

A



B

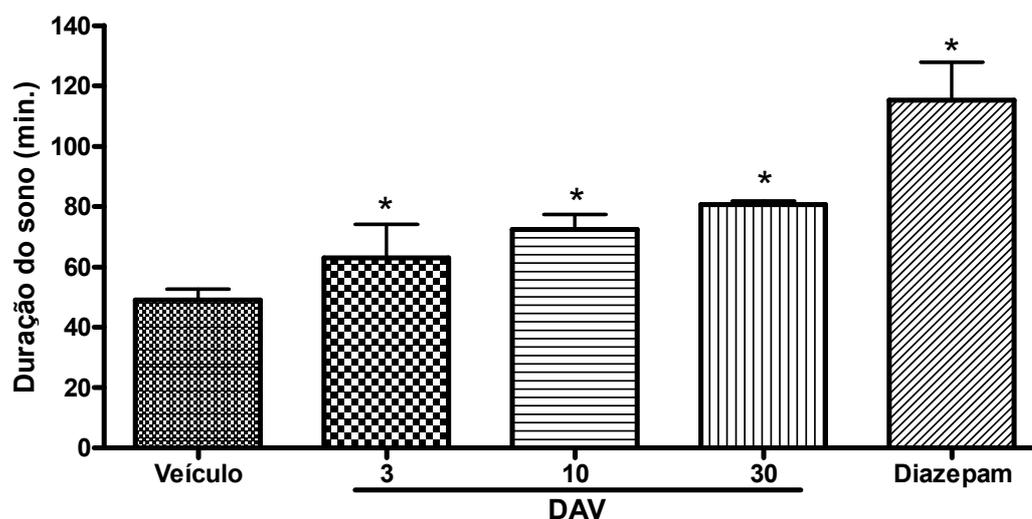


Figura 21. Efeito da DAV sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital. **A.** Efeito da DAV sobre a latência, em segundos, do sono induzido por pentobarbital. Os valores expressam a média \pm E.P.M da latência do sono (s) ($n=10$). **B.** Efeito da DAV sobre a duração do sono, em minutos, induzido pelo pentobarbital. Os valores expressam a média \pm E.P.M do tempo total de sono (min) ($n=10$). Veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) e diazepam (2 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do início do experimento. * $p<0,05$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6.25 Efeito do tratamento com DAV no teste de suspensão da cauda.

O tratamento intraperitoneal com DAV apenas nas doses de 10 e 30 mg/kg promoveu um aumento significativo no tempo de imobilidade dos animais no teste da suspensão da cauda ($176,20 \pm 8,47$; $189,5 \pm 5,33$ s, respectivamente) em relação ao grupo tratado com veículo ($135,00 \pm 7,32$ s). A administração de cloridrato de imipramina (30 mg/kg, i.p.), usado como droga padrão reduziu o tempo de imobilidade dos animais ($34,20 \pm 3,73$ s) em relação ao grupo veículo (**Figura 22**).

6.26 Efeito da administração da DAV no tempo de permanência na barra no teste da catalepsia

A administração de DAV, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, aumentou de maneira significativa o tempo de permanência dos animais na barra, com medianas de 2 (2-3); 3 (2-4) e 4 (2-4), respectivamente em relação ao grupo tratado com veículo cuja mediana foi 0,50 (0-1) (**Figura 23A**). O lupeol nas doses utilizadas de 3, 10 e 30mg/kg, v.o., apresentou medianas de 0,5 (0-1) para todas as doses não diferindo do veículo (**Figura 23B**). O haloperidol (1mg/kg, i.p.) aumentou de forma significativa o tempo de permanência dos animais na barra apresentando mediana 3 (2-4).

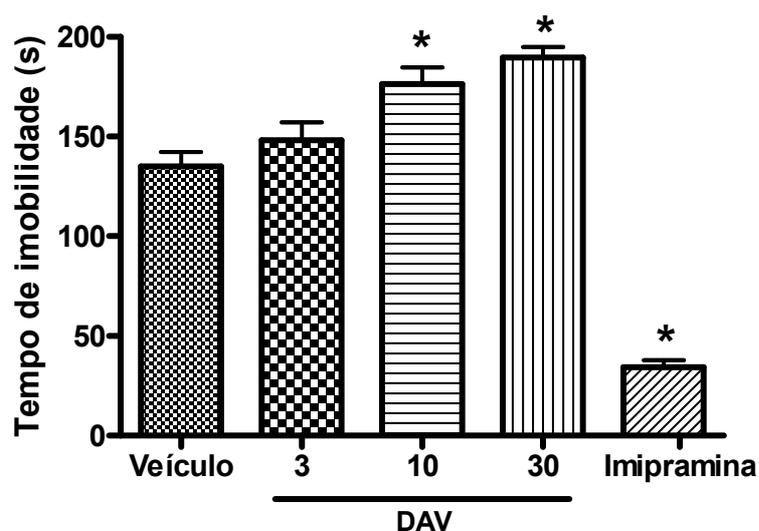
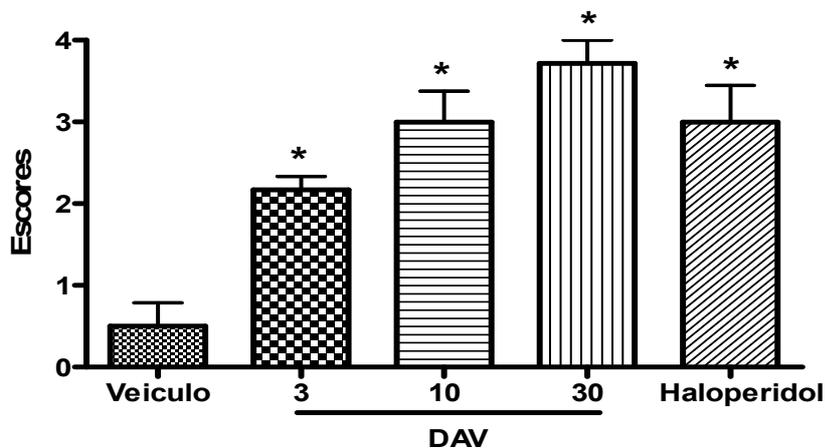


Figura 22. Efeito da DAV sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste da suspensão da cauda. Veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.), ou Imipramina (30 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 minutos antes dos experimentos. Os valores expressam a média \pm E.P.M do tempo de imobilidade (s) dos animais durante 5 minutos (n =10). * $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

A



B

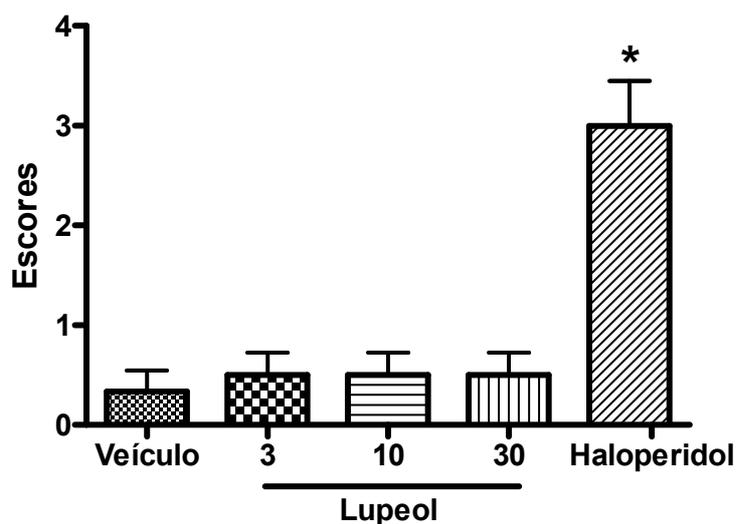


Figura 23. Efeito da DAV no teste da catalepsia. **A.** Efeito da DAV sobre o tempo de permanência dos animais na barra no teste de catalepsia. Veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) e haloperidol (1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do início do experimento. **B.** Efeito do lupeol sobre o tempo de permanência dos animais na barra no teste de catalepsia. Veículo (2% Tween em salina 0,9%, v.o.), lupeol (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) e haloperidol (1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes do início do experimento. Os valores estão expressos como a mediana (mínimo – máximo). * $p < 0,05$ vs veículo (Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn).

6.27 Efeito do tratamento com DAV na hiperlocomoção induzida por anfetamina em camundongos

A administração de anfetamina (5 mg/kg, s.c.) aumentou de forma significativa a locomoção dos animais ($89,60 \pm 13,31$ invasões/5 min) quando comparado aos animais que receberam apenas o veículo ($55,00 \pm 2,20$ invasões/5 min). O pré-tratamento dos animais com DAV (10 mg/kg, i.p.) ou haloperidol (1mg/kg, i.p.) 30 min antes da administração de anfetamina (2 mg/kg, s.c.) foi capaz de reduzir de forma significativa a hiperlocomoção induzida pela anfetamina ($46,80 \pm 6,46$ e $16,40 \pm 2,25$ invasões/5 min, respectivamente) (Figura 24).

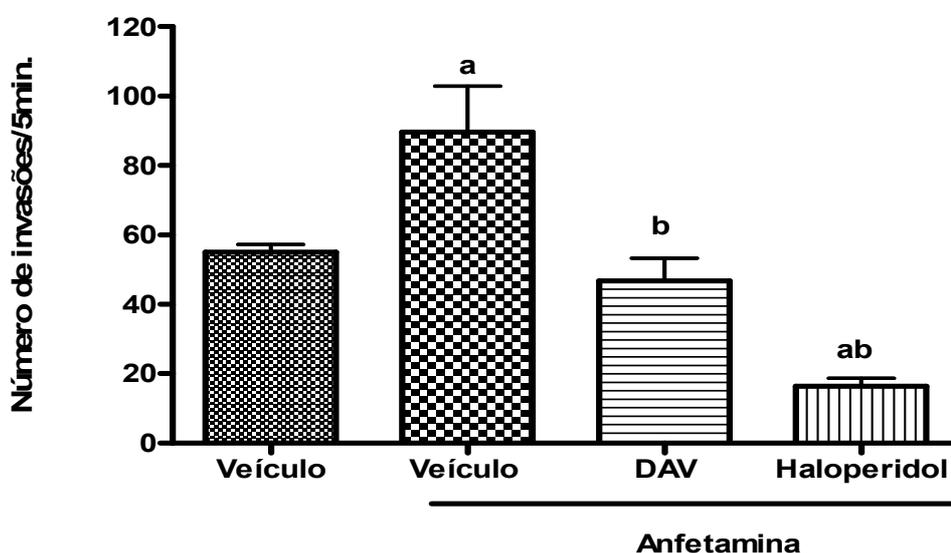


Figura 24 - Efeito da DAV sobre a hiperlocomoção induzida por anfetamina em camundongos. Anfetamina (2 mg/kg,s.c.) foi administrada 20 minutos antes de veículo (salina 0,9%, i.p.), DAV (10 mg/kg, i.p.) e haloperidol (1 mg/kg, i.p.). Um grupo tratado apenas com veículo foi incluído no estudo. Os valores expressam a média \pm E.P.M do número de invasões durante 5 minutos (n =10). ^a $p < 0,001$ vs veículo sem anfetamina; ^b $p < 0,05$ vs veículo com anfetamina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

7 DISCUSSÃO

Embora haja um extensivo uso da *Cenostigma macrophyllum* na medicina popular para tratar distúrbios gastrointestinais, não encontramos na literatura relatos de estudos científicos para dar suporte ao uso tradicional.

Os estudos químicos da espécie identificaram nas cascas a presença de lupeol, um triterpeno pentacíclico e da dilactona do ácido valonéico (DAV) como os constituintes majoritários (SILVA, 2006a). Assim este estudo foi realizado para caracterizar farmacologicamente os efeitos gastrointestinais e comportamentais destes dois compostos em modelos experimentais.

Inicialmente avaliamos a atividade gastroprotetora do lupeol e da DAV, utilizando um agente necrotizante (etanol 96%) na indução de lesões gástricas agudas. Este modelo experimental de fácil execução é bastante difundido na investigação da atividade gastroprotetora de drogas (AJAIKUMAR *et al.*, 2005). A ação lesiva do etanol é resultante de sua ação direta na mucosa e como a gênese das lesões induzidas por etanol é de origem multifatorial (SZABO; TRIER; FRANKEL, 1981; UMAMAHESWARIM *et al.*, 2007; KHAZAEI M; SALEHI, 2006), nós analisamos alguns destes fatores para entender melhor os mecanismos de gastroproteção das drogas testes.

A administração do etanol pode resultar em alterações na permeabilidade da membrana com uma redução na resistência e modificação na secreção de íons H⁺ (VAZQUEZ-RAMIREZ *et al.*, 2006), pode ainda provocar uma diminuição da função da barreira muco bicarbonato e dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH), lesionando a mucosa principalmente devido aos danos vasculares e à diminuição do fluxo sanguíneo (REPETTO; LLESUY, 2002; SIEGMUND, 2003). A lesão causada na mucosa gástrica pela ingestão crônica ou aguda do etanol, pode estar associada também à geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), as quais produzem estresse oxidativo (REPETTO; LLESUY, 2002; KHAZAEIM; SALEHI, 2006).

O pré-tratamento dos animais por via oral com lupeol nas três doses estudadas protegeu a mucosa gástrica dos animais contra o aparecimento de lesões induzidas pelo etanol, sendo que a dose de 30mg/kg foi a mais efetiva demonstrando uma proteção de 71%, enquanto as doses de 3 e 10 mg/kg, ofereceram um percentual de 38 e 51%, respectivamente. Estes achados são consistentes com outros dados da literatura que relatam a atividade antiulcerogênica de triterpenos (ARRIETA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004a; SINGH *et al.*, 2008).

A DAV, administrada por via intraperitoneal também foi capaz de proteger a mucosa dos animais quanto aos danos produzidos por etanol nas três doses usadas, com a dose de 3mg/kg o percentual de proteção foi de 37%, na dose de 10mg/kg a proteção foi de 45% e na dose de 30mg/kg de 78%, isto também está de acordo com estudos de Tani *et al.* (1986); Haslam (1989); Ramirez; Roa (2003) e Khennouf *et al.* (2003b), que relataram o efeito gastroprotetor dos taninos, atribuído principalmente à sua atividade antioxidante e sua capacidade de formar complexos com proteínas.

Estudos experimentais têm demonstrado que a geração de radicais livres está associada à patogênese de lesões gástricas agudas induzidas por etanol. Os radicais livres participam no dano ou na injúria ao tecido, estimulando a peroxidação dos lipídios, provocando danos à membrana celular através da coagulação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (AL -SHABANAH *et al.*, 2000; LA CASA *et al.*, 2000). São encontrados na literatura alguns estudos mostrando a atividade antioxidante de resinas naturais ricas em triterpenos pentacíclicos e triterpenos isolados, tais como ácidos oleanólico, ursólico, glicirretínico, amirina e lupeol (OLIVEIRA *et al.*, 2004b; SHIRWAIKAR *et al.*, 2004; ASSIMOPOULOU *et al.*, 2005; SANCHEZ *et al.*, 2006). Considerando que a úlcera por etanol gera radicais livres e estes podem contribuir para a lesão gástrica, podemos sugerir que a atividade gastroprotetora do lupeol pode ser atribuída, em parte, à atividade antioxidante.

Radicais livres são produtos extremamente reativos, levando a danos oxidativos através da peroxidação lipídica. Estudos de Okuda *et al.*, (1989) relatam que elagitaninos, são capazes de inibir a peroxidação lipídica e essa inibição é mais efetiva que a de taninos com outras estruturas similares, o que contribui para o efeito gastroprotetor destas substâncias, já que existe uma alta correlação entre peroxidação lipídica e formação de úlcera gástrica (NOSALOVA *et al.*, 1989; SHIAN *et al.*, 2000). Bhattacharya *et al.*, 2002 mostraram que os taninos hidrolizáveis das frutas de *Emblica officinalis*, exibiram atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*. Como a DAV apresentou uma atividade antioxidante superior a rutina e ao ácido gálico, no teste do DPPH (SILVA *et al.*, 2006b), a gastroproteção pode ser resultante desta atividade.

Comprovada a atividade antiulcerogênica, resolvemos tentar elucidar os mecanismos envolvidos, assim avaliamos a participação dos grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH), do óxido nítrico (NO), das prostaglandinas, dos canais de potássio ATPdependentes, dos canais de cálcio, dos receptores alfa₂ adrenérgicos e dos receptores opióides neste efeito gastroprotetor.

A úlcera gástrica induzida por etanol ocorre predominantemente na porção glandular do estômago, sendo resultante de uma ação necrotizante direta e da redução dos fatores de defesa como secreção de bicarbonato e muco (RUJJANAWATE *et al.*, 2005). Além disso, o etanol, por sua propriedade de gerar EROs durante o curso do seu metabolismo, altera a homeostase redox, causando danos à estrutura e função celular, aumentando os níveis de peroxidação lipídica e reduzindo os níveis de glutathione reduzida na mucosa gástrica, pois a restauração destes níveis parece ser importante na gastroproteção (SALIM, 1990; KWIECIEŃ *et al.*, 2002; PUSHPAKIRAN *et al.*, 2004; CAMPOS, 2008).

O GSH é considerado o mais importante composto sulfidril intracelular, sendo seu envolvimento conhecido num grande número de processos funcionais celulares, principalmente quanto à sua participação em algumas reações de detoxificação. O GSH pode reagir diretamente com alguns compostos tóxicos, formando complexos ou então, participando como substrato em reações de conjugação. Intoxicação crônica com etanol resulta num aumento na formação de peróxidos lipídicos, favorecendo o consumo de GSH e sua oxidação para GSSG (glutathione oxidada) pela glutathione peroxidase (ALTOMARE *et al.*, 1988).

Os grupamentos sulfidrílicos participam da proteção da mucosa através de sua ligação aos radicais-livres (exercem um efeito antioxidante) e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco de maneira a impedir a sua dissociação. Esses grupamentos estão presentes na glutathione, uma substância endógena que, em sua forma reduzida, tem importância na redução do estresse oxidativo, por eliminar radicais livres, reduzir os peróxidos e se complexar com compostos eletrofílicos de maneira a proteger estruturas celulares protéicas, DNA e lipídeos, além de proteger a célula de outros produtos tóxicos (KLAASSEM *et al.*, 1985; HAYES; MCLELLAN, 1999; KIMURA *et al.*, 2001).

Na tentativa de determinar uma possível ação antioxidante gástrica do lupeol e da DAV, avaliamos os grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no modelo de úlcera induzida por etanol. Nossos resultados mostram que o etanol produziu uma diminuição nos níveis de NP-SH, o que está de acordo com dados de Pushpakiran *et al.* (2004) que também observaram esta redução nos níveis de GSH reduzida em ratos após ingestão de etanol. O tratamento dos animais com N-acetilcisteína (NAC, 300 mg/kg, i.p.), um doador de grupos sulfidrilas, reestabeleceu os níveis de NP-SH no estômago. O lupeol (30 mg/kg, v.o.) e a DAV (10 mg/kg, i.p.) também foram capazes de restaurar, não completamente, mas de maneira significativa, os níveis de NP-SH na mucosa gástrica, reduzidos após a administração de etanol absoluto. Esses resultados sugerem que a atividade antioxidante atribuída a estes compostos está envolvida na gastroproteção.

O óxido nítrico (NO) é uma substância vasoativa produzida principalmente pelas células endoteliais e é um vasoprotetor, atuando na manutenção do tônus vascular, na regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular, além de apresentar efeito antiproliferativo e antioxidante (DUSSE *et al.*, 2003).

Nas células do endotélio vascular, na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina produz o radical livre gasoso, NO, e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico-sintase (Kuo; Schroeder, 1995).

O NO tem um importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica, como regulador na secreção de muco (Brown *et al.*, 1993), vasodilatador produzindo aumento de fluxo sanguíneo local (Wallace; Miller, 2000) e inibidor da agregação de neutrófilos (Barnick *et al.*, 1997).

As vias enzimáticas produtoras de óxido nítrico são a NO-sintase neuronal (NOS_n), endotelial (NOS_e), constitutiva (NOS_c) e induzida (NOS_i), que tem sido caracterizadas no trato gastrointestinal. A forma constitutiva é encontrada no endotélio (NOS_e) e neurônio entérico (NOS_n) do trato gastrointestinal. A NOS_c mantém a barreira da mucosa intacta, enquanto a NOS_i, produz grande quantidade de NO causando danos. Portanto, a inibição específica da NOS_i é benéfica para a integridade da mucosa (Kubes; McCafferty, 2000).

Esse mecanismo protetor do NO pode ser devido a sua capacidade em aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa e estabilizar a influência dos mastócitos (ALICAN; KUBES, 1996). Entretanto, o excesso na produção de NO associado com estados inflamatórios é caracterizado pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função da barreira de muco. Assim, os níveis de produção de NO, a isoforma geradora de NO e o estado redox das células epiteliais podem determinar os efeitos do NO na permeabilidade e proteção da mucosa (SHAH *et al.*, 2004).

Com o intuito de verificar a possível participação do óxido nítrico no efeito gastroprotetor do lupeol e da DAV, foi utilizado o L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS. O L-NAME é hidrolisado em L-nitroarginina que inativa a NOS (PFEIFFER *et al.*, 1996). Segundo Nahavandi *et al.* (1999), o L-NAME aumenta e a L-Arginina diminui a quantidade e intensidade da lesão provocada por álcool no estômago de ratos.

Os dados obtidos nas lesões gástricas induzidas por etanol demonstram que o tratamento dos animais com L-NAME (20 mg/kg, i.p.) potencializou significativamente a área da lesão na mucosa gástrica, em relação ao tratamento com veículo. Tanto o lupeol (30 mg/kg), quanto a DAV (10 mg/kg), conseguiram inibir o aparecimento das lesões gástricas, e esse efeito gastroprotetor foi revertido com o pré-tratamento com L-NAME. De forma semelhante, observamos que a L-Arginina (600 mg/kg, i.p.) reduziu o percentual de área gástrica ulcerada, em comparação com o grupo veículo, e esse efeito também foi revertido no pré-tratamento com L-NAME. Assim, nossos resultados sugerem que o efeito das duas substâncias depende, pelo menos em parte, da presença de NO, pois a inibição da produção de NO endógeno reverteu seu efeito gastroprotetor.

As prostaglandinas endógenas têm um importante papel na manutenção da integridade da mucosa gástrica através da contínua secreção de bicarbonato (HCO_3^-) e produção de muco no estômago, via receptores de prostaglandina E dos subtipos 1, 2 e 3 (EP1, EP2 e EP3) (BROZOZOWSKI *et al.*, 2000; TAKEUCHI *et al.*, 2006). Além disso, as PGs atuam também na inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos e na manutenção da do fluxo sanguíneo durante a exposição ao agente lesivo (BATISTA *et al.*, 2004).

Após a administração oral de AINEs, ocorre uma redução dos níveis de trifosfato de adenosina (ATP) da mucosa gástrica em resposta ao dano mitocondrial, este fato constitui o primeiro evento na erosão da mucosa. As PGs, em especial a PGE2 e seus análogos, exercem ação protetora contra os danos diretos de agentes

necrotizantes gástricos estando, portanto, relacionadas à citoproteção (OLINDA et al., 2008; ROBERT et al., 1979).

Nossos resultados demonstram que o lupeol, a DAV e o análogo de PG, misoprostol, foram capazes de proteger a mucosa da lesão induzida por etanol. A indometacina, um inibidor não seletivo de ciclooxigenase (COX), foi capaz de reverter completamente o efeito da DAV, entretanto a proteção conferida pelo lupeol foi apenas parcialmente bloqueada por indometacina, sugerindo neste caso, a participação de outro mecanismo independente da inibição das PGs. Como a gastroproteção da DAV é sensível a indometacina e aquela provocada pelo lupeol é também em parte sensível, podemos sugerir um papel das PGs endógenas na gastroproteção conferida pelas substâncias.

Em estudos realizados por Fernandez *et al.* (2001), o lupeol significativamente reduziu a produção de PGE₂ de macrófagos A25187 estimulados *in vitro* e atenuou o edema de orelha induzido por acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA) *in vivo*. O TPA parece induzir a expressão de COX-2 por alterar a via de sinalização do NF-κB, bem como a expressão da ornitina descarboxilase (ODC) na pele de camundongos (PARK; LEE; HWANG., 2008). Portanto, a supressão do edema de orelha pelo lupeol talvez seja resultante da redução da formação de PGE₂. Assim o mecanismo anti-inflamatório do lupeol parece ser diferente dos demais anti-inflamatórios não esteroidais, pois, ao contrário da indometacina, o lupeol não demonstrou atividade ulcerogênica durante um longo tempo de uso (GEETHA; VARALAKSHMI, 2001), sugerindo que o mesmo não afeta a COX constitutiva no estômago.

Não encontramos na literatura relatos da DAV relacionados à sua ação sobre a COX, entretanto taninos hidrolisáveis e derivados como o ácido gálico são citados por possuir atividade inibitória preferencialmente sobre a COX₂ (LEE *et al.*, 2003).

O efeito gastroprotetor do lupeol (30 mg/kg) mostrou-se similar ao efeito do diazóxido (3 mg/kg), um ativador de canais de potássio sensíveis a ATP (K⁺_{ATP}). A gastroproteção conferida pela DAV também foi significativa. Esse efeito gastroprotetor das substâncias foi revertido pelo pré-tratamento com glibenclamida, um bloqueador de canais K⁺_{ATP}. Como a proteção proporcionada pelo lupeol e pela DAV é sensível a indometacina e ao L-NAME, é possível que as PGs endógenas e o NO estejam atuando como ativadores dos canais K⁺_{ATP}, o que contribui para melhorar a microcirculação gástrica, favorecendo a gastroproteção proporcionada por ambas as substâncias, pois já

é descrito na literatura essa interação entre NO, PGs e K^+_{ATP} (PESKAR *et al.*, 2002; HEEBA *et al.*, 2009).

Alguns estudos sugerem que a administração de etanol produz depleção do cálcio na mucosa gástrica, o que contribui para o surgimento das lesões. O uso do bloqueador de canais de cálcio verapamil, nestas lesões, é controverso e depende da dose utilizada. Alguns autores sugerem que o verapamil em doses de 2 a 5 mg/kg poderia acentuar o efeito lesivo do etanol sobre a mucosa (GLAVIN *et al.*, 1989; WONG *et al.*, 1991; OSTROWSKI *et al.*, 1993), enquanto outros defendem que o uso do bloqueador nas dose de 10 a 20mg/kg seria benéfico no tratamento das úlceras (GHANAYEM *et al.*, 1987; LYONS *et al.*, 1992).

O cloreto de cálcio ($CaCl_2$) é capaz de prevenir a depleção de cálcio gástrico. A capacidade do cálcio de diminuir os efeitos negativos do etanol na mucosa gástrica pode ser devido a seu efeito estabilizador da membrana (WEBER; BOHR, 1978). O cálcio pode também ligar-se a pontos específicos na membrana celular para reduzir a permeabilidade da membrana da mucosa gástrica e também reforçar a barreira mucosa (WEBER; BOHR, 1978; KOO *et al.*, 1986; WONG *et al.*, 1991; LUTNICKI *et al.*, 1992). Segundo Koo (1994) a secreção de bicarbonato é também induzida pela presença de cálcio, proporcionando assim um ambiente favorável para a cicatrização de úlceras.

Nossos dados demonstram que os tratamentos com lupeol (30 mg/kg), DAV (10 mg/kg) e cloreto de cálcio (50 mg/kg) protegem a mucosa gástrica dos animais das lesões gástricas induzidas por etanol. Esta proteção é revertida pelo pré-tratamento com verapamil (5 mg/kg), sugerindo que alterações nos níveis de cálcio gástrico podem estar intimamente relacionadas às lesões produzidas por etanol, assim é possível que o lupeol e a DAV similar ao $CaCl_2$, restaurem os níveis de cálcio na mucosa gástrica. De acordo com Takeuchi *et al.* (2006) os níveis de cálcio intracelular são importantes para a secreção de HCO_3^- via prostaglandinas.

Receptores alfa2-adrenérgicos pré-sinápticos são descritos na literatura por atuar na proteção de úlceras induzidas por indometacina, ácido acetilsalicílico, etanol e estresse (DEL SOLDATO, 1986; DI JOSEPH *et al.* 1987; KUNCHANDY *et al.* 1985; GYIRES *et al.* 2000 a,b,c). Os α_2 -receptores produzem efeitos gastroprotetores por múltiplos mecanismos que envolvem a inibição da secreção de ácido gástrico e da motilidade (GYIRES *et al.* 2000a; JAMES *et al.*, 2004). Estes efeitos ocorrem com a ativação de receptores α_2 pré-sinápticos no nervo vago que induziria a liberação de

substâncias protetoras endógenas como PGs e NO (BENET T et al., 1967; TANAKA et al., 1993) e com a inibição da liberação de acetilcolina (PATON; VIZI, 1969). Os receptores $\alpha 2$ - adrenérgicos possuem os subtipos $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$ sendo que o subtipo $\alpha 2A$ está mais envolvido com a inibição da secreção ácida e motilidade, enquanto os subtipos $\alpha 2B$ e $\alpha 2C$ são responsáveis pela gastroproteção (FULOP et al. 2005; MULLNER et al. 2001, 2002; GYIRES et al. 2000a).

Em nossos resultados tanto o lupeol (30 mg/kg), quanto a DAV (10mg/kg) foram capazes de reduzir as lesões induzidas por etanol de maneira significativa em relação ao controle, de forma similar a clonidina (0,05 mg/kg), um conhecido agonista $\alpha 2$ -adrenérgico. O efeito dos tratamentos com lupeol (30 mg/kg, v.o.), DAV (10mg/kg) e clonidina (0,05 mg/kg) foram revertidos pelo pré-tratamento dos animais com o antagonista de receptores adrenérgicos ioimbina (2 mg/kg, s.c.), sugerindo uma participação dos receptores $\alpha 2$ no efeito gastroprotetor do lupeol e da DAV. A clonidina é citada na literatura por induzir gastroproteção por mecanismos centrais e periféricos (GYIRES et al., 2000 c ; GYIRES et al., 2007).

Relatos da literatura citam o envolvimento dos receptores opióides na modulação da integridade da mucosa gástrica e em várias funções gastrointestinais, incluindo a motilidade e o transporte intestinal de fluidos e eletrólitos (GUYRES et al., 1997; GUYRES; RONAI, 2001). Segundo Gyres et al. (2000a) há uma interação entre receptores pré-sinápticos $\alpha 2$ -adrenérgicos e sistema opióide. Glass; Picket (2002) relatam que $\alpha 2A$ adrenoceptores foram encontrados em neurônios do trato solitário medial de ratos que contém receptores μ -opióide.

A gastroproteção proporcionada pela clonidina é revertida tanto pela ioimbina, quanto pela naloxona, indicando que sua ação depende de uma interação entre os sistemas opióide e alfa adrenérgicos (GYIRES et al.,2000c).

O nosso estudo demonstrou que o efeito gastroprotetor do lupeol (30mg/kg) e da DAV (10 mg/kg) contra a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos não é revertido pelo tratamento com naloxona (um antagonista não-seletivo de receptores opióides), o que sugere o não envolvimento dos receptores opióides no efeito gastroprotetor das substâncias.

Embora múltiplos fatores estejam envolvidos na patogênese da lesão induzida por etanol, o fator primário é a deficiência de NP-SH (glutathiona reduzida), seguido por uma deficiência na síntese de mediadores citoprotetores como PGs e NO. As EROs

geradas pelo etanol contribuem para a depleção de NP-SH causando um estresse oxidativo (TERANO *et al.*, 1989) e estimulação simpaticomimética (JATINEN *et al.*, 1995) que poderia alterar a síntese de PG e NO, afetando o fluxo sanguíneo na mucosa e a microcirculação (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001). A DAV e o lupeol possivelmente previnem o estresse oxidativo, conseqüentemente a depleção de NP-SH, favorecendo a gastroproteção.

As atividades anti-secretora e sobre a motilidade gastrointestinal do lupeol e da DAV também foram avaliadas para ambas as substâncias

A ligadura de piloro é um modelo utilizado na avaliação dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico (TOMA *et al.*, 2004), para inferir uma provável atividade anti-secretória e indicar efeito local e/ou sistêmico de algumas drogas (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2006). Este modelo promove aumento na secreção gástrica mediada por reflexos vago-vagais independentes das células G e células enterocromafins “like” (ECL) provavelmente por estimulação dos mecanorreceptores presentes na mucosa antral (BAGGIO *et al.*, 2003) e a utilização da via intraduodenal é importante para investigar a atividade do composto quando administrado por via sistêmica, evitando contato direto das substâncias com a mucosa gástrica dos animais (FARIA, 2009).

Com a ligadura de piloro nós avaliamos a acidez e o volume do suco gástrico e observamos que o tratamento intraduodenal com lupeol ou DAV não alterou o volume de secreção, entretanto ambas as substâncias foram capazes de reduzir a acidez. A cimetidina, usada como controle positivo foi capaz de reduzir tanto o volume quanto a acidez. Sendo o ácido considerado um fator importante no desenvolvimento das lesões agudas e crônicas (BASTAKI *et al.*, 2000), podemos considerar a diminuição da acidez produzida por ambas as substâncias um fator favorável ao processo de gastroproteção.

A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo e complexo, em que múltiplos fatores centrais e periféricos contribuem para uma meta comum, a secreção de íons H^+ pelas células parietais. Os fatores neuronais (acetilcolina), parácrinos (histamina) e endócrinos (gastrina) regulam a secreção de ácido. Seus receptores específicos (M_3 , H_2 e CCK_2 , respectivamente) localizam-se na membrana basolateral das células parietais no corpo e fundo gástricos. Nessas células o AMP cíclico e as vias dependentes de Ca^{2+} ativam a H^+ , K^+ -ATPase (a bomba de prótons), que efetua a troca de íons hidrogênio e potássio através da membrana celular parietal. Essa bomba gera o

maior gradiente iônico conhecido nos vertebrados, com um pH intracelular de cerca de 7,3 e um pH intracanalicular de cerca de 0,8 (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006).

De acordo com Muramaki *et al.* (1991; 1992), taninos como o ácido elágico e o ácido tânico apresentam atividade antiulcerogênica, ao menos em parte, devido à atividade antissecretória, a qual ocorreria pela inibição da H^+,K^+ -ATPase, possivelmente associada a propriedade dos taninos de precipitar proteínas. Quanto aos terpenos os dados da literatura diferem em função da substância, pois enquanto o ácido glicirretínico não demonstra alteração na secreção gástrica no modelo da ligadura de piloro o ácido centipédico, no mesmo modelo, reduz o volume secretório sem alterar o pH (YANO *et al.*, 1989; GUEDES, 2008)

A motilidade intestinal foi avaliada neste estudo pelo teste do carvão ativado e o tratamento com loperol não alterou o trânsito intestinal em nenhuma das doses utilizadas, entretanto a administração de DAV produziu uma significativa redução do trânsito normal em todas as doses testadas, de forma similar à loperamida usada como controle positivo. O efeito de DAV também foi estudado no modelo de trânsito estimulado por óleo de rícino. Neste modelo a DAV (10 mg/kg) e a loperamida (5 mg/kg) aumentaram de forma significativa o tempo para o aparecimento do marcador (carvão ativado) nas fezes. Os resultados demonstram que em ambos os modelos a DAV inibiu o trânsito intestinal o que está de acordo com o relatado para taninos na literatura (ADEYMI *et al.*, 2009; AMEBEOKU *et al.*, 2009). Estes efeitos também nos levam a sugerir uma possível atividade da DAV sobre o tônus muscular.

A estimulação do impulso vagal no trato gastrointestinal aumenta o tônus, a amplitude de contração e a atividade secretória no estômago e intestino. DAV reduziu a secreção ácida no estômago sem afetar o volume secretório no modelo da ligadura de piloro em ratos, efeito onde a atividade vagal desempenha um importante papel. Assim a inibição da atividade vagal talvez contribua para o efeito inibitório da DAV sobre o trânsito intestinal.

A indução de modificações no trânsito pelo óleo de rícino resulta da ação do ácido ricinoléico formado a partir da hidrólise de triglicerídeos presente no óleo, envolvendo o NO (UCHIDA *et al.*, 2000), PGs (SAITO *et al.*, 2002) e fatores ativadores de plaquetas (IZZO *et al.*, 1998). A administração prévia de DAV está associada com proteção contra a diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos, através da inibição do trânsito intestinal. Estes resultados sugerem que DAV talvez

possa ser usada em uma ampla variedade de distúrbios gastrointestinais associados com trânsito e secreções anormais.

A loperamida, usada como controle positivo, é um agente antidiarreico, com atividade em receptores μ opióides que age diminuindo a motilidade, aumentando o tônus do esfíncter anal, além de possuir atividade antissecretória (BRUTON; LAZO; PARKER, 2006). Como os resultados com a DAV foram semelhantes aos da loperamida resolvemos investigar também a participação dos receptores opióides na inibição do trânsito.

O tratamento com naloxona (1mg/kg) foi capaz de reverter os efeitos da loperamida sobre o trânsito intestinal, mas não os efeitos da DAV, o que nos sugere um mecanismo de ação independente da participação dos receptores opióides.

Dados de DOHERTY; HANCOCK (1983) demonstram que há uma participação dos receptores alfa adrenérgicos no trânsito intestinal e na diarreia. Com o intuito de verificarmos se o efeito da DAV na inibição do trânsito estaria relacionado a uma atividade nestes receptores, os animais foram pré-tratados com ioimbina, um conhecido antagonista de receptores alfa adrenérgico. Nossos resultados demonstraram que tanto a DAV quanto a clonidina diminuem o trânsito intestinal, entretanto a ioimbina só foi capaz de reverter o efeito da clonidina, indicando a não participação de receptores alfa adrenérgicos no mecanismo de inibição do trânsito promovido pela DAV.

De acordo com Osarenmwinda *et al.* (2009) a propriedade antidiarréica dos taninos se deve a um aumento da reabsorção de água e eletrólitos do cólon e/ou a inibição da motilidade gástrica.

Estudos na área de farmacologia comportamental permitem avaliar melhor a interação entre drogas e alterações comportamentais. Durante a administração da DAV observamos sedação, sonolência e apatia nos animais, diante disso resolvemos investigar a atividade desta substância em alguns modelos comportamentais.

Assim, realizamos uma investigação comportamental preliminar através dos testes da locomoção espontânea, rota rod e tempo de sono, para melhor caracterizar uma possível ação depressora da substância.

Estudos demonstram que muitas das drogas de atuação central influenciam a atividade motora dando uma indicação do nível de excitabilidade do SNC (MANSUR *et al.*, 1971), assim substâncias psicoestimulantes podem aumentar este parâmetro, enquanto outras substâncias podem reduzir esta atividade, devido às suas propriedades depressoras (MILLER *et al.*, 1989; VOGEL, 2002).

O teste do campo aberto é um modelo amplamente usado para avaliar a atividade motora e baseia-se na premissa de que roedores têm aversão a ambientes novos e abertos, utilizando o conceito de atividade exploratória para mensurar o grau de emocionalidade que o animal apresenta neste novo ambiente. O pressuposto básico é que, no intuito de explorar o ambiente o animal precisa locomover-se nele (BIRKE; ARCHER, 1973).

No presente trabalho a administração de lupeol nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg não causou alteração na atividade motora, entretanto a administração intraperitoneal de DAV nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg diminuiu significativamente esta atividade nos animais. Os resultados demonstram uma significativa influência do tratamento com DAV na atividade motora dos camundongos indicando sua atividade depressora. Este fato pode estar relacionado com uma sedação resultante da depressão (OZTURK *et al.*, 1996; PEREZ *et al.*, 1998). O diazepam, usado como droga padrão, na dose de 2 mg/kg também diminuiu a atividade locomotora, comprovando o seu potencial sedativo nesta dose.

A ação do diazepam se dá por interação com o complexo receptor GABA_A. Este receptor possui pelo menos seis sítios de ligação específicos, entre eles o sítio de ligação a drogas benzodiazepínicas (ex.: diazepam) e a barbitúricos, entre outras. Sabe-se também que a atividade exploratória pode ser alterada por drogas que atuam no sistema serotoninérgico e dopaminérgico (AGMO *et al.*, 1996; PRUT; BELZUNG, 2003).

Alguns agentes antipsicóticos como haloperidol e clozapina também prejudicam significativamente a locomoção espontânea em camundongos (MOREIRA; GUIMARÃES, 2005), refletindo a sua marcada atividade sedativa em humanos (PRETORIUS *et al.*, 2001).

A diminuição da locomoção espontânea pode ser influenciada por drogas que produzem relaxamento muscular (DUNHAM; MIYA, 1957). O teste de rota rod é amplamente usado para medir o desempenho da coordenação motora nos animais (SEDELIS et al., 2001) e, para descartar uma possibilidade de interferência na coordenação motora e no equilíbrio dos animais, utilizamos este teste.

No teste do rota rod a administração da DAV nas três doses utilizadas (3, 10 e 30 mg/kg) não demonstrou diferença significativa no tempo de permanência na barra giratória em relação ao grupo veículo, ao contrário do diazepam (2 mg/kg) que reduziu significativamente este tempo dos animais na barra e aumentou o número de quedas. Podemos inferir, portanto que a DAV não causa alteração na coordenação motora em doses capazes de promover uma ação depressora, sugerindo que a redução da ação locomotora observada, pode não ter sido exercida através do bloqueio neuromuscular periférico, mas preferivelmente os efeitos devem envolver neurônios que controlam atividade depressora central (ADZU et al., 2002a,b).

O teste da indução do sono por barbitúricos é um modelo experimental farmacológico clássico utilizado para avaliar drogas hipnóticas e sedativas (LI et al., 2007), parte do princípio de que drogas depressoras do SNC, em geral, reduzem a latência e/ou aumentam a duração do sono induzido por um barbitúrico (RILEY; SPINKS, 1958; MANDAL et al., 2001). Por outro lado, substâncias metabolizadas no fígado podem alterar os parâmetros registrados como consequência de uma interação farmacocinética inibindo a metabolização do pentobarbital e, conseqüentemente, aumentando o tempo de sono (GOULOUBKVOVA et al., 1998; LAPA et al., 2003; GYAMFI et al., 2000).

Muitos hipnóticos, ansiolíticos e antiepilépticos podem aumentar o tempo de sono induzido por pentobarbital (SILVA et al., 2007), enquanto drogas estimulantes, como cocaína e anfetaminas, diminuem a duração do sono (HASCOET ; BOURIN, 1998; PAINE; JACKMAN; OLMSTEAD, 2002). O prolongamento do sono pode envolver uma ativação do sistema inibitório gabaérgico (SIVAM et al., 2004).

A administração de DAV na dose de 10 mg/kg diminuiu a latência e prolongou a duração do sono induzido pelo pentobarbital. Não foram encontrados na literatura relatos demonstrando que taninos inibem especificamente enzimas CYP3A2 de ratos, equivalente a CYP3A4 humana, que metaboliza barbitúrico. Além disso, o fato da DAV diminuir a latência para início do sono reforça a idéia de uma ação central.

A droga padrão, diazepam 1mg/kg, um benzodiazepínico, que atua no seu sítio próprio no complexo receptor GABA_A causa o efeito hipnosedativo como esperado, reduzindo a latência e aumentando a duração do sono barbitúrico. Drogas que diminuem a transmissão dopaminérgica, como o haloperidol, também podem prolongar o sono por barbitúricos (YADAV; NADE, 2008).

Os dados obtidos para DAV nestes dois protocolos estão de acordo com Takahashi et al (1986) que relata que constituintes como taninos produzem uma ação depressora não específica no SNC, reduzindo a atividade motora e causando potencialização do sono por pentobarbital.

O teste de suspensão da cauda é amplamente usado para triagem de drogas com ação antidepressiva e é baseado no fato de que os animais quando colocados em uma situação de estresse inevitável desenvolvem, após uma tentativa inicial de fuga, um estado de imobilidade. Drogas antipsicóticas como haloperidol e clozapina e benzodiazepínicos (diazepam e clobazam) aumentam de maneira dose dependente a duração da imobilidade neste teste e podem indicar uma atividade depressora (CRYAN et al., 2005; SILVA et al., 2007). A administração de DAV nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg aumentou significativamente o tempo de imobilidade, confirmando os resultados anteriores que sugerem uma atividade depressora do SNC.

Em continuidade a avaliação dos efeitos da DAV sobre o SNC, resolvemos investigar se a mesma estaria atuando sobre o sistema dopaminérgico induzindo um estado de catalepsia nos animais.

A catalepsia é uma manifestação patológica caracterizada pela imobilidade em posturas não naturais com hipertonia muscular (KAPLAN *et al.*, 1997; KLEMM, 2001). O modelo da catalepsia é validado e muito utilizado pelos neurocientistas sendo modulado por vários neurotransmissores. Sabe-se que o bloqueio dopaminérgico dos receptores D₁ e D₂ tem papel importante neste comportamento e que drogas neurolépticas causam a catalepsia. Além da dopamina, sabe-se que há participação do aminoácido inibitório GABA, que regula a ação dopaminérgica no sistema extrapiramidal (gânglios da base) (SANBERG *et al.*, 1988; KLEM *et al.*, 1988; VASCONCELOS *et al.*, 2003).

A administração de DAV, nas doses de 3,10 e 30 mg/kg, induziu catalepsia nos animais, de forma similar ao controle positivo haloperidol que promove catalepsia através do bloqueio de receptores D₂ (CARROLL, 2000) e por uma atividade

secundária sobre o sistema opióide (LORENC-KOC *et al.*, 1996). Podemos assim sugerir que os efeitos da DAV sobre o SNC envolvem uma atuação em nível de sistema dopaminérgico.

A anfetamina é um agonista dopaminérgico indireto, pois causa a liberação neuronal de catecolaminas. Ela pode provocar várias alterações comportamentais, tais como o comportamento estereotipado, ou seja, atividades normais realizadas repetidas vezes, tal como cheirar, e também alterações da atividade motora, como aumento da locomoção (LIPSKA; WEINBERG, 2000; UMEZU; MORITA, 2003; RANG *et al.*, 2006). Esses efeitos estão relacionados à ativação dos sistemas mesolímbico e nigroestriatal (MORI *et al.*, 2006) e são bloqueados pelo tratamento com haloperidol, um antagonista de receptores dopaminérgicos.

Com intuito de verificar se o tratamento com DAV também produziria este bloqueio, os animais foram pré-tratados com anfetamina e em seguida com DAV e haloperidol. Nossos resultados demonstraram que ambas as substâncias foram capazes de reverter a hiperlocomoção por anfetamina, confirmando que o mecanismo de ação da DAV está relacionado à via dopaminérgica.

Em resumo, o resultado do presente trabalho demonstrou que tanto o lupeol quanto a DAV possuem efeitos gastroprotetores no modelo de úlcera por etanol. Estes efeitos parecem ser mediados por mecanismos antioxidantes relacionadas ao aumento de NP-SH, com a participação do NO, das PGs e de canais de K^+_{ATP} e cálcio. Isso validaria o uso feito pela população da espécie *Cenostigma macrophyllum* para úlceras.

A depressão do SNC observada com a administração de DAV deve ser considerada e neste sentido estudos mais aprofundados são necessários para melhor caracterizar o mecanismo envolvido nesta depressão.

8 CONCLUSÕES.

A investigação dos efeitos farmacológicos do lupeol e da DAV no trato gastrointestinal e em modelos comportamentais nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- O lupeol e a DAV são efetivos na proteção da mucosa gástrica frente à lesão aguda por etanol, por um mecanismo que envolve NP-SH, NO, PGs, ativação de canais K_{ATP} , Cálcio e receptores adrenérgicos, mas não receptores opióides.
- Em contraste com a cimetidina, um antagonista H_2 , que demonstra inibição do volume bem como da secreção ácida total na ligadura de piloro em ratos, o lupeol e DAV exercem somente efeito anti-secretório ácido sem mudanças no volume.
- O lupeol não altera o trânsito intestinal, enquanto a DAV inibe o trânsito em animais normais por mecanismo que não envolvem receptores adrenérgicos ou opióides. DAV também previne o trânsito estimulado pela administração oral de óleo de rícino.
- DAV demonstrou diminuição na locomoção espontânea motora no campo-aberto, potencializou o tempo de sono induzido por pentobarbital e aumentou o tempo da imobilização no teste da suspensão da cauda, sugerindo um efeito depressor no sistema nervoso central.
- O efeito depressor da DAV não está associado a um bloqueio neuromuscular, pois não alterou a performance dos animais no teste do rota rod.
- Associado com a depressão da atividade locomotora, a DAV induz catalepsia, tal efeito possivelmente envolve em parte dopamina, pois a DAV inibe a hiperlocomoção induzida por anfetamina.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABITOL, R. A. Doença ulcerosa péptica. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. **Disponível** <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em 13/02/10.

ADEYEMI, O. O.; AKINDELE, A. J.; OGUNLEYE, E. A. Evaluation of the antidiarrhoeal effect of *Sansevieria liberica* Gerome & Labroy (Agavaceae) root extract. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.123, n. 3, p.459-463., 2009.

ADZU, B.; AMOS, S.; DZARMA, S.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Effect of *Zizyphus spina-christi* Willd aqueous extract on the central nervous system in mice. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.79, p.13-16., 2002a.

ADZU, B.; AMOS, S.; MUAZZAM, I.; INYANG, U. S.; GAMANIEL, K. S. Neuropharmacological screening of *Diospyros mespiliformis* in mice. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.83, p.139-143., 2002b.

AGARWAL, R. B.; RANGARI, V. D. Anti-inflammatory and antiarthritic activities of lupeol and 19a-h lupeol isolated from *strobilanthus callosus* and *strobilanthus ixiocephala* roots. **Indian Journal of Pharmacology.**, v.35, p.384-387., 2003.

AGMO, A.; BELZUNG, C.; GIORDANO, M. Interactions between dopamine and GABA in the control of ambulatory activity. **Journal of Neural Transmission.**, v.103, n. 8, p.925-934., 1996.

AGUILERA-CARBO, A.; AUGUR, C.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; FAVELATORRES, E.; AGUILAR, C. N. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. **Applied Microbiology and Biotechnology.**, v.78, p.189-199., 2008.

AIHARA, E.; NOMURA, Y.; SASAKI, Y.; ISE, F.; KITA, K.; TAKEUCHI, K. Involvement of prostaglandin E receptor EP3 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Life Sciences.**, v.80, p.2446-2453., 2007.

AJAIKUMAR, K. B.; ASHEEF, M.; BABU, B. H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum L.* (pomegranate) methanolic extract. **Journal Ethnopharmacology**, v.96, p. 171-176, 2005

ALENCAR, N. L.; REIS, J. C.; PEREIRA, P. L.; ROCHA, M. S.; ALENCAR, O. B.; MARANHÃO, S. K. S.; COSTA, C. L. S.; ALMEIDA, F. R. C. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e frações das folhas de *Cenostigma macrophyllum*. In: XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002, Cuiabá. **Resumos.....** Cuiabá: XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2002.

ALICAN, I.; KUBES, P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. **The American Journal of Physiology.**, v.270, p.225-237., 1996.

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

ALMEIDA, F. R. C.; FONTAIO, D. F. S.; OLIVEIRA, R. C. M.; CRUZ, F. J. S. M.; NUNES, P. H. M. Atividade anti-ulcerogênica em extrato aquoso e etanólico das cascas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata*. In: REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 2002, SALVADOR. **Resumos** .Salvador: XVII Reunião Anual da Fesbe, 2002.

AL-MOFLEH, I. A.; ALHAIDER, A. A.; MOSSA, J. S.; AL-SOHAIBANI, M. O.; AL-YAHYA, M. A.; RAFATULLAH, S.; SHAIK, S. A. Gastroprotective effect of an aqueous suspension of black cumin *Nigella sativa* on necrotizing agents-induced gastric injury in experimental animals. **Saudi Journal of Gastroenterology.**, v.14, n. 3, p.128-134., 2008.

AL-SHABANAH, O. A.; RAZA, M.; AL-HARBI, M.M.; AL-BEKAIRI, A. M.; AL-GHARABLY, N. M.; QURESHI, S. Effect of ninhydrin on biochemical and histopathological changes induced by ethanol in gastric mucosa of rats. **Life Sciences**, v.67, n.5, p.559-66, 2000.

ALTOMARE, E.; VENDEMIALE, G.; ALBANO, O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. **Life Sciences.**, v.43, p.991-998., 1988.

ALVES, C. Q. Flavonóides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* TUL. (LEGUMINOSAE). 2007. **Disertação** (Mestrado em Química).-INSTITUTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, Salvador. (2007).

ALY, A.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.1704, p.1-10., 2004.

AMABEOKU, G. J. Antidiarrhoeal activity of *Geranium incanum* Burm. f. (Geraniaceae) leaf aqueous extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.123, n. 1, p.190-193., 2009.

ANDRADE SF, LEMOS M, COMUNELLO E, NOLDIN VF, FILHO VC, NIERO R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal Ethnopharmacology**, v.113(2), p.252-7, 2007.

AOI, M.; AIHARA, E.; NAKASHIMA, M.; TAKEUCHI, K. Participation of prostaglandin receptor EP4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **American Journal of Physiology.**, v.287, p.96-103., 2004.

ARATANEHEMUGE, Y.; HIBASAMI, H.; SANPIN, K.; KATSUZAKI, H.; KUNIO, I. K.; KOMIYA, T. Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumen (*Gossampinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. **Oncol Rep.**, v.11, p.289-92, 2004

ARCHANA, P.; TANDAN, S. K.; CHANDRA, S.; LAL, J. Antipyretic and analgesic activities of *Caesalpinia bonducella* seed kernel extract. **Phytother Res.**, p.376-381., 19 may 2005.

ARCHER, J. Test for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behaviour.**, v.21, p.205-235., 1973.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica.**, v.69, n. 10, p.905-909., 2003.

ASSIMOPOULOU, A. N.; ZLATANOS, S. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. **Food Chemistry**, v.265, p.418-422., 2005.

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

ATHMANN, C.; ZENG, N.; SCOTT, D. R.; SACHS, G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. **American Journal of Physiology (Gastrointestinal and Liver Physiology)**, v.279, p.1048-1058., 2000.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v.61, p.204-207., 1995.

BAGGIO, C.H. Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Achillea millefolium* L. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia) Curitiba-PR, 2004.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v.24, p.1225-1244., 2007.

BALBANI, A. P. S.; SILVA, D. H. S.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.19, p.461-473., 2009.

BARAKAT, H.; SAHAR, H.; HUSSEI, A. M.; MARZOUK, M. S.; MERFORT, I.; LINSCHIED, M.; NAWWAR, M. A. M. Polyphenolic metabolites of *Epilobium hirsutum*. **Phytochemistry**, v. 46(5), p. 935-941, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, p.141-148., 2007.

BARNICK, P. D.; CHEN, Q. P.; XU, Y. A.; THOM, S. R. Nitric oxide inhibits neutrophil $\beta 2$ integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. **Journal of Cellular Physiology**, v.172, p.12-24., 1997.

BASKAR, R.; MALINI, M.; VARALAKSHMI, P.; BALAKRISHNAN, K.; RAO, R. B. Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* stem bark against stem bark induced toxicity in experimental urolithiasis. **Fitoterapia**, v.67, p.121–125., 1996.

BASTAKI, S. M.; CHANDRANATH, I.; GARNER, A. Comparison of five antisecretory agents acting via H⁺/K⁺-ATPase. **Journal of Physiology - Paris**, v.94, p.19-23., 2000.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, G. C.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 2. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 1984. 337pp.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; TOMA, W.; CALVO, T. C.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p.328-332., 2004.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**, v.13, p.584-590., 2006.

BEALES, I. L. P. Gastrin and interleukin-1b stimulate growth factor secretion from cultured rabbit gastric parietal cells. **Life Sciences**, v.75, p.2983-2995., 2004.

BEALL, D.P.; HENSLEE, H. B.;WEBB, H. R.; SCOFIELD, R.H.Milk-alkali syndrome: a historical and description of the modern version of the syndrome. *America Journal of the Medical Science*, v. 3331, p. 233-242, 2006

BELAICHE, J.; BURETTE, A.; DE VOS, M.; LOUIS, E.; HUYBRECHTS, M.; DELTENRE, M. Study Group of NSAID-GI complications: Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. **Acta Gastroenterologic Belgiam**, v.65, p.65-73., 2002.

BENETT, A.; FRIEDMANN, C. A.; VANE, J. R. Release of prostaglandin E1 from rat stomach. **Nature**, v.216, p.873-876., 1967.

BHATTACHARYA, S. K.; BHATTACHARYA, A.; SAIRAM, K.; GHOSAL, S. Effect of bioactive tannoid principles of *Emblica officinalis* on ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rat heart. **Phytomedicine.**, v.9, n. 2, p.171-174., 2002.

BIRKE, L.I.A.; ARCHER, J. Some issues and problems in the study of animal exploration. **Exploration in animals and humans.** Cambridge: University press, p. 279. 1973

BODE, C.; BODE, J. C. Alcohol's Role in Gastrointestinal Tract Disorders. **Alcohol Health & Research World**, v.21, n. 1, p.76-83., 1997.

BONNET, S. L.; STEYBERG, J. P.; BEZUIDENHOUDT, C. B.; SAUNDERS, C. M.; FERREIRA, D. Structure and synthesis of phlobatannins related to the (4 β ,6:4 α ,8)-bis-fisetinidol-catechin profisetinidin triflavanoid. **Phytochemistry.**, v.43, p.215-240., 1996.

BORRELI, F.; IZZO, A. A. Review article: The plant Kingdom as a source of antiulcer remedies. **Phytother.**, v.14, p.581-591., 2000.

BRAGA, F.; AYRES-SARAIVA, D.; GATTASS, C. R.; CAPELLA, M. A. M. Oleonic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. **Cancer Letters.**, v.248, p.147-152., 2007.

BRAMWELL, D. How many plant species are there? **Plant Talk.**, v.28, p.32., 2000.

BRASIL 2007. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Ministério da Saúde, Brasília, 60 pp.

BRASIL 2010. Ministério da Saúde . Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, n.75, p.6009, 22 abr. 2010. Seção 1, pt1.

BROWN, J.F., KEATES, A.C., HANDON, P.J., WHITTLE, B.J.R. Nitric Oxide generators and GMPc stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **America Journal Physiol**, 265: G418-G422, 1993.

BROZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C. H.; KONTUREK, S. J. Involvement of cyclooxygenase (COX-2) products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.51, p.751-773., 2000.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers. In: HARDMAN, J. G., *et al.* **Goodman e Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11^a. ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p. 663-691.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.22, p.167-195., 2005.

BUTTGEREIT, F.; BURMESTER, G. R.; SIMON, L. S. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, v.110, p.13s-19s., 2001.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134., 2005.

CAMPOS, D.A.; DE LIMA, A.F.; RIBEIRO, S.R.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. **Journal Pharm Pharmacol**. v. 60(3), p.391-7, 2008

CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; LÓPEZ-BOTE, C.; HOZ, L. L.; ORDÓÑEZ, J. A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged iberian pings. **J. Agric. Food Chem**, Columbus, v. 51, p. 6248-6255, 2003.

CARLINI, E.A., CONTAR, J.D.P., SILVA-FILHO, A.R., SILVEIRA-FILHO, N.G., FROCHTENGARTEN, M.L. AND BUENO, O.F.A, Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology** 17, pp. 37-64, 1986, 1986

CARROLL, B. T. The universal field hypothesis of catatonia and neuroleptic malignant syndrome. **CNS Spectrums**, v.5, n. 7, p.26-33., 2000.

CARVALHO A.C, GUEDES M.M, DE SOUZA A.L, TREVISAN M.T, LIMA A.F, SANTOS F.A, RAO, V.S. Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. **Planta Medica**. v.73(14), p.15-22, 2007.

CHATURVEDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**. v. 263 (1), p.1-13, 2008.

CHEN, D.; AIHARA, T.; ZHAO, C. M.; HAKANSON, R.; OKABE, S. Differentiation of the Gastric Mucosa I. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**., v.291, p.539-544., 2006.

CHENTER, L. RODRIGUES- JÚNIOR, L. Úlcera Péptica. Em: MISZPUTEN, S. J. **Gastroenterologia**, 1ªed.Editora Manole, Barueri,SP, p.49-64, 2002

CHITME, H. R.; CHANDRA, R.; KAUSHIK, S. Studies on anti-diarrheal activity of *Calotropis gigantea* R. BR. in experimental animals. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**., v.7, p.70-75., 2003.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; PETTACCI, F. F. J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Oral toxicity of chemical substances found in *Dimorphandra mollis* (Caesalpiniaceae) against honeybees (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**., v.45, p.141-149., 2005.

CNMAF. Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica 1. 2003. Relatório final preliminar. Brasília: Ministério da Saúde. World Health Organization (WHO). Traditional medicien strategy 2002-2005. 2002. Genova: World Health Organization.

CONNOLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids – Review. **Natural Product Reports**., v.19, p.494-513., 2002.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma. **Revista Brasileira de Farmagnosia**., v.18 (Suplemento), p.785-797., 2008.

CORUZZI, G.; ADAMI, M.; MORINI, G.; POZZOLI, C.; CENA, C.; BERTINARIA, M.; GASCO, A. Antisecretory and gastroprotective activities of compounds endowed with H₂ antagonistic and nitric oxide (NO) donor properties. **Journal of Physiology-Paris.**, v.94, n. 1, p.5-10., 2000.

COSTA, A. F.; SANTOS, F. J. B. DOS; CHAVES, M. H. Isoprenóides e biflavona de *Cenostigma macrophyllum* Tul. **CD-ROM** da 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, -. Poços de Caldas – MG, 2002.

COSTA, A. F. Isoprenóides das folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. acuminata Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae). 2003. 188 f. **Dissertação** (Mestrado em Química). Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2003

COSTA, C. L. S. Constituintes químicos e atividades antibacteriana, antiulcerogênica e hepatoprotetora da *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. acuminata Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae). 2005. 137 f. **Dissertação** (Mestrado em Química). Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2005.

COSTALL, B.; NAYLOR, R.J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. **Psychopharmacology**, v.34, n.3, p.233-241, 1974.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test is a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetical studies in mice. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 571 – 625, 2005

DAJANI, E. Z.; KLAMUT, M. J. Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update. **Expert Opinion on Investigational Drugs.**, v.9, n. 7, p.1537-1544., 2000.

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

DEBASHIS, B.; KAUSHIK, B. MRINNALINI, B.; RUSSEL, J.; REITER, R. K. B. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration, protection by melatonin. **Indian Journal of Experimental Biology.**, v. 40, p. 693-705, 2002.

DELGADO-MENDEZ, P.; HERRERA, N.; CHAVEZ, H.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYNS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry.**, v.16, p.1425-1430., 2008.

DEL-SOLDATO, P. Gastric lesion-preventing or potentiating activity of clonidine in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology.**, v.41, p.257-259., 1986.

DE MELO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. , SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P. de, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, Editora da UFSC/UFSC, 2004

DEMIR, S.; YILMAZ, M.; KOSEOGLU, M.; AKALIN, N.; ASLAN, D.; AYDIN, A. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. **The Turkish Journal of Gastroenterology.**, v.14, n. 1, p.39-43., 2003.

DESMARCHELIER, C. J.; BUSTAMANTE, J. M.; COUSSIO, J. D.; CICCIA, G. N.; SILVA, G. L. Profisetinidin type tannins responsible for antioxidant activity in *Copaifera reticulata*. **Pharmazie.**, v.56, p.573-577., 2001.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach.** 1^a. ed. [S.l.]: Wiley, 2000.

DI JOSEPH, J. F.; EASH, J. R.; MIR, G. N. Gastric antisecretory and antiulcer effects of WHR1582A, a compound exerting alpha-2 adrenoceptor agonist activity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, v.241, p.97-102., 1987.

DOHERTY, H. S.; HANCOCK, A. A. Role of alpha-2 adrenergic receptors in the control of diarrhea and intestinal motility. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, v.225, n. 2, p.269-274., 1983.

DONGMO, A. B.; KAMANYI, A.; ANCHANG, M. S.; CHUNGAG-ANYE NKEH, B.; NJAMEN, D.; NGUELEFACK, T. B.; NOLE, T.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extracts of *Erythrophleum suaveolens* (Caesalpinaceae) Guillemin & Perrottet. **Journal Ethnopharmacology.** p.137-141, 2001.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. **Science.**, v.287, p.1960-1964., 2000.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v.14, n. 1, p.6-8., 2004.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association.**, v.46, p.208-210., 1957.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.**, v.39, n. 4, p.343-350., 2003.

FARIA, F.M. Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante de *Rhizophora mangle* L. 2009. 155f. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

FERNANDES, F. F.; FREITAS, E. P. S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology.**, v.147, p.150-154., 2007.

FERNANDEZ, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.**, v.53, p.1533-1539., 2001.

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

FIRENZUOLI, F.; GORI, I.; NERI, D. Clinical phytotherapy: opportunities and problematics. **Annali dell Istituto Superiore di Sanita.**, v.41, n. 1, p.27-33., 2005.

FREIRE, F. M. T. Revisão Taxonômica do Gênero *Cenostigma* Tul. (Leguminosae-Caesalpinioideae). 1994, 113 f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1994.

FULOP, K.; ZADORI, Z.; RONAI, A. Z.; GYIRES, K. Characterisation of alpha2-adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying, gastric motility and gastric mucosal defence. **European Journal of Pharmacology**, v.528, p.150-157., 2005.

GALVEZ, J.M.G., RIEDL, B., CONNER, A.H. Analytical studies on tara tannins. **Holzforsch.** v. 51(3), p. 235-243, 1997.

GAWRON-GZELLA, A.; WITKOWSKA-BANASZCZAK, E.; DUDEK, M. Herbs and herbal preparations applied in the treatment of gastric hyperacidity, gastric and duodenal ulcer in cigarette smokers. **Przegl Lek**, v.62(10), p.1185-1187, 2005.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.77-80, 2001

GHANAYEM, B. I.; MATTHEWS, H. B.; MARONPOT, R. R. Calcium channel blockers protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in rats. **Gastroenterology**, v.92, p.106-111., 1987.

GLASS, M. J.; PICKEL, V. M. alpha(2A)-adrenergic receptors are present in mu-opioid receptor containing neurons in rat medial nucleus tractus solitarius. **Synapse**, v.43, p.208-218., 2002.

GLAVIN, G. B. Calcium channel modulators : Effects on gastric function. **European Journal of Pharmacology**, v.160, p.323-330., 1989.

GOLOUBKOVA, T.D.; HECKLER, E.; RATES, S.M.; HENRIQUES, J.A.; HENRIQUES, A.T. Inhibition Of Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases By An Alkaloid Fraction From *Helietta Apiculata* Markedly Potentiate The Hypnotic Action of Pentobarbital. **Journal Ethnopharmacology**, v. 60(2), p.141-8, 1998

GUEDES, M.M.; CARVALHO, A.C.S.; LIMA, A.F.; LIRA, S .R.S.; QUEIROZ, S. S.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V.S. Gastroprotective mechanisms of Centipedic Acid, a natural niterpene from *Egletes viscosa* LESS. **Biol. Pharm. Bull.** V.31(7), p. 1351-1355, 2008.

GYAMFI, M.A., HOKAMA, N., OPPONG-BOACHIE, K., ANIYA, Y. Inhibitory effects of the medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, on liver drug metabolizing enzymes of rats. **Human and Experimental Toxicology**.v. 19, p.623–631, 2000

GYIRES, K.; ZADORI, Z.S.; SHUJAA, N.; MINORICS, R.; FALKAY, G.; MATYUS, P. Analysis of the role of central and peripheral α_2 -adrenoceptor subtypes in gastric mucosal defense in the rat. **Neurochemistry International** v.51, p.289–296, 2007

GYIRES, K.; MULLNER, K.; FURST, S.; RONAI, A. Z. Alpha-2 adrenergic and opioid receptor-mediated gastroprotection. **Journal of Physiology - Paris**., v.94, p.117-121., 2000a.

GYIRES, K.; MULLNER, K.; RONAI, A. Z. Functional evidence that gastroprotection can be induced by activation of central α_2B -adrenoceptor subtypes in the rat. **European Journal of Pharmacology**., v.396, p.131-135., 2000b.

GYIRES, K.; RONAI, A. Z.; MULLNER, K.; FURST, S. Intracerebroventricular injection of clonidine releases beta-endorphin to induce mucosal protection in the rat. **Neuropharmacology**., v.39, p.961-968., 2000c.

GYIRES, K.; RONAI, A.Z .; TOTH, G.; DARULA, Z.S.; FÜRST, S. Analysis of the role of delta opioid receptors in gastroprotection in the rat. **Life Sciences**, v. 60 (16), p. 1337-13471, 1997

HALL, C. S. Temperament: a survey of animals studies. **Psychological Bulletin**., v.38, p.909-943., 1941.

HALLIWELL, B.; J. M. C. GUTTERIDGE. **Free radicals in biology and medicine**, 3^o ed. Oxford University Press Oxford. 1999

HASCOE T, M.; BOURIN, M. A new approach to the light/dark test procedure in mice. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 60, P. 645–653, 1998.

HASLAM, E. Chemistry of vegetable tannins. **Academic Press**., London, p.179., 1966.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**., v.59, p.205-215., 1989.

HATA, K.; HORI K.; TAKAHASHI, S. Role of p38 MAPK in lupeol-induced B16 2F2 mouse melanoma cell differentiation. **Journal Biochem.**, v. 134 (3), p. 441-445, 2003.

HATANO T, YASUHARA T, YOSHIHARA R, AGATA I, NORO T, OKUDA T. Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. **Chem. Pharm. Bull.** v.38(5) ,p.1224-229, 1990.

HAWKINS, C.; HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature. **Journal of Pain and Symptom Management.**, v.20, n. 2, p.140-151., 2000.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radical Research.**, v.4, p.273-300., 1999.

HEEBA G. H., HASSAN, M.K.A.; AMIN, R. S.Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Role of nitric oxide and prostaglandins **European Journal of Pharmacology.** v. 607(1-3), p. 188-193, 2009

HEGNAUER, R.; BARKMEIJER, R. J. G. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry.**, v.34, p.3-16., 1993.

HIRANO, Y.; KONDO, R.; SAKAI, K. 5 α -Reductase inhibitory tannin-related compounds isolated from *Shorea laevifolia*. **J. Wood Sci.**, Japan, v. 49, 339-343, 2003

HIRUMA-LIMA, C.A.; CALVO, T.R.; RODRIGUES, C.M.; ANDRADE, F.D.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal Ethnopharmacology**, v. 104(1-2), p.215-24. 2006.

HODGES, L. D.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T. A. Antiprotease effect of anti-inflammatory lupeol esters. **Mol. Cell. Biochemistry.**, v.252, p.97-101., 2003.

HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J. Pharmacotherapy of Gastric Acidity, Peptic Ulcer, and Gastroesophageal Reflux Disease. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. United States: McGraw-Hill, 2006. p. 869-882.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. **EdUFSCar.**, São Carlos, p.54., 2003.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind the antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53(6), p.1841- 1856, 2005.

IZZO, A. A.; GAGINELLA, T. S.; MASCOLO, N.; CAPASSO, S. Recent findings on the mode of action of laxatives: the role of platelet activating factor and nitric oxide. **Trends in Pharmacological Sciences.**, v.19, p.403-405., 1998.

JAATINEN, P.; RIIHIOJA, P.; HAAPALINNA, A.; HEINONEN, E.; KIIANMAA, K.; HERVONEN, A. Prevention of ethanol-induced sympathetic overactivity and degeneration by dexmedetomidine. **Alcohol.**, v.12, p.439-446., 1995.

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

JAMES, A. N.; RYAN, J. P.; PARKMAN, H. P. Effects of clonidine and tricyclic antidepressants on gastric smooth muscle contractility. **Neurogastroenterol.**, v.16, p.143-153., 2004.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.94, p.93-100., 2004.

KAKUDA, T.; SUGIMOTO, A.; UNNO, T. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. **Journal of Ethnopharmacology**, Great Britain, v. 93, 391-395, 2004.

KAPLAN, H.; SADOCK, B. J.; SADOCK, V. A. **Compêndio de psiquiatria**. 9. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2006.

KATAOKA, H.; HORIE, Y.; KOYAMA, R.; NAKATSUGI, S.; FURUKAWA., M. Interaction between NSAIDs and steroid in rat stomach: safety of nimesulide as a preferential COX-2 inhibitor in the stomach. **Digestive Diseases and Sciences.**, v.45, p.1366-1375., 2000.

KATO, S.; AIHARA, E.; YOSHII, K.; TAKEUCHI, K. Dual action of prostaglandin E₂ on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat. **American Journal Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 289,p.64-69, 2005

KATO, A.; NAITOU ,H.; NAMIOKA ,M.; AKIMOTO, M.; ISHII, T.; SAKAKIBARA, H.; SHIMOI ,K.; NAKAYAMA, T.; OHASHI, N. Proteomic Identification of Serum Proteins Associated with Stress-Induced Gastric Ulcers in Fasted Rats . **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 74 (4),p. 90897-1–7, 2010

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology.**, v.15, p.1-6., 2000.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: Bauhinia forficata and Cissus sicyoides. **Biological Research.**, v.41, p.167-171., 2008.

KHANBABAEE, K.; REE, T. V. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports.**, v.18, p.641–649., 2001.

KHAZAEI, M.; SALEHI, H. Protective effect of *Falcaria vulgaris* extract on ethanol induced gastric ulcer in rat. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics.**, v.5, p.43-46., 2006.

KHENNOUF, S.; GHARZOULI, K.; AMIRA, S.; GHARZOULI, A. Effects of Quercus ilex L. And Punica granatum L. Olyphenols against ethanol induced gastric damage in rat. **Pharmazie.**, v.54, p.75-76., 2003a.

KHENNOUF, S.; BENABDALLAH, H.; GHARZOULI, K.; AMIRA, S.; ITO, H.; KIM, T.-H.; YOSHIDA, T.; GHARZOULI., A. Effect of Tannins from Quercus suber and Quercus coccifera Leaves on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, v.51, p.1469-1473., 2003b.

KIM, H.-S. Do not put too much value on conventional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.37-39., 2005.

KIMURA, M.; GOTO, S.; IHARA, Y.; WADA, A.; YAHIRO, K.; NIIDOME, T.; OYAGI, H.; HIRAYAMA, T.; KONDO, T. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Microbial Pathogenesis**, v.31, p.29-36., 2001.

KIRKMAN, N.H., GAETANI, G.F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 81, p. 4343– 4347, 1984.

KIRKMAN, H.N., ROLFO, M., FERRARIS, A.M., GAETANI, G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **Journal Biol. Chem.**,v.274, p.13908–13914, 1999.

KLAASSEN, C. D.; BRACKEN, W. M.; DUDLEY, R. E.; GOERING, P. L.; HAZELTON, G. A.; HJELLE, J. J. Role of sulfhydryls in the hepatotoxicity of organic and metallic compounds. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.5, p.806-815., 1985.

KLEMM, W. R. Behavioral arrest: in search of the neural control system. **Progress in Neurobiology**, v.65, p.453-471., 2001.

KLEMM, W. R.; BLOCK, H. D-1 and D-2 receptor blockade have additive cataleptic effects in mice, but receptor effects may interact in opposite ways. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.29, n. 2, p.223-229., 1988.

KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. **European Journal of Pharmacology**, v.452, p.235-243., 2002.

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

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; PAWLIK, T.; SLIWOWSKI, Z.; OCHMAŃSKI, W.; HAHN, E. G. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. **Journal of physiology and pharmacology.**, v.55, p.5-17., 2004.

KO, J.K.S.; CHO, C.H.; LAM, S.K. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. **World Journal of Gastroenterology.**, v. 10, p.2503-2508, 2004.

KOO, M. W. L. The effects of milk and calcium on ethanol-induced gastric mucosal damage. **Pharmacological Research.**, v.29, n. 3, p.217-224., 1994.

KOO, M. W. L.; CHO, C. H.; W., O. C. Verapamil worsens ethanol-induced gastric ulcers in rats. **European Journal of Pharmacology.**, v.120, p.355-358., 1986.

KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. **The American Journal of Medicine.**, v.109, p.150-158., 2000.

KUNCHANDY, J.; KHANNA, S.; KULKARNI, S. K. Effect of alpha2 agonists clonidine, guanfacine and B HT 920 on gastric acid secretion and ulcers in rats. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie.**, v.275, p.123-138., 1985.

KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of Surgery.**, v.221, p.220-235., 1995.

KUTCHAI, H. C. Secreções gastrintestinais. In: BERNE, R. M.; LEWI, M. N. **Fisiologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

KWEIFIO-OKAI, G.; DE MUNK, F.; MACRIDES, T. A.; SMITH, P.; RUMBLE, B. A. Anti-arthritic mechanisms of Lupeol Triterpenes. **Drug Develop Research.**, v.36, p.20-24., 1995.

KWIECIEŃ, S.; BRZozowski, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology.**, v.53, n. 1, p.39-50., 2002.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTÍN CALERO, M. J.. Evidence for protective and antioxidante properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1-2, p.45-53, 2000.

LA VECCHIA, C.; TAVANI, A. A review of epimedemological studies on câncer in relation to the use of anti-ulcer drugs. **European Journal of Cancer Prevention**., v.11, n. 2, p.117-123., 2002.

LAHEIJ, R. J.; STURKENBOOM, M.C.; HASSING, R.J. Risk of community-acquired pneumonia and use of gastric acid-suppressive drug. **JAMA**, v.;292(16):1955–60, 2004

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**., v.135, p.41-60., 2008.

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**., v.10, p.s2-s4., 2008.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O., *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2003. p. 247-262.

LEE, S. J.; LEE, I. S.; MAR, W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose in murine macrophage cells. **Archives of Pharmacal Research**., v.26, n. 10, p.832-839., 2003.

LEKHA, P. K.; LOMANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of art. **Applied Microbiology**, v.44, p.215-260., 1997.

LEWIS, D. A. E.; SHAW, G. P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **Journal of Nutritional Biochemistry**., v.12, p.95-100., 2001.

LEWIS, D. A.; HANSON, P. J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: ELLIS, G. P.; WEST, G. B. **Progress in medicinal chemistry**. 28. ed. Amsterdam: Elsevier Science Plubishers, v. 1, 1991. p. 201-231.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. England: Royal Botanic Gardens, 2005.

LI, Y.; OHIZUMI, Y. Search for constituents with neutrophilic factor potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. **Yakugaku Zasshi**, v.124, n. 7, p.417-424., 2004.

LI, X.; QIAN, J.; CHEN, Y.; CHEN, Y. The mechanism of somatostatin-induced acid secretion inhibition in isolated parietal cells. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**. v.;40(4),p. 236-238, 2001.

LI, P.; CHANG, T. M.; COY, D.; CHEY, W. Y. Inhibition of gastric acid secretion in rat stomach by PACAP is mediated by secretin, somatostatin, and PGE₂. **American Journal of Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 278 (1), p. 121-127, 2000

LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.300-306., 2006.

LIMA, I. O.; COSTA, V. B. M.; MATIAS, W. N.; COSTA, D. A.; SILVA, D. A.; AGRA, M.F.; SOUZA, M. F. V.; EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA, E. O.; BATISTA, L.M. Biological activity of *Herissantia crispa* (L.) Brizicky. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19 (1), p. 249-254, 2009.

LIPSKA, B.K; WEINBERG, D.R. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. **Neuropsychopharmacology**. v. 23(3), p.:223-239, 2002

LORENC-KOC, E.; WOLFARTH, S.; OSSOWSKA, K. Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of parkinsonian rigidity. **Experimental Brain Research**, v.109, p.268-276., 1996.

LORENZI, H.; ABREU, F.J.M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 275-276.

LUTNICKI, K.; WRÓBEL, J.; LEDWOZYW, A.; TREBAS-PIETRAS, E. The effect of calcium ions on the intensity of peroxidation processes and the severity of ethanol-induced injury to the rat's gastric mucosa. **Archivum veterinarium Polonicum / Polish Academy of Sciences, Committee of Veterinary Sciences.**, v.32, n. 1 e 2, p.125-132., 1992.

LYONS, H.; LEUNG, Y. K.; BAKRI, A.; LEE, P. C.; LEBENTHAL, E. Verapamil decreases ethanol-induced gastric acid secretion in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology.**, v.7, p.48-51., 1992.

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

MAISELS, F.; GAUTHIERHION, A.; GAUTIER, J. P. Diets of 2 sympatric colobines in zaire - more evidence on seed-eating in forests on poor soils. **International Journal of Primatology.**, v.15, p.681-701., 1994.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry.**, v.253, p.329-338., 2003.

MALINI, M. M.; LENIN, M.; VARALAKSHMIU, P. Protective effect of triterpenes on calcium oxalate crystal-induced peroxidative changes in experimental urolithiasis. **Pharmacological Research.**, v.41, 2000.

MAJUMBAR, D.; BEBB,J.; ATHERTON, J. *Helicobater pylori* infection and peptic ulcers. **Medicine.**v. 35,p. 204-209, 2007.

MANDAL, S. C.; DHARA, A.K.;MAITI, B. C. Studies of psychopharmacological activity of *Andrographis paniculata* extract. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 253-256, 2001

MANSUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) 9-trans tetrahydrocannabinol on the behaviour of rats in open field arena. **Psychopharmacology**, v. 19, p. 338-397, 1971.

MATÉS, J.M. ; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 339-345,1999.

MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B.; BANDEIRA, M.A.M. **Guia fitoterápico**. Programa Estadual de Fitoterapia. Ceará: Fortaleza, 2001

MBAGWU, H. O.; ADEYEMI, O. O. Anti-diarrhoeal activity of the aqueous extract of *Mezoneuron benthamianum* Baill (Caesalpiniaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.16-20., 2008.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [α]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v.559, p.227-235., 2007.

MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H.; ALCÂNTARA, T. M.; IZIDORO, L. F.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytother Research**, p.859-866., 2008.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 673-751, 2000.

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

MILLER, T. A. Mechanisms of stress-related mucosal damage. **America Journal Medicine**. v. 83, p. 8-14., 1987.

MILLER, L.G.; WOOLVERTON S, GREENBLATT DJ, LOPEZ F, ROY RB, SHADER RI. Chronic benzodiazepine administration. IV. Rapid development of tolerance and receptor downregulation associated with alprazolam administration. **Biochem Pharmacol**. 1989 Nov 1;38(21):3773-7.

MORAES, T.M.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMA, H.; BAUAB, T. M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C. H.; ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO, A.R.M.S.; CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA, C. A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120 (2), p.161-168, 2008.

MORAIS, T.C. PINTO, N. B. CARVALHO, K.M. M.B. RIOS, J.B. RICARDO, N. M. P. S.; TREVISAN, M. T. RAO, V. S. SANTOS, F. A. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemical-Biological Interactions**, v. 183(1),p.264-9, 2010.

MOREIRA, F.A., GUIMARÃES, F.S.. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **Eur. J. Pharmacol.** v. 512, p.199–205, 2005

MORI, T.; ITO, S.; KITA, T.; NARITA, M.; SUZUKI, T.; SAWAGUCHI, T. Effects of μ -, δ - and κ -opioid receptor agonists on methamphetamine-induced self-injurious behavior in mice. **European Journal of Pharmacology**., v.532, p.81-87., 2006.

MULLNER, K.; GYIRES, K.; FURST, S. Involvement of central K(ATP) channels in the gastric antisecretory action of alpha2-adrenoceptor agonists and beta-endorphin in rats. **European Journal of Pharmacology**., v.435, p.225-229., 2002.

MURAKAMI, S.; ISOBE, Y.; KIJIMA, H.; , N. H.; MURAMATU, M.; OTOMO, S. Inhibition of gastric H⁺, K(+)-ATPase and acid secretion by ellagic acid. **Planta Medica**., v.57, n. 4, p.305-308., 1991.

MURAKAMI, S.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S. Inhibitory effect of tannic acid on gastric H⁺K⁺-ATPase. **Journal of Natural Products**., v.55, n. 4, p.513-516., 1992.

NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. **World J. Gastroenterol.**, v.13, p.2053-2060., 2007.

NAHAVANDI, A.; DEHPOUR, A. R.; MANI, A. R.; HOMAYOUNFAR, H.; ABDOLI, A. NG-nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. **European Journal of Pharmacology**., v.370, p.283-286., 1999.

NAKASHIMA, M.; AOI, M.; AIHARA, E.; TAKEUCHI, K. No role for prostacyclin IP receptors in duodenal HCO₃ secretion induced by mucosal acidification in mice: comparison with capsaicin-induced response. **Digestion**., v.70, p.16-25., 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**., v.70, p.461-477., 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**., v.66, p.1022-1037., 2003.

NISHIO, H.; HAYASHI, Y.; TERASHIMA, S.; TAKEUCHI, K. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. **Life Sciences**., v.79, p.1523-1530., 2006.

NOSALOVA, V.; PETRIKOVA, M.; NOSAL, R. Lipid peroxidation in normal and ulcerated gastric mucosa of rats treated with pentacaine and cimetidine. **Agents Actions**., v.27, p.160-162., 1989.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.103, p.59–65. 2006

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. **Planta Medica**., v.55, p.117-122., 1989.

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

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

OLIVEIRA, R. C. M. ; NUNES, P. H. M. ; OLIVEIRA, A. P. ; REIS, J. C. ; MESQUITA, A. B. S. ; CHAVES, M. H. . Efeito das frações acetato de etila e hidroalcoólica de *Cenostigma macrophyllum* Tull. var. acuminata Teles Freire. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2000, Recife. **Resumos**....Recife: XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil , Recife, 2000.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA-JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v.49, p.105-111., 2004a.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; SANTOS, K. A.; MARTINS, F. S.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v.70, n. 8, p.780-782., 2004b.

OSARENMWINDA, I. P.; OMONKHELIN, J. O.; EJIRO, D. Antidiarrhoeal Activity Of The Methanolic Extract Of The Leaves Of *Paullina Pinnata* Linn (Sapindaceae). **The Internet Journal of Health**, v.9, n. 1, p.1-5., 2009.

OSTROWSKI, J.; PESTA, J.; LINNIK, D.; BUTRUK, E. The influence of calcium antagonists (verapamil, nifedipine and Mg Cl₂) on rat gastric damage induced by ethanol in vivo and in vitro. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.44, n. 3, p.273-281., 1993.

OZTURK, Y.; AYDINI, S., BEIS, R.; BASER, K. H. C.; BERBEROGLU, H. Effect of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calximun* L. extract on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 3, p. 139-146, 1996.

PAINE, T.A, JACKMAN, S.L.; OLMSTEAD, M.C. Cocaine-induced anxiety: alleviation by diazepam, but not buspirone, dimenhydrinate or diphenhydramine. **Behavior Pharmacology**, v. 13, p.511–523, 2002.

PARK, J.H.; LEE, C.K.; HWANG, Y.S. Hemin inhibits cyclooxygenase-2 expression through nuclear factor-kappa B activation and ornithine decarboxylase expression in 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate-treated mouse skin. **Mutat Res.**,v. 642, p.68–73, 2008

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v.1,p . 7 – 12, 2003

PATON, W. D.; E.S., V. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. **British Journal of Pharmacology.**, v.35, p.10-28., 1969.

PEREIRA, S. S.; SILVA, L. L.; SILVA, A. M. O.; ALENCAR, N. L.; SILVA, H. R; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C. Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Antiedematogênica de *Cenostigma magrophyllum* TUL. var. *acuminata* TELES FREIRE. In: I REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2005, Fortaleza. **Anais....** Fortaleza: I Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais, 2005.

PEREIRA, S.S.; LOPES, L. S.; MARQUES, R.B.; FIGUEIREDO, K.A.; COSTA, D.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, 2010 (in print).

PEREZ, R. M. G.; PEREZ, J. A. L.; GARCIA, L. D. M.; SOSSA, H. M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 43-48, 1998.

PERINI, R. F.; MA, L.; WALLACE, J. L. Mucosal Repair and COX-2 Inhibition. **Current Pharmaceutical Design.**, v.9, p.2207-2211., 2003.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). **Journal of Ethnopharmacology.**, v.111, p.553-559., 2007.

PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B. A.. Role of atp-sensitive potassium channels in prostaglandin- mediated gastroprotection in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v. 301(3),p.969-974, 2002

PRETORIUS, J.L., PHILIPS, M., LANGLEY, R.W., SZABADI, E., BRADSHAW, C.M., Comparison of clozapine and haloperidol on some autonomic and psychomotor functions, and on serum prolactin concentration, in healthy subjects. **Br. J. Clin. Pharmacol.** v. 52, p. 322–326, 2001.

PETRONILHO, F.;ARAÚJO, J.; STECKERT, A. V.; REZIN, G.T.; FERREIRA, G.K.; ROESLER,R.; SCHWARTSMANN, G.; DAL-PIZZOL,F.; STRECK, E.L. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. **Peptides**, v. 30, p. 1460–1465, 2009.

PFEIFFER, S.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F.; MAYER, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (LNAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **British Journal of Pharmacology.**, v.118, n. 6, p.1433-1440., 1996.

POLHILL, R. M. Papilionoideae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. **Advances in Legume Systematics.** England: Royal Botanic Gardens, v. 1, p. 191-208, 1981.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open-fields as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology.**, v.463, p.3-33., 2003.

PRZEGALINSKI E, FILIP M, PAPLA I, SIWANOWICZ J: Effect of serotonin (5-HT) 1B receptor ligands on cocaine sensitization in rats. **Behav Pharmacol.** v. 12, p.109-116, 2001

PUSHPAKIRAN, G.; MAHALAKSHMI, K.; ANURADHA, C. V. Protective effects of taurine on glutathione and glutathione-dependent enzymes in ethanol-fed rats. **Pharmazie.**, v.11, p.869-872., 2004.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; SIQUEIRA, J. S.; OLIVEIRA, L. E. G.; ALMEIDA, R. N.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with anticonvulsant properties - a review. **Revista Brasileira de Farmagnosia.**, v.18 (Suplemento), p.798-819., 2008.

RAFFA, R. B.; RAWLS, S.M.; BEYZAROV,E.P. **Atlas de farmacologia de Netter.** Artmed. Porto Alegre, Brasil,p.169-190, 2006

RAGHUNATH, A. S.; O'MORAIN, C.; MCLOUGHLIN, R. C. Review article: the long-term use of próton-pump inhibitors. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics.**, v.22, n. 1, p.55-63., 2005.

RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic Ulcer Disease. **American Family Physician**, v. 76 (7), 2007.

RAMIREZ, R. O.; ROA, C. C. J. The gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini* Skeels) bark on HCl/ethanol induced gastric mucosal injury in Sprague-Dawley rats. **Clinical Hemorheology and Microcirculation.**, v.29, p.253-261., 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Pharmacology.** 6. ed. [S.l.]: Churchill Livingstone International, 2007.

REITMAN, S. Gastric secretion. In: FRANKEL, S.; REITMAN, S.; SONNENWORTH, A. C. (Ed.). **Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis.** London: Mosby, p. 1949- 1958, 1970.

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

RILEY, H.; SPINKS, A. Biological assesment of tranquilizers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.**, v.10, p.657-671., 1958.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology.**, v.77, p.433-443., 1979.

ROCHA, M. S.; ALMEIDA, F. R. C.; PEREIRA, P. L. Avaliação da atividade anti-edematogênica e antinociceptiva do extrato etanólico da casca de *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire. In: XI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI, 2002, Teresina. **Resumos...** Teresina: XI Seminário de Iniciação Científica da UFPI, 2002.

ROULEAU, A.; HERON, A. . C. V.; PILLOT, C.; SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. **Journal of Neurochemistry.**, v.90, p.1331-1338., 2004.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; AMORNLERDPISON, D.; POJANAGAROON, S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. **Journal of Ethnopharmacology.** v.102, p. 120-122, 2005.

SAINATH, R. S.; PRATHIBA, J.; MALATHI, R. Antimicrobial properties of the stem bark of *Saraca indica* (Caesalpiniaceae). **European Review For Medical And Pharmacological Sciences.**, v.13, p.371-374., 2009.

SAITO, T.; MIZUTANI, F.; IWANAGA, Y.; MORIKAWA, K.; KATO, H. Laxative and anti-diarrheal activity of polycarbophil in mice and rats. **The Japanese Journal of Pharmacology.**, v.89, p.133-141., 2002.

SALEEM, M.; ALAM, A. . A. S.; SHAH, M. S.; AHMED, B.; SULTANA, S. Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. **Pharmacological Research.**, v.43, p.127-134., 2001.

SALEEM, M.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Lupeol modulates NFkappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene.**, v.23, p.5203-5214., 2004.

SALEEM, M.; KAUR, S.; KWEON, M.; ADHAMI, V. M.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. **Carcinogenesis.**, v.26, p.1956-1964., 2005a.

SALEEM, M.; KWEON, M.; YUN, J.; ADHAMI, V. M.; KHAN, N.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. A novel dietary triterpene lupeol induces Fas-mediated apoptotic death of androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumor growth in a xenograft model. **Cancer Research.**, v.65, p.11203–11213., 2005b.

SALIM, A. S. Sulfhydryls protect patients against complications of erosive gastritis. **Digestive Diseases and Sciences.**, v.11, p.1436-1437., 1990.

SANBERG, P. R.; GIORDANO, M.; BUNSEY, M. D.; NORMAN, A. B. The catalepsy test: Its ups and downs. **Behavioral Neuroscience.**, v.102, n. 5, p.748-759., 1988.

SANCHEZ-ALVORADO, E. E. Aplicación y usos potenciales de La tanasa y los taninos. **Monografía** (licenciatura em químico farmacêutico biólogo). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, México, 2001.

SÁNCHEZ, M.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; YÁÑEZ, T.; RODRÍGUEZ, J. A. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: In vitro–in vivo relationships. **Life Sciences.**, v.79, p.1349-1356., 2006.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agric.**v. 80,p. 1094-1117, 2000.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig Dis Sci.**, v.46(2),p. 331-7, 2001

SANTOS, F. J. B. Constituintes químicos da fase hidroalcoólica e atividades antiinflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico de folhas da *Censotigma macrophyllum* Tul. Var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae). 2001. 148 f. **Dissertação** (Mestrado em Química). Universidade Federal do Piauí, Teresina.

SANTOS, M. Caracterização química das folhas de brócolis e couve-flor (*Brassica oleracea* L.) para utilização na alimentação humana. 2000. 130 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras. Lavras MG.

SANTOS, F. J. B. DOS; COSTA, A. F.; COSTA, C. L. S. DA; CHAVES, M. H. Constituintes químicos da *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Caesalpinaceae). **CD-ROM 24^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Poços de Caldas – MG, 2001a

SANTOS, N. R. Z.; TEIXEIRA, I. F. **Arborização de vias públicas: ambiente x vegetação**. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, 135p. 2001

SATO, H.; GENET, C.; STREHLE, A.; THOMAS, C.; LOBSTEIN, A.; WAGNER, A.; MIOSKOWSKI, C.; AUWERX, J.; SALADIN, R. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**., v.362, p.793-798., 2007.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**., v.57, p.s3-s9., 2008.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**., v.21, p.636-643., 2005.

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

SEDELIS, M.; SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**., v.125, p.109-125., 2001.

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

SEERAM, N. P.; ADAMS, L.S.; HENNING, S.M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **J. Nutr. Biochem**. v.16 (6), p. 360–7, 2005.

SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. **Gastroenterology**, v.126, p.903-913, 2004

SHIAN, W.; SASAKI, I.; KAMIYAMA, Y.; NAITO, H.; MATSUNO, S.; MIYAZAWA, T. The role of lipid peroxidation on gastric mucosal lesions induced by water-immersion restraint stress in rats. **Surgery Today**, v.30, p.49-53., 2000.

SHIN, V. Y. LIU, .; E. S. L .; KOO, M. W. L.; LUO, J. C.; SO, W. H. L.; CHO, C. H. Nicotine suppresses gastric wound repair via inhibition of polyamine and K⁺ channel expression. **European Journal Pharmacol.**, v.444, p.115-122, 2002.

SHIRWAIKAR, A.; SETTY, M.; BOMMU, P. Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* Buch.-Ham. stem bark extract against free radical induced nephrotoxicity in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.42, n. 7, p.686-690., 2004.

SIEGMUND, S. Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.17, n. 4, p.519-542., 2003.

SIERON, A.; KAWCZYK-KRUPKA, A.; GADOWSKA-CICHA, A. The role of free radicals in inflammatory states, ulceration, and ulcers of the stomach and duodenum. **Polski merkuriusz lekarski**, v.10, n. 56, p.113-116., 2001.

SILVA, H. R. Estudo químico e atividades antioxidante e espasmolítica de casca do caule da *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire (leguminosae-caesalpinoideae). 2006. 152 f. **Dissertação** (Mestrado em Química). Universidade Federal do Piauí, Teresina. (2006a).

SILVA, H. R.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; FERREIRA, J. H. L.; SOARES, M. J. S. Estudo químico e atividade antimicrobiana do extrato etanólico, frações e biflavonas da espécie *Cenostigma macrophyllum* Tul. **CD-ROM** da 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG, 2004.

SILVA, A. M. O.; BRITO, S. M. R. C.; ALMEIDA, F. R. C.; CHAVES, M. H.; COSTA, C. L. S. C.; CARVALHO, F. C. B. C.; SILVA, L. L. S.; BARROS, T. L.; PIAUILINO, A. Avaliação dos efeitos de *Cenostigma macrophyllum* na hiperalgesia diabética em ratos. In: XV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI, 2006, Teresina. **Resumos...** Teresina: XV Seminário de Iniciação Científica da UFPI, 2006b.

SILVA, H. R. E.; SOUSA, C. M. M.; CHAVES, M. H. Atividade antioxidante e fenólicos totais da *Cenostigma Macrophyllum* In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006c.

SILVA, M. I. G.; NETO, M. R. D. A.; NETO, P. F. T.; MOURA, B. A.; AMARAL, J. F. D.; SOUSA, D. P. D.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F. D. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.**, v.88, p.141-147., 2007.

SIMÕES, C. M. O. , SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P. de, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, pp 615-656. 2004.

SINGH, S.; KHAJURIA, A.; TANEJA, S. C.; KHAJURIA, R. K.; SINGH, J.; JOHRI, R. K.; QAZI, G. N. The gastric ulcer protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*, in rats. **Phytomedicine.**, v.15, p.408-415., 2008.

SIVAM, S. P.; NABESHIMA, T.; HO, I. K. Acute and chronic effects of pentobarbital in relation to postsynaptic GABA receptors: a study with muscimol. **Journal of Neuroscience Research.**, v.7, p.37-47., 2004.

SNEADER, W. Drug Discovery: a History, Wiley, Chichester, UK [9]. Enzo A. Palombo*. Phytochemicals from Traditional Medicinal Plants used in the Treatment of Diarrhoea: Modes of Action and Effects on Intestinal Function. **Phytotherapy Research.**, v.20, p.717-724., 2005.

SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. **Food Chemistry** v. 97, p. 524-530, 2006.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmagnosia.**, v.18, p.642-654., 2008.

SOUSA-JÚNIOR, P. T.; DALL'OGGIO, E. L.; DA SILVA, L. E.; FIGUEIREDO, U. S.; VIEIRA, P. C.; MACHADO, H. V.; DOS SANTOS, L. G. Gênero *Acosmium*: composição química e potencial farmacológico. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v.19, p.150-157., 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Fabaceae (Leguminosae). *In: Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.* Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, São Paulo. p. 291-328,2005

SPENCER, C. M.; CAI, Y.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S. H.; GOULDING, P. N.; MAGNOLATO, D.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenol complexation-Some thoughts and observations. **Phytochemistry.**, v.27, p.2397-2409., 1988.

SRITHI, K.; BALSLEVB, H.; WANGPAKAPATTANAWONGA, P.; SRISANGAC, P.; CHUSIE, T. Medicinal plant knowledge and its erosion among the Mien (Yao) in northern Thailand. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.123, p.335-342., 2009.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85,p.367-370, 1985

STICKNEY, J.C.; NORTHUP, D.W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 101, p. 582, 1959.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vascular Pharmacology.**, v.46, p.412-418., 2007.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; VARALAKSHMI, P. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. **Life Sciences.**, v.78, p.1329-1335., 2006.

SULEYMAN, H.; ALBAYRAK, A.; BILICI, M.; CADIRCI, E.; HALICI, Z. Different Mechanisms in Formation and Prevention of Indomethacin-induced Gastric Ulcers. **Inflammation.**, 2010.

SUNITHA, S., NAGARAJ, M., VARALAKSHMI, P., Hepatoprotective Effect of Lupeol and Lupeol Linoleate on Tissue Antioxidant Defense System in Cadmium-induced Hepatotoxicity in rats, **Fitoterapia.** v. 72, p. 516-523, 2001.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*, v. 214, p. 200-202, 1981.

SZABO, S.; VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: Lessons from recent studies. **Journal of Physiology – Paris**, v.94, p.77-81, 2000.

TAKAHASHI, R. N.; DE LIMA, T. C.; MORATO, G. S. Pharmacological Actions of Tannic Acid; II. Evaluation of CNS Activity in Animals. **Planta medica.**, v.52, n. 4, p.272-275., 1986.

TAKEUCHI, K.; AIHARA, E.; SASAKI, Y.; NOMURA, Y.; ISE, F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E₂ and EP₁ receptors in acid-induced HCO₃⁻ secretion in stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology.**, v.57, n. 4, p.661-676., 2006.

TAKEUCHI, K.; UKAWA, H.; FURUKAWA, O.; KAWAUCHI, S.; ARAKI, H. S. Y.; ISHIKAWA, A.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptor subtypes involved in stimulation of gastroduodenal bicarbonate secretion in rats and mice. **Journal of Physiology and Pharmacology.**, v.50, p.155-167., 1999.

TANAKA, T.; GUTH, P.; TACHE, Y. Role of nitric oxide in gastric hyperemia induced by central vagal stimulation. **American Journal of Physiology.**, v.164, p.280-284., 1993.

TANI, S.; OKUDA, M.; MORISHIGE, R.; TANAKA, T. Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin.**, v.20, p.482-485., 1997.

TANI, S.; SAKURAI, Y.; KONDO, Y. Effects of tannins and some related compounds on ethanol-induced gastric lesions in rats. **Yakugaku Zasshi.**, v.106, p.347-349., 1986.

TERANO, A.; HIRAISHI, H.; OTA, S.; SHIGA, J.; SUGIMOTO, T. Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. **Gastroenterol.**, v.24, p.488., 1989.

TOMA, W.; TRIGO, J. R.; DE PAULA, A. C. B.; SOUZA-BRITO, A. R. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal ulcer on mice and rats. **Journal Ethnopharmacology**, v.95, p. 345-351, 2004.

UCHIDA, M.; KATO, Y.; MATSUEDE, K.; SHODE, R.; MURAOKA, A.; S., Y. Involvement of NO from nerves in diarrhea induced by castor oil in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology.**, v.82, p.168-170., 2000.

UMAMAHESWARI, M.; ASOKKUMAR, K.; RATHIDEVI, R.; T., S. A.; SUBHADRADEVI, V.; RAVI, T. K. Antiulcer and in vitro antioxidant activities of *Jasminum grandiflorum* L. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.110, p.464-470., 2007.

UMEZU, T.; MORITA, M. Evidence for the Involvement of Dopamine in Ambulation Promoted by Menthol in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences.**, v.91, p.125-135., 2003.

UNNO, T.; SUGIMOTO, A.; KAKUDA, T. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.93, p.391-395., 2004.

VASCONCELOS, S. M.; NASCIMENTO, V. S.; NOGUEIRA, C. R.; VIEIRA, C. M.; SOUSA, F. C.; FONTELES, M. M. Effects of haloperidol on rat behavior and density of dopaminergic D2-like receptors. **Behavioural Processes.**, v.63, p.45-52., 2003.

VAZQUEZ-RAMIREZ, R.; OLGUIN-MARTINEZ, M.; KUBLI-GARFIAS, C.; HERNANDEZ-MUNOZ, R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **World Journal of Gastroenterology.**, v.12, n. 27, p.4318-4324., 2006.

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

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25 (2), p. 273-286, 2002.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v.15, p.361-372., 2005.

VERPOORTE, R.; VAN-DER-HEVDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research.**, v.9, p.321-343., 2000.

VOGEL, H.G. Drug Discovery and Evaluation, **Pharmacological Assays**, 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, p. 435. 2002.

WADA, S.; IIDA, A.; TANAKA, R. Screening of triterpenoids isolated from *Phyllanthus flexuosus* for DNA topoisomerase inhibitory activity. **Journal of Natural Products.**, v.64, p.1545-1547., 2001.

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

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.**, v.15, n. 5, p.691-703., 2001.

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

WARWICK, M. C.; LEWIS, P., G. A revision of *Cenostigma*(Leguminosae – Caesalpinioideae –Caesalpinieae), a genus endemic to Brazil. **Kew Bulletin.**, v.64, p.135-146., 2009.

WEBER, R. C.; BOHR, D. F. Mechanism of membrane stabilization by calcium in vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology**, v.235, p.c227-c232., 1978.

WOLFE, M. M.; SACHS, G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology.** v.118(2), s.1, p. S9-31.

WONG, S. H.; CHO, C. H.; OGLE, C. W. Calcium and ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Pharmacology Research.**, v.23, p.11-19., 1991.

YADAV, A. V.; NADE, V. S. Anti-dopaminergic effect of the methanolic extract of *Morus alba* L. leaves. **Indian Journal of Pharmacology.**, v.40, n. 5, p.221-226., 2008.

YANO, S.; HARADA, M.; WATANABE, K.; NAKAMARU, K.; HATAKEYAMA, Y.; SHIBATA, S.; TAKAHASHI, K.; MORI, T.; HIRABAYASHI, K.; TAKEDA, M. Antiulcer activities of glycyrrhetic acid derivatives in experimental gastric lesion models. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. v. 37(9), p.2500-4., 1989

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic Ulcer Disease Today. **Nat Clin Pract. Gastroenterol. Hepatol.** v.;3(2), p.80-89. 2006

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais:** sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. 523 p.

ZÁDORI, Z. S.; SHUJAA, N.; FÜLÖP, K.; DUNKEL, P.; GYIRES, K. Pre- and postsynaptic mechanisms in the clonidine- and oxymetazoline-induced inhibition of gastric motility in the rat. **Neurochemistry International**, v. 51(5),p. 297-305, 2007.

ZARUCHI, J. L. **Phytochemical Dictionary of the Leguminosae.** London: Chapman & Hall, 1994. 1180 p.

10 ANEXOS

10.1 Artigo.

LIRA, SRS; RAO, VS; CARVALHO, AC; GUEDES, M.M; MORAIS, T.C; SOUZA, AS; TREVISAN, M.T.S; LIMA, A.F; CHAVES, M.H; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism. **Inflammopharmacology**, v.17, p.221-228, 2009.

10.2 Publicação na mesma linha de pesquisa:

GUEDES, M.M; CARVALHO, A.C.S; LIMA, A.F.L; LIRA, S.R.S; QUEIROZ, S.S; SILVEIRA, E.R; SANTOS, F.A; RAO, V.S. Gastroprotective Mechanisms of Centipedic Acid, a Natural Diterpene from *Egletes viscosa* LESS. **Biol. Pharm. Bull**, v. 31, p.1351-1355, 2008.

10.3 Publicação em linha de pesquisa afim (produtos naturais):

Rabelo, A.f.l; gUEDES, m. m; TOMÉ, a.r; LIMA, P.R; Maciel, M.A; LIRA S.R.S; Carvalho, A.C.S; Santos, F.A; Rao, V.S. Vitamin E Ameliorates High Dose *trans*-Dehydrocrotonin-Associated Hepatic Damage in Mice. **Natural Product Communications**, v.5 (4), p.507-666, 2010

Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism

Silvêria Regina de S. Lira · Vietra Satyanarayana Rao · Ana Carla S. Carvalho ·
 Marjorie M. Guedes · Talita C. de Moraes · Antonia L. de Souza ·
 Maria Teresa S. Trevisan · Alana F. Lima · Mariana H. Chaves ·
 Flávia A. Santos

Received: 23 March 2009 / Accepted: 29 June 2009 / Published online: 16 July 2009
 © Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland 2009

Abstract The effects of lupeol on ethanol-induced gastric damage were evaluated by quantification of changes in mean gastric lesion area, quantification of mucosal non-protein sulfhydryls (NP-SH), and characterized using drugs that influence the endogenous prostaglandins, α_2 -adrenoceptors, nitric oxide, K_{ATP} -channels, and intracellular calcium. Orally administered lupeol (3, 10, and 30 mg/kg) significantly and dose-dependently attenuated the ethanol-induced gastric damage by 39–69%, whereas the positive control *N*-acetylcysteine (NAC, 300 mg/kg, i.p.) afforded 32% protection. Both lupeol and NAC restored the NP-SH depleted by ethanol but the lupeol effect was only marginal. Lupeol gastroprotection was attenuated by indomethacin and L-NAME, the respective COX and NO-synthase inhibitors and was weakly sensitive to α_2 -adrenergic antagonist yohimbine and K_{ATP} -channel blocker glibenclamide, but more profoundly to calcium blocker verapamil. These pharmacological effects of lupeol

are discussed in the context of the underlying mechanisms.

Keywords Lupeol · Pentacyclic triterpene · Ethanol-induced gastric injury · Gastroprotection · Sulfhydryls · Prostaglandins · Nitric oxide · K_{ATP} -channels

Introduction

Plant-originated substances like flavonoids, terpenoids, tannins, xanthonoids etc. are highly gastroprotective that function via several different mechanisms, which include an increase in gastric mucus, activation of endogenous prostaglandins (PGs), and nitric oxide (NO) generation, antioxidant, and anti-*Helicobacter* effects (Arrieta et al. 2003; Zayachkivska et al. 2004; Hamaishi et al. 2006; Ustün et al. 2006; Carvalho et al. 2007). Being natural and dietary components, these phytoconstituents may act as gastroprotectives and serve as adjuncts to combat gastrointestinal toxicities associated with the therapeutic use of non-steroidal anti-inflammatory and anticancer agents. Lupeol (Lup-20(29)-en-3H-ol) (Fig. 1), is a dietary pentacyclic triterpene found in fruits, vegetables, and several medicinal plants (Imam et al. 2007; Martelanc et al. 2007; Prasad et al. 2007; Nguemfo et al. 2009). Experimental studies indicate that lupeol has a wide range of medicinal properties that include strong antioxidant, hepatoprotective, antimutagenic, anti-inflammatory, antiarthritic, and antitumor effects. (Recio et al. 1995; Saleem et al. 2004; Saleem et al. 2005; Lee et al. 2007; Nguemfo et al. 2009; Zhang et al. 2009). Interest in developing lupeol-based potent anti-neoplastic agents, has led to the discovery of a host of highly active derivatives exhibiting greater potencies and better therapeutic indices against cancers of the

S. R. de S. Lira · V. S. Rao (✉) · A. C. S. Carvalho ·
 M. M. Guedes · T. C. de Moraes · A. F. Lima · F. A. Santos
 Department of Physiology and Pharmacology,
 Federal University of Ceará, Rua Cel Nunes de Melo-1127,
 Caixa Postal-3157, Fortaleza, CE 60430-270, Brazil
 e-mail: vietrao@ufc.br

A. L. de Souza · M. T. S. Trevisan
 Department of Organic and Inorganic Chemistry,
 Federal University Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

M. H. Chaves
 Department of Chemistry,
 Federal University of Piauí,
 Teresina, Brazil

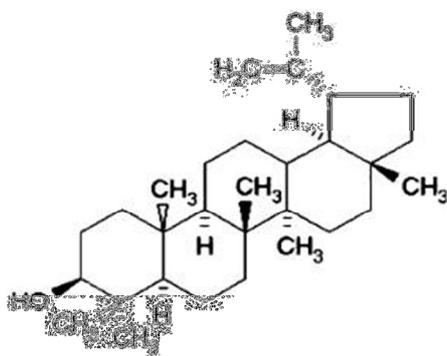


Fig. 1 Chemical structure of lupeol

skin, prostate, breast, lung, and liver, by reducing oxidative stress (Chaturvedi et al. 2008; Khan et al. 2008).

It is well established that acute administration of ethanol to rodents produces intense damage in gastric mucosa by promoting intracellular oxidative stress and mitochondrial permeability transition, inhibition of prostaglandins, disturbances in microcirculation, and sympathetic activation (Robert et al. 1979; Jaatinen et al. 1995; Kay et al. 2000; Abdel-Salam et al. 2001; Das and Vasudevan 2007). Thus, multiple factors appear to involve in the pathogenesis of ethanol-induced gastric injury and is therefore considered a preferred animal model in screening compounds for the potential gastroprotective activity. Since therapeutic use of NSAIDs and chemotherapeutics are invariably associated with gastric intolerance and past studies point out the utility of lupeol as a therapeutic and chemopreventive agent for the treatment of inflammation and cancer, the present study has the objective to assess its gastroprotective potential against ethanol-induced gastric damage and to characterize the underlying mechanism.

Materials and methods

Animals

Male Swiss albino mice (20–25 g) and male Wistar rats (150–160 g) obtained from the Central Animal House of Federal University of Ceará were used. They were housed in environmentally controlled conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-h light–dark cycle), with free access to standard pellet diet (Purina do Brasil LTDA., São Paulo, Brazil) and water ad libitum. Animals were kept in cages with raised floors to prevent coprophagy. They were fasted over a period of 15 h and were habituated to the test environment for 2 h before the experimentation. The experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of

the Federal University of Ceará in accordance with the ethical guidelines of National Institute of Health, Bethesda, USA.

Chemicals and drugs

Lupeol was isolated from the stem bark of *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae-Caesapinoideae) as per procedures described earlier (Rocha e Silva et al. 2007). Absolute ethanol (EtOH) was obtained from BDH, UK; *N*^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), *N*-acetylcysteine (NAC) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA); Verapamil was obtained from Merck Sharp & Dohme, Brazil; verapamil hydrochloride from Dilacorone[®], Knoll, Brazil and misoprostol from Cytotec[®], Continental Pharma, Italy, respectively. All the reagents used were of analytical grade (Merck, Brazil).

Lupeol was first dissolved in 2% Tween 80 and subsequently diluted in distilled water. Other drugs were dissolved either in physiological saline or distilled water. Drug concentrations were adjusted for treatment to give a volume of 10 ml/kg. In pilot studies 2% Tween 80 (vehicle) demonstrated no effect per se or influence on the ulcerogenicity of ethanol.

Ethanol-induced gastric lesions in mice

Acute gastric lesions were induced in mice ($n = 8/\text{group}$) by intragastric administration of absolute ethanol (96%) in a volume of 0.2 ml using an orogastric metal tube. Lupeol at doses of 3, 10, or 30 mg/kg were given orally 1 h prior to the application of ethanol. Vehicle (2% Tween 80)-treated and NAC (300 mg/kg, i.p.)-treated animals were included as respective negative and positive controls. Thirty minutes later, the animals were killed by cervical dislocation, the stomach was removed and washed in normal saline. Subsequently, the stomach was incised along the greater curvature and the lengths of the necrotizing lesions were measured by planimetry, using a transparent grid examined at magnification by two independent observers unaware of the treatments. The lesion area in each animal was measured in mm^2 and was expressed in percentage (%) in relation to total area of corpus.

Estimation of non-protein sulfhydryls (NP-SH)

Since ethanol treatment results in depletion of NP-SH (Szabo et al. 1981), their levels in gastric tissue were analyzed by spectrophotometric methods to study the nature of gastroprotection by lupeol. Mice in groups were pretreated with lupeol (30 mg/kg, p.o.), *N*-acetylcysteine (300 mg/kg, i.p.), or vehicle (2% Tween 80) 60 min before

ethanol. A normal control group that received only saline but not ethanol was also included. Thirty minutes after ethanol, the animals were killed and a glandular segment from each stomach was homogenized in 5 ml ice-cold sodium EDTA (0.02 M, pH 8.9). Reduced glutathione (NP-SH) in stomach homogenates, determined based on the development of a yellow color when DTNB is added to compounds containing sulfhydryl groups was measured spectroscopically (Sedlak and Lindsay 1968). The absorbance values obtained at 412 nm were extrapolated from a glutathione standard curve and expressed in $\mu\text{g/g}$ of stomach tissue.

Effects of yohimbine, indomethacin, L-NAME, and glibenclamide pretreatments on lupeol gastroprotection

To characterize the lupeol gastroprotection against ethanol insult, separate experiments were realized to examine the role of α_1 -receptors, prostaglandins, nitric oxide, and K^+ channels activation on the gastroprotective effect of lupeol (30 mg/kg), using the appropriate agonists clonidine (0.1 mg/kg), misoprostol (30 $\mu\text{g/kg}$, p.o.), L-arginine (450 mg/kg, i.p.), and diazoxide (10 mg/kg, p.o.) and the corresponding antagonists, yohimbine (2 mg/kg, i.p.), indomethacin (10 mg/kg, p.o.), L-NAME (20 mg/kg, i.p.), and glibenclamide (5 mg/kg, p.o.) prior to the oral administration of 0.2 ml of ethanol (96%). The dose selection for these agonists and antagonists were based on our pilot experiments and on literature findings. In each case, animals were pretreated with the specific antagonist 30 min before the use of lupeol.

Effects of verapamil and calcium hydrochloride pretreatments on lupeol gastroprotection

To verify the role of intracellular calcium in the gastroprotective effect of lupeol against ethanol-induced mucosal damage, the influence of verapamil and/or calcium hydrochloride pretreatments were investigated. Mice in groups were treated with vehicle (control), lupeol (30 mg/kg, p.o.), verapamil (5 mg/kg, i.p.), calcium hydrochloride (50 mg/kg, i.p.), verapamil + lupeol, or verapamil + calcium hydrochloride. One hour after lupeol, 40 min after verapamil, or 30 min after calcium hydrochloride administration, all animals received 0.2 ml 96% ethanol by oral gavage. Thirty minutes later, the animals were killed, the stomachs excised and analyzed for gastric damage as detailed above.

Statistical analysis

The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman-Keul's test. The differences between groups were regarded as significant at $p < 0.05$.

was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman-Keul's test. The differences between groups were regarded as significant at $p < 0.05$.

Results

Effect of lupeol and *N*-acetylcysteine (NAC) on ethanol-induced gastric damage

The orally administered ethanol (96%, 0.2 ml/animal) to vehicle-treated control group of mice caused severe gastric mucosal damage in the form of hemorrhagic streaks generally parallel to the long axis of the corpus of the stomach. The lesion area (mm^2) expressed as percentage in relation to total area of gastric corpus in the control group was $25.39 \pm 2.25 \text{ mm}^2$ (Fig. 2). Pretreatment with lupeol at doses of 3, 10, and 30 mg/kg showed a dose-related protection against ethanol-induced gastric damage, by 38.4, 44.4, and 69.4%, respectively. NAC, a donor of sulfhydryls, included in this study as positive control inhibited the gastric injury by 32.4%.

Effect of lupeol on ethanol-induced changes in gastric NP-SH

Since 30 mg/kg lupeol offered a greater protection, this dose was selected to study its influence on ethanol-induced depletion of gastric NP-SH content in mice. Ethanol significantly depleted gastric NP-SH ($291.6 \pm 6.70 \mu\text{g/g}$) when compared to basal levels seen in controls that received only saline ($470.5 \pm 13.3 \mu\text{g/g}$). In contrast, ethanol-induced depletion of NP-SH was significantly less and almost restored to the basal level in group treated or *N*-acetylcysteine ($430.5 \pm 9.3 \mu\text{g/g}$), a sulfhydryl donor. Although statistically significant, lupeol effect was only

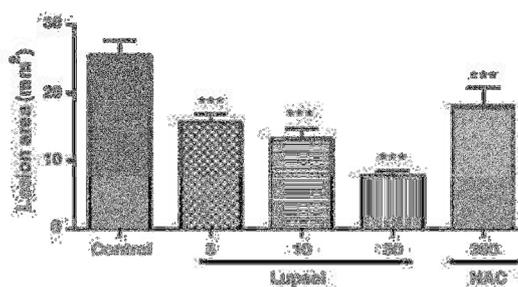


Fig. 2 Effect of lupeol and *N*-acetylcysteine (NAC) on ethanol-induced gastric injury in mice. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 8/\text{group}$). Animal groups were treated by oral gavage with the vehicle (lupeol diluent; 2% Tween 80, 10 ml/kg), lupeol (3, 10, and 30 mg/kg), or NAC (200 mg/kg, i.p.) before

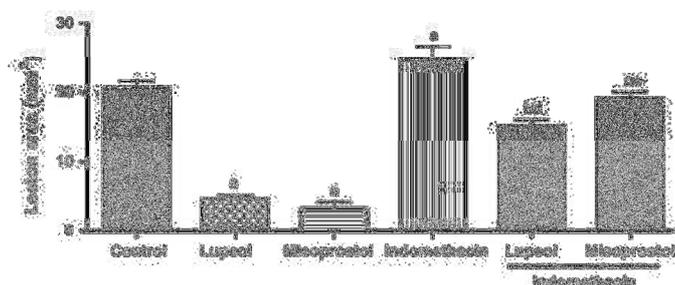


Fig. 3 Role of prostaglandins in the gastroprotective effect of lupeol against ethanol-induced gastric injury in mice. Animal groups were treated orally as follows: control (2% Tween 80, 10 ml/kg); lupeol (30 mg/kg); misoprostol (0.05 mg/kg); Indomethacin (10 mg/kg).

Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 8$ /group). ^a $p < 0.05$ vs. control; ^b $p < 0.05$ vs. lupeol alone; ^c $p < 0.05$ vs. misoprostol alone ^d $p < 0.05$ vs. indomethacin alone; ^e $p < 0.05$ vs. indomethacin alone (One-way ANOVA and Student Newman-Keul's test)

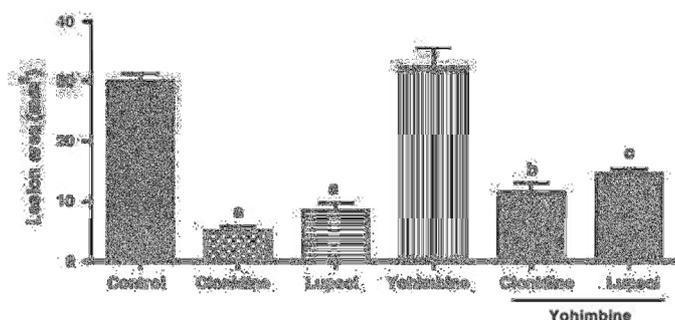


Fig. 4 Role of α_2 -adrenoceptors in the gastroprotective effect of lupeol against ethanol-induced gastric injury in mice. Animal groups were treated as follows: control (2% Tween 80, 10 ml/kg, p.o.); clonidine (0.1 mg/kg, i.p.); lupeol (30 mg/kg, p.o.); yohimbine (2 mg/kg, s.c.).

Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 8$ /group). ^a $p < 0.05$ vs. control; ^b $p < 0.05$ vs. clonidine alone; ^c $p < 0.05$ vs. lupeol alone (One-way ANOVA and Student Newman-Keul's test)

marginal in the restoration of NP-SH ($330.9 \pm 19.9 \mu\text{g/g}$) when compared to NAC.

Effect of yohimbine, L-NAME, indomethacin, and glibenclamide on lupeol gastroprotection

Like lupeol, all the tested agonists, misoprostol, clonidine, L-arginine, and diazoxide afforded gastroprotection to a variable extent against ethanol (96%)-induced gastric lesions in mice (Figs. 3, 4, 5, and 6). Pretreatment of mice with the non-selective NSAID inhibitor indomethacin (10 mg/kg, p.o.) alone slightly aggravated the ethanol lesion but in combination, it could moderately attenuate the gastroprotective effect of lupeol and of the prostaglandin analog misoprostol (Fig. 3). Pretreatments with the α_2 -adrenergic antagonist yohimbine (2 mg/kg, i.p.), the NOS inhibitor L-NAME (20 mg/kg, i.p.), or the K_{ATP} -channel blocker glibenclamide (3 mg/kg, p.o.) also resulted in the effective blockade of gastroprotection afforded by respective agonists clonidine, L-arginine, and diazoxide in

parallel with lupeol (Figs. 4, 5, and 6). However, at the test doses used, yohimbine and glibenclamide demonstrated a weak antagonism on lupeol gastroprotection.

Effects of verapamil and calcium hydrochloride pretreatments on lupeol gastroprotection

In mice pretreated with calcium hydrochloride (50 mg/kg, i.p.) and lupeol (30 mg/kg, p.o.) the ethanol-induced gastric mucosal lesions were significantly prevented (Table 1). Verapamil pretreatment worsened the ethanol-induced mucosal damage. Lupeol and calcium hydrochloride were able to antagonize the damaging effect of verapamil on ethanol.

Discussion

Our experimental data showed for the first time that lupeol, a pentacyclic diterpene affords gastroprotection against

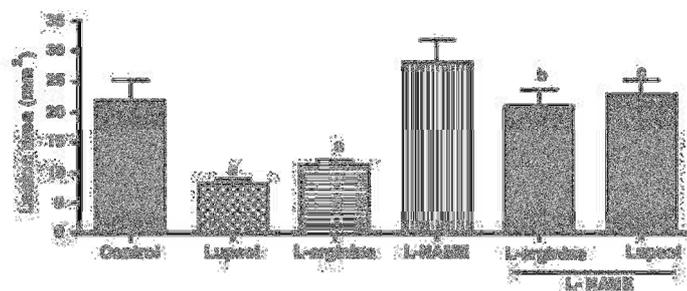


Fig. 5 Role of nitric oxide in the gastroprotective effect of lupeol against ethanol-induced gastric lesions in mice. Animal groups were treated with the vehicle 2% Tween 80 in distilled water (10 ml/kg, p.o.); lupeol (30 mg/kg, p.o.); L-arginine (450 mg/kg, i.p.); L-NAME

(20 mg/kg, i.p). The values are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$ /group). ^a $p < 0.05$ vs. control; ^b $p < 0.05$ vs. L-arginine alone; ^c $p < 0.05$ vs. lupeol alone (One-way ANOVA and Student Newman-Keul's test)

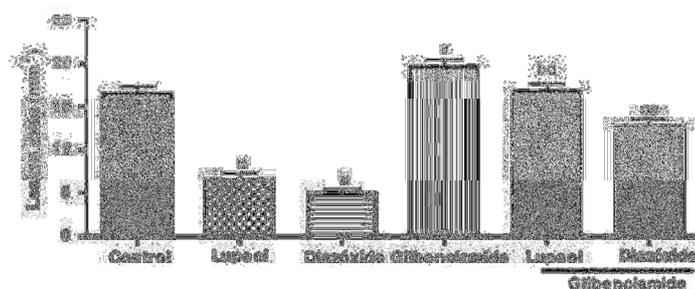


Fig. 6 Role of K_{ATP} -channels in the gastroprotective effect of lupeol against ethanol-induced gastric lesions in mice. Animal groups were treated with the vehicle 2% Tween 80 in distilled water (10 ml/kg, p.o.); lupeol (30 mg/kg, p.o.); diazoxide (3 mg/kg, i.p.); glibenclamide (3 mg/kg, i.p). The values are expressed as mean \pm SEM

($n = 8$ /group). ^a $p < 0.05$ vs. control; ^b $p < 0.05$ vs. lupeol alone; ^c $p < 0.05$ vs. diazoxide alone; ^d $p < 0.05$ vs. glibenclamide alone; ^e $p < 0.05$ vs. glibenclamide alone (One-way ANOVA and Student Newman-Keul's test)

absolute ethanol-induced damage. This observation is consistent with earlier reports on other triterpenes (Arrieta et al. 2003; Oliveira et al. 2004; Singh et al. 2008). The pathogenicity of ethanol is considered multifactorial and researches implicate the involvement of pro-inflammatory mediators (prostaglandins, leukotrienes, nitric oxide, and neuropeptides), intracellular thiols and calcium, hormonal factors (cholecystokinin, gastrin, leptin, and ghrelin), and growth factors (EGF and TGF), besides the sympathetic stimulation. Past studies, thus, highlight several mechanisms in ethanol-induced gastric mucosal damage, each of which is open for pharmacological manipulation.

One of the factors that play a central role in many pathways of alcohol-induced damage is oxidative stress that results from enhanced generation of reactive oxygen species. Intracellular antioxidant, such as glutathione (NP-SH/GSH) is critical for cellular protection in the gastric tissues. The GSH level was significantly lowered in ethanol-treated mice, consistent with earlier reports (Szabo et al. 1981; Robert et al. 1984) and depletion of GSH may

lead to oxidative stress. Lupeol with its free radical-scavenging property (Nguemfo et al. 2009) may have prevented in part the GSH depletion thereby affording gastroprotection from ethanol damage.

Prostaglandins (PGs) and nitric oxide (NO) are important mediators of mucosal defense in the stomach. NO interacts with neuropeptides and PGs to maintain mucosal integrity in basal conditions. Although inhibition of PGs or NO synthesis alone does not cause gastric damage, lesions appear if this treatment is combined with ablation of sensory neurons by capsaicin or with a non-ulcerogenic dose of indomethacin (Whittle et al. 1990). Nitric oxide (NO), produced via activity of NO-synthase (NOS), appears to be one of the major factors, involved in the regulation of the gastric blood flow (GBF) and gastric microcirculation (Wallace 2006). Studies indicate that NO-releasing drugs protect against EtOH-induced gastric lesions, and conversely, inhibition of NO synthesis increases the susceptibility of the stomach to ethanol injury (Kawano and Tsuji 2000). Therefore, it was of interest in this study to

Table 1 Role of calcium in the gastroprotective effect of lupeol against gastric mucosal lesions induced by ethanol

Group	Dose (mg/kg)	Percent gastric lesion area (mm ²)
Control	–	29.95 ± 3.53
CaCl ₂	50	6.19 ± 2.54 ^a
Lupeol	30	15.13 ± 3.39 ^a
Verapamil	5	31.03 ± 11.28 ^b
Verapamil + Lupeol	5 + 30	37.34 ± 5.90 ^{b,c}
Verapamil + CaCl ₂	5 + 50	15.63 ± 2.20 ^{a,d}

Data are presented as the mean ± SEM for 7 to 9 mice/group. All mice were pretreated with vehicle (control, 2% Tween 80, p.o.), calcium chloride (50 mg/kg, i.p.), lupeol (30 mg/kg, p.o.), or verapamil (5 mg/kg, i.p.) before the administration of 96% ethanol (0.2 ml/animal). Pretreatment periods for lupeol, verapamil, and calcium chloride administrations were in the order of 60, 40, and 30 min, respectively.

^a $p < 0.05$ vs. vehicle-treated control

^b $p < 0.05$ vs. verapamil

^c $p < 0.05$ vs. lupeol

^d $p < 0.05$ vs. CaCl₂ (One-way ANOVA and Student Newman-Keul's test)

verify the roles of PGs and NO in lupeol-associated gastroprotection.

Our results show that the ethanol-induced gastric damage could be largely prevented by lupeol as well as by misoprostol, a prostaglandin analog. However, the protection afforded by lupeol was only partially blocked by indomethacin, a non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor, suggesting participation of mechanisms other than prostaglandin inhibition operates. Since lupeol gastroprotection is in part vulnerable to indomethacin, a role for endogenous prostaglandins is suggested. However, in studies of Fernández et al. (2001), lupeol significantly reduced the PGE₂ production from A25187-stimulated macrophages in vitro and attenuated the mouse ear edema induced by 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol acetate (TPA) in vivo. TPA seems to induce COX-2 expression by altering NF-kappaB signaling pathway as well as the ornithine decarboxylase (ODC) expression in mouse skin (Park et al. 2008). Therefore, the ear edema suppression by lupeol must be a result of reduced PGE₂ formation. The mechanism of action of lupeol as an anti-inflammatory agent might be different from those of non-steroidal anti-inflammatory drugs, and unlike indomethacin, it demonstrated no ulcerogenic effect on a long-term use (Geetha and Varalakshmi 2001). Possibly, lupeol does not inhibit the house keeping constitutive enzyme (cCOX), in the stomach, which warrants a further study.

Reactive oxygen species generated by ethanol account for the NP-SH depletion causing an oxidative stress

(Terano et al. 1989) and the sympathetic stimulation (Jaatinen et al. 1995) that could impair PG and NO synthesis, affecting the mucosal blood flow and microcirculation (Abdel-Salam et al. 2001). It is likely that ATP-dependent potassium channels (K_{ATP}) may have a regulatory effect on the above factors (Peskar et al. 2002). In our study, the gastroprotective effect afforded by lupeol as well as that of *L*-arginine, the substrate for NOS is significantly blocked in mice pretreated with L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, suggesting that lupeol possibly prevents ethanol-induced vascular damage and restores gastric microcirculation. Moreover, lupeol gastroprotection mimicked the diazoxide, an ATP-sensitive potassium channel agonist and was inhibited by prior administration of glibenclamide, a blocker of K_{ATP}-channels. Since the protection afforded by lupeol is additionally indomethacin-sensitive, we assume that endogenous prostaglandins act as activators of K_{ATP}-channels and thus might contribute to enhanced gastric microcirculation. Studies indicate that absolute ethanol can induce sympathetic stimulation (Jaatinen et al. 1995) and the presynaptic α_2 -adrenoceptor agonist clonidine afford protection against ethanol-induced gastric damage, which could be antagonized weakly by non-selective antagonist, yohimbine and more efficiently by selective α_{2B} -adrenoceptor antagonist, prazosin (Fülöp et al. 2005). We therefore analyzed the possibility of α_2 -adrenoceptor involvement in lupeol gastroprotection. Lupeol, similar to clonidine afforded gastroprotection that could be reversed by yohimbine, suggesting an active role for α_2 -adrenoceptor. Nevertheless, the reversal by yohimbine of lupeol and clonidine gastroprotection appeared very weak, presumably due to the reason that we did not use a selective subtype receptor antagonist.

Next we verified the role of calcium in lupeol gastroprotection, since some studies suggest that intracellular calcium depletion in the gastric glandular mucosa may account for the ethanol ulceration and the ulcer-aggravating action of verapamil (Koo et al. 1986; Wong et al. 1991). Our results show that while calcium hydrochloride mimics the lupeol gastroprotection, verapamil, a calcium channel blocker prevents the gastroprotection afforded both by lupeol and by calcium hydrochloride, suggesting that altered gastric cell calcium levels could be closely related to the mucosal lesions produced by ethanol. It is likely that lupeol restores gastric tissue calcium to afford the gastroprotection, which requires a further study.

In conclusion, the results of this study suggest that lupeol, a pentacyclic terpenoid found in many fruits and vegetables affords gastroprotection. Lupeol demonstrates a wide spectrum of gastroprotective activity to overcome the ethanol insults on gastric mucosa, different from classical gastric cytoprotectives or antiulcer agents, with the distinct

advantage as disease modifier. Recent studies point out the utility of lupeol and its derivatives as potential therapeutic agents for the treatment of inflammation and cancer and the identification of its gastroprotective function may be of advantage in therapy.

Acknowledgments The study was supported by grants from CNPq (Process 301304/04-9 and 301317/2004-0), CAPES (PROCAL) and National Institute of Technology in Pernambuco (UNICAP) - Brazil. The authors thank Mr. Francisco A. Pereira for the excellent technical assistance.

References

- Abdel-Salam OA, Cechner J, Debnani A et al (2001) Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. *J Physiol (Paris)* 95:105-127
- Ariata J, Bealme F, Flores R et al (2003) Purification of gastroprotective ulmoponols from the stem bark of *Amphiperygium aduncum*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med* 69:905-909
- Cavvalho AC, Guedes MM, de Souza AL et al (2007) Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthone from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. *Planta Med* 73:1372-1376
- Chaturvedi PK, Bhui K, Shukla Y (2008) Lupeol: connotations for chemoprevention. *Cancer Lett* 263:1-13
- Das SK, Vasudevan DM (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci* 81:177-187
- Fernandez MA, de las Heras B, Garcia MD et al (2001) New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J Pharm Pharmacol* 53:1535-1539
- Filip K, Zádori Z, Révai AZ et al (2005) Characterisation of alpha2-adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying, gastric motility and gastric mucosal defence. *Eur J Pharmacol* 526:150-157
- Geetha T, Varalakshmi P (2001) Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol* 76:77-80
- Hamaishi K, Kojima R, Ito M (2006) Anti-ulcer effect of tea catechins in rats. *Biol Pharm Bull* 29:2206-2213
- Jain S, Azhar J, Hasan MM et al (2007) Two triterpenes lupanone and lupeol isolated and identified from *Tournefortia indica* Lam. *Pak J Pharm Sci* 20:125-127
- Jatinen P, Riithoja P, Haapaliina A et al (1995) Prevention of ethanol-induced sympathetic overactivity and degeneration by dexmedetomidine. *Alcohol* 12:439-446
- Kawano S, Tani S (2000) Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastrointestinal injury and protection. *J Gastrointest Hepatol* 13(Suppl):11-16
- Kay B, Granda K, Johnson S (2000) Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am J Obstet Gynecol* 182:682-688
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H (2008) Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Annu Rev Public Health* 29:375-399
- Lee TK, Poon RT, Wo JY (2003) Yunnan Bismarck alkaloid-induced gastric ulcers in rats. *Eur J Pharmacol* 120:355-358
- Lee TK, Poon RT, Wo JY (2007) Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor- κ B activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 67:8800-8809
- Martins M, Voz J, Stokovic B (2007) Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1164:145-152
- Nguyen EL, Diano T, Dongno AB et al (2009) Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of *Alseodaphne monticola* Standl L.C (Guttifera). *Indian J Pharmacology* 41:331-341
- Ortiz PA, Pardo M, Diaz JM, Chavez ML et al (2004) Gastroprotective effect of the mixture of lupeol and beta-sitosterol from *Protonis leucocoma*: role of capsaicin-sensitive sensory afferent neurons. *Planta Med* 70:780-782
- Park JH, Lee CK, Hwang YS et al (2006) Hemis inhibits cyclooxygenase-2 expression through nuclear factor- κ B activation and oxidized low-density lipoprotein in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-treated macrophages. *Mol Cell Biochem* 282:26-33
- Peaker SD, Barlow K, Peaker SA (2003) Role of ATP-sensitive potassium channels in neurokinin-mediated chemoprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 304:959-974
- Prasad S, Kala N, Shukla Y (2007) Neuroprotective effects of lupeol and its glycoside extract of *Sesuvium portulacastrum* in Swiss albino mice. *Mol Nutr Food Res* 51:352-359
- Rocio MC, Glaser RM, Mátiz S et al (1995) Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucocoma*. *Planta Med* 61:9-12
- Robert A, Nezama J, Lancaster C et al (1979) Cytoprotection by prostaglandins in rats. *Gastroenterology* 77:433-443
- Robert A, Eberle D, Kaplowitz N (1984) Role of glutathione in gastric mucosal cytoprotection. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 247:G296-G304
- Rocha e Silva H, Maria da Silva CC, Neto LBC et al (2007) Constituintes quinóides das cascas de casahuate, *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. *Quim Nova* 30:1877-1881
- Saleem M, Afaq F, Adhami VM et al (2004) Lupeol mediates NF- κ B and PI3 K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 23:5205-5213
- Saleem M, Kaur S, Kwon MH et al (2005) Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. *Carcinogenesis* 26:1956-1964
- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein-sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192-205
- Singh S, Khajuria A, Taneja SC et al (2008) The gastric ulcer-protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*. *Phytomedicine* 15:408-415
- Szabo S, Trier JS, Frankel PW et al (1981) Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* 214:200-202
- Tanaka S, Hirata H, Tani S et al (1989) Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. *J Gastroenterol* 24:488-492
- Ustün O, Özçelik B, Akyön Y et al (2006) Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *J Ethnopharmacol* 108:457-461
- Wallace JL (2006) Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxygenase and NO synthase in gastric cytoprotection. *Aliment Pharmacol Ther* 22:121-127
- Wallace JL, Lippman ME, Johnson S (1998) Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanooids and sensory neuropeptides in the rat. *British Journal of Pharmacology* 99:607-611
- Wong SH, Cho CH, Ogle CW (1991) Calcium and ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Pharmacological Research* 23:71-79

of plant-originated gastroprotective and antilucer substances on gastric mucosal repair. *Fiziol Zh* 50:118-127

inhibited growth, and induced apoptosis through down-regulation of DR3 in SMMC7721 cells. *Cancer investigation* 27:163-170

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)