



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

**DEIVE DE ANDRADE CAMPOS**

**EFEITO GASTROPROTETOR DA 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-  
[2'',3'':7,8]-cromenoflavona ISOLADA DE *Lonchocarpus araripensis*  
Bentham EM CAMUNDONGOS E POSSÍVEIS MECANISMOS**

**FORTALEZA – CE**

**2008**

**DEIVE DE ANDRADE CAMPOS**

**EFEITO GASTROPROTETOR DA 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-  
[2'',3'':7,8]-cromenoflavona ISOLADA DE *Lonchocarpus araripensis*  
Bentham EM CAMUNDONGOS E POSSÍVEIS MECANISMOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Almeida Santos

**FORTALEZA – CE**

**2008**

C211e Campos, Deive de Andrade

Efeito gastroprotetor da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona isolada de *Lonchocarpus araripensis* Bentham em camundongos e possíveis mecanismos / Deive de Andrade Campos. – Fortaleza, 2008.

122 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza – CE, 2008.

1. Flavonas. 2. Plantas medicinais. 3. Úlcera gástrica.  
I. Santos, Flávia Almeida (Orient.). II. Título.

CCD 615.1

**DEIVE DE ANDRADE CAMPOS**

**EFEITO GASTROPROTETOR DA 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-  
[2'',3'':7,8]-cromenoflavona ISOLADA DE *Lonchocarpus araripensis*  
Bentham EM CAMUNDONGOS E POSSÍVEIS MECANISMOS**

Essa dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

**Aprovada em: 18 / 01 / 2008**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Almeida Santos

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

---

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos

*Aos meus pais Sérgio Campos Lima e Eliane Andrade Campos, bases da minha vida, duas pessoas batalhadoras nas quais eu me espelho a cada minuto. Esta é mais uma oportunidade de dizer o quanto eu os amo e de agradecê-los por tudo, principalmente por terem me ensinado as duas principais qualidades de um homem: o caráter e a dignidade.*

*Em especial, ao meu grande amor, minha fonte inspiradora, Carolina Raquel, que sempre esteve ao meu lado, mesmo nos momentos difíceis, me incentivando e me fazendo acreditar sempre na realização desse sonho.*

*"A entrada para a mente do homem é o que ele aprende, a saída, é o que ele realiza. Se sua mente não for alimentada por um fornecimento contínuo de novas idéias, que ele põe a trabalhar com um propósito, e se não houver uma saída por uma ação, sua mente torna-se estagnada. Tal mente é um perigo para o indivíduo que a possui e inútil para a comunidade."*

Jeremias W. Jenks

*Aos meus irmãos Diêgo, Débora e Luis, que mesmo com todas as diferenças naturais de uma grande família, sempre me fizeram acreditar na importância do apoio fraterno para a busca de um ideal.*

*Ao meu grande avô, Isael Ferreira Gomes que, sentado ali no seu cantinho, mesmo sem entender direito, acompanhou, desde o começo e mais do que ninguém, todo meu esforço, dia após dia, em frente ao computador, em busca do meu objetivo.*

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **DEUS**, por dar-me força de vontade nessa caminhada, mesmo após tantas dificuldades, que, de certa forma, me fizeram crescer e aprender muito.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. **Flávia Almeida Santos** pela amizade, respeito, ensinamentos, conselhos e, principalmente, pela enorme dedicação na orientação deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. **Vietla Satyanarayana Rao**, por transferir, durante todos esses anos de convivência, parte de sua grande experiência profissional, contribuindo assim para a realização deste trabalho.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. **Otilia Deusdênia Loiola Pessoa** pelo fornecimento e análise do material químico utilizado nas pesquisas, pela amizade e colaboração no trabalho.*

*Aos meus grandes amigos **Ítalo, Johnnatann e Michael**, não só pelos vários momentos de alegria e descontração, mas também por terem sido pessoas companheiras e fiéis que, mesmo distantes, sempre me apoiaram e me deram força para que eu atingisse mais este degrau em minha vida.*

*Às técnicas de laboratório **Danyella e Marta** e aos bolsistas de Iniciação Científica **Daniel, Patrícia, Rafaela, Rhandell, Saulo, Sâmia e Tiago Melo** por não medirem esforços e se mostrarem sempre dispostos a ajudar a qualquer momento.*

*Aos grandes amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN), **Alana, Ana Carla, Caroline, Cinthya, Danilo, Iana, Marjorie, Otacílio, Silvéria e Tiago Olinda** pela agradável convivência durante todos esses anos e pela enorme assistência e dedicação conjunta em prol desta conquista.*

*À **Aura**, secretária da Pós-Graduação, e a todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.*

*Ao CNPq pelo suporte financeiro.*



## RESUMO

**EFEITO GASTROPROTETOR DA 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-cromenoflavona ISOLADA DE *Lonchocarpus araripensis* Bentham EM CAMUNDONGOS E POSSÍVEIS MECANISMOS.** Deive de Andrade Campos. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Almeida Santos. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2008.

A 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8,]-cromenoflavona (DDF), isolada da casca das raízes de *Lonchocarpus araripensis* Bentham (sin. *Derris araripensis*) (Leguminosae), popularmente conhecida como angelim, coção ou sucupira-branca, foi avaliada em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina em camundongos. DDF nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg, i.p., não foi capaz de promover sinais de toxicidade ou induzir mortalidade em camundongos. DDF (50, 100 e 200 mg/Kg, i.p.) reduziu significativamente, de maneira dose-dependente, as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto (0,2 mL/animal) em 62, 73 e 96 % respectivamente, com uma DE50 de 50,87 (38,36-67,46) mg/Kg. DDF (100 e 200 mg/Kg, i.p.) também reduziu significativamente as lesões gástricas induzidas por indometacina (30 mg/Kg, v.o.), com uma DE50 de 61,56 (42,29-89,60) mg/Kg. O mecanismo gastroprotetor da DDF foi analisado na sua dose de 100 mg/Kg, em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Em animais pré-tratados com L-NAME (20 mg/Kg, s.c.), um inibidor da óxido nítrico sintase, ou com glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.), droga bloqueadora de canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), o efeito gastroprotetor de DDF (100 mg/Kg, i.p.) foi inibido significativamente, sugerindo o papel do óxido nítrico e demonstrando uma provável ativação dos canais de potássio no efeito gastroprotetor da DDF. De forma semelhante, o efeito gastroprotetor de DDF (100 mg/Kg, i.p.) foi revertido, de forma significativa, em camundongos pré-tratados com indometacina (10 mg/Kg, v.o.), um inibidor não seletivo da ciclooxigenase, ou com capsazepina (5 mg/Kg, i.p.), um antagonista dos receptores vanilóides TRPV1, demonstrando assim o papel das prostaglandinas endógenas e sugerindo uma possível ativação de receptores TRPV1 no mecanismo de ação da DDF. A ação gastroprotetora da DDF (100 mg/Kg, i.p.) envolve, em parte, uma ação antioxidante uma vez que esta foi capaz de restabelecer, de forma parcial, mas significativa, os níveis de grupos NP-SH gástricos, que são depletados pelo etanol. Os dados obtidos sugerem que a DDF promove gastroproteção contra as lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina em camundongos, por mecanismos que incluem o envolvimento de prostaglandinas endógenas, óxido nítrico, ativação dos receptores TRPV1 e ou, dos canais de  $K_{ATP}$ , além de uma ação antioxidante.

Palavras chaves: *Lonchocarpus araripensis*, 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8,]-cromenoflavona, lesões gástricas, gastroproteção.

## ABSTRACT

**GASTROPROTECTIVE EFFECT OF THE 3,6-dimethoxy-6",6"-dimethyl-[2",3":7,8]-chromeneflavone ISOLATED FROM *Lonchocarpus araripensis* Benthham IN MICE AND POSSIBLE MECHANISMS.** Deive de Andrade Campos. Supervisor: Prof. Dr. Flavia Almeida Santos. Post-Graduate Programme in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, 2008.

The 3,6-dimethoxy-6",6"-dimethyl-[2",3":7,8,]-chromeneflavone (DDF) isolated from the root bark of *Lonchocarpus araripensis* Benthham (syn. *Derris araripensis*) (Leguminosae), popularly known as angelim, coção or sucupira-branca was evaluated in experimental models of gastric lesions induced by ethanol or indomethacin in mice. DDF, at intraperitoneal doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg, failed to produce any signs of overt toxicity or induce mortality in mice. DDF (50, 100 and 200 mg/kg, i.p.) significantly reduced the gastric mucosal lesions evoked by absolute ethanol (0.2 mL/animal), in a dose-related manner by 62, 73 e 96 % respectively, with an ED<sub>50</sub> of 50.87 (38.36-67.46) mg/Kg. DDF (100 and 200 mg/Kg, i.p.) also reduced significantly the indomethacin (30 mg/Kg, p.o.) -induced gastric lesions, with an ED<sub>50</sub> of 61.56 (42.29-89.60) mg/Kg. The gastroprotective mechanism of DDF was analysed against ethanol induced gastric damage at the dose of 100 mg/kg. In animals pretreated with L-NAME (20 mg/Kg, s.c.), a nitric oxide synthase inhibitor or glibenclamide (5 mg/Kg, i.p.), an ATP-sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>) channel blocker, the gastroprotective effect of DDF (100 mg/Kg, i.p.) was significantly antagonised, suggesting a role for nitric oxide and demonstrating a likely activation of K<sub>ATP</sub> channels in its gastroprotection. In addition, the gastroprotection afforded by DDF was also significantly reversed in mice pretreated with indomethacin (10 mg/Kg, p.o.), a non-selective cyclooxygenase inhibitor or capsazepine (5 mg/Kg, i.p.), a transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist, thus demonstrating a role for endogenous prostaglandins and suggesting a likely activation of TRPV1 receptors in the gastroprotective effect of DDF. Besides, DDF (100 mg/Kg, i.p.) gastroprotection may also be a result of an antioxidant action as evidenced by partial restoration of gastric NP-SH depleted by ethanol. From these results, it is concluded that DDF from *Lonchocarpus araripensis* roots affords gastroprotection by multiple mechanisms that include an antioxidant action, stimulation of endogenous prostaglandins, nitric oxide synthesis, and the activation of TRPV1 and K<sub>ATP</sub> channels.

Key words: *Lonchocarpus araripensis*, 3,6-dimethoxy-6",6"-dimethyl-[2",3":7,8,]-chromeneflavone, gastric lesions, gastroprotection.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

$\pm$	Mais ou menos
<	Menor
>	Maior
$^{\circ}\text{C}$	Grau (s) Centígrado (s)
%	Porcentagem
<b>A</b>	Alfa
<b>B</b>	Beta
®	Marca Registrada
$\mu\text{g}$	Micrograma (s)
$\mu\text{L}$	Microlitro (s)
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>Abs</b>	Absoluto
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>AINE<sub>s</sub></b>	Antiinflamatórios Não Esteróides
<b>AMPc</b>	Adenosina 3,5 – monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>C</b>	Carbono
$^{13}\text{C}$	Carbono 13
$\text{Ca}^{2+}$	Íons cálcio
<b>CCD</b>	Cromatografia de Camada Delgada
<b>CE</b>	Ceará
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano

<b>Cm</b>	Centímetro (s)
<b>Côa</b>	Coenzima A
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenase do tipo 1
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase do tipo 2
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>DAINE<sub>s</sub></b>	Drogas Antiinflamatórias Não Esteroidais
<b>DDF</b>	3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona
<b>DPU</b>	Doença Péptica Ulcerosa
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
<b>EM</b>	Espectrometria de massa
<b>eNOS ou NOS-III</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>E.P.M</b>	Erro padrão da média
<b>et al.</b>	...e colaboradores
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>G</b>	Gramas (s)
<b>GMPc</b>	Guanosina-3',5'-monofosfato cíclica
<b>GPX</b>	Glutathione peroxidase
<b>GSH</b>	Glutathione reduzida
<b>GSSH</b>	Glutathione oxidada
<b>h</b>	Hora (s)
<b><sup>1</sup>H</b>	Hidrogênio
<b>H<sup>+</sup></b>	Íons Hidrogênio
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>HP</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase</b>	Bomba de prótons
<b>H<sub>2</sub></b>	Receptores da Histamina

<b>IBP</b>	Inibidores de Bomba de Prótons
<b>iNOS ou NOS-II</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>K<sup>+</sup></b>	Íons potássio
<b>K<sub>ATP</sub></b>	Canais de Potássio ATP-dependentes
<b>Kg</b>	Kilograma (s)
<b>L</b>	Litro (s)
<b><i>L. araripensis</i></b>	<i>Lonchocarpus araripensis</i>
<b>LAEEt</b>	<i>Lonchocarpus araripensis</i> - extrato etanólico
<b>LAEH</b>	<i>Lonchocarpus araripensis</i> - extrato hexânico
<b>LAFA</b>	<i>Lonchocarpus araripensis</i> - fração acetato
<b>LAFD</b>	<i>Lonchocarpus araripensis</i> - fração dicloro
<b>LAFEt</b>	<i>Lonchocarpus araripensis</i> - fração etanol
<b>LAFH</b>	<i>Lonchocarpus araripensi</i> - fração hexano
<b>LAFHD</b>	<i>Lonchocarpus araripensis</i> - fração hexano-dicloro
<b>LA-SU-02</b>	<i>Lonchocarpus araripensis</i> - substância 02
<b>L-NAME</b>	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina-metilester
<b>L-NMMA</b>	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
<b>LTC<sub>4</sub></b>	Leucotrienos C <sub>4</sub>
<b>LTs</b>	Leucotrienos
<b>M</b>	Concentração molar
<b>Min</b>	Minuto (s)
<b>mL</b>	Mililitro (s)
<b>Mm</b>	Milímetro (s)
<b>N</b>	Número
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio

<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
<b>NE</b>	Noradrenalina
<b>Nm</b>	Nanômetro (s)
<b>nNOS ou NOS-I</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	<i>Nitric Oxide</i> – Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintases
<b>NP-SH</b>	Grupos sulfidrílicos não-protéicos
<b>Ns</b>	Não significativo
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>p-</b>	Posição “ <i>para</i> ” (anel benzeno)
<b>PGE1</b>	Prostaglandina E1
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PG’s</b>	Prostaglandinas
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>s.c.</b>	Subcutâneo
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TGI</b>	Trato gastrintestinal
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>TRPV1</b>	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>U.S.A</b>	<i>United States of America</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v.</b>	Volume
<b>v.o.</b>	Via oral

## LISTA DE QUADROS

---

<b>QUADROS</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>QUADRO 1</b>	Determinação do índice de lesões gástricas induzidas por indometacina.....	55

## LISTA DE FIGURAS

---

FIGURAS		PÁGINA
FIGURA 1	Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.....	35
FIGURA 2 - A	Fórmula estrutural condensada do núcleo 2-fenilcromona.....	38
FIGURA 2 - B	Arranjo espacial da molécula de 2-fenilcromona.....	38
FIGURA 3	Núcleo fundamental das flavonas.....	39
FIGURA 4	<i>Lonchocarpus araripensis</i> Bentham.....	44
FIGURA 5	Estrutura química dos compostos isolados de <i>L.araripensis</i> por Nascimento e Mors em 1980.....	45
FIGURA 6	Estrutura química dos novos compostos isolados de <i>L.araripensis</i> .....	47
FIGURA 7	Método de isolamento da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF).....	53
FIGURA 8	3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF).....	59
FIGURA 9	Efeito da DDF no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	62
FIGURA 10	Aspectos macroscópicos de estômago de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol.....	63
FIGURA 11	Efeito da DDF no modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.....	66
FIGURA 12	Aspectos macroscópicos de estômago de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina.....	67
FIGURA 13	Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	70
FIGURA 14	Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	73



<b>FIGURA 15</b>	Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	76
<b>FIGURA 16</b>	Papel dos receptores TRPV1 ( <i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i> ) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	79
<b>FIGURA 17</b>	Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	82

## LISTA DE TABELAS

---

TABELAS		PÁGINA
<b>TABELA 1</b>	Frações obtidas a partir do extrato hexânico (LAEH) da casca das raízes de <i>L. araripensis</i> .....	52
<b>TABELA 2</b>	Efeito da DDF no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	61
<b>TABELA 3</b>	Efeito da DDF no modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.....	65
<b>TABELA 4</b>	Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	69
<b>TABELA 5</b>	Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	72
<b>TABELA 6</b>	Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	75
<b>TABELA 7</b>	Papel dos receptores TRPV1 ( <i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i> ) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	78
<b>TABELA 8</b>	Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	81

# SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 Plantas Medicinais.....	21
1.2 Estômago.....	23
1.3 Doença Péptica Ulcerosa (DPU).....	26
1.3.1 Úlcera gástrica e os modelos animais.....	29
1.4 Produtos naturais e a relação com a gastroproteção.....	32
1.5 Metabolismo Vegetal.....	33
1.5.1 Flavonóides.....	34
1.5.1.1 Flavonas.....	38
1.6 A família Leguminosae.....	41
1.7 <i>Lonchocarpus araripensis</i> Bentham.....	43
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	48
2.1 Objetivo Geral.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48
<b>3. MATERIAIS</b> .....	50
3.1 Material Botânico.....	50
3.2 Animais experimentais.....	50
3.3 Drogas e Reagentes.....	50
3.4 Aparelhos.....	51
<b>4. MÉTODOS</b> .....	52
4.1 Obtenção da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF) a partir da casca das raízes de <i>Lonchocarpus araripensis</i> .....	52

4.2 Toxicidade aguda.....	54
4.3 Atividade Gastroprotetora.....	54
4.3.1 Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	54
4.3.2 Lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.....	55
4.3.3 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	56
4.3.4 Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	56
4.3.5 Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	57
4.3.6 Papel dos receptores TRPV1 ( <i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i> ) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	57
4.3.7 Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	58
4.4 Análise estatística.....	58
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
5.1 Identificação da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF).....	59
5.2 Toxicidade aguda.....	60
5.3 Efeito da DDF nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	60
5.4 Efeito da DDF nas lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.....	64
5.5 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	68

5.6 Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	71
5.7 Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	74
5.8 Papel dos receptores TRPV1 ( <i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i> ) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	77
5.9 Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	80
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>122</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Plantas Medicinais

Os seres vivos organizados sempre se voltaram para as plantas tentando corrigir certos distúrbios. Desde os primórdios, o homem soube usar com proveito os recursos medicamentosos que lhes eram propiciados por certas plantas escolhidas na abundante flora que o cercava. Os animais, sobretudo quando no seu meio natural, procuram espontaneamente os vegetais que lhes são benéficos, aliviando-lhes determinados males (CHATONET, 1979).

Em muitas civilizações antigas, a origem das plantas medicinais está relacionada ao poder divino. Segundo a mitologia hindu, quando o homem surgiu na Terra, o Deus Indra previu que os atos humanos desarmônicos podiam gerar males físicos e doenças. Pediu então a Brahma, o senhor absoluto, que insuflasse nas plantas o poder de curar. O pedido de Indra se realizou e foi assim que as plantas, até então todas semelhantes entre si, ganharam uma enorme diversidade de formas, aromas e virtudes terapêuticas. A mitologia grega conta que Apolo, compadecido ante o sofrimento que as doenças traziam aos homens, dotou as ervas de poderes curativos e transferiu esse conhecimento a seu filho Asclépio, Deus da Medicina, chamado de Esculápio pelos Romanos (BONTEMPO, 1990).

Povos como chineses, árabes, caldeus, egípcios, incas e muitos outros dominaram, no passado, os segredos da ação das plantas sobre o organismo humano. Na Idade Média e na Era Moderna, as escolas médicas só diplomavam aqueles que demonstrassem um profundo conhecimento sobre as plantas medicinais (YUNES et al., 2001).

A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade e, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química atualmente, boa parte das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal. Trinta por cento das novas substâncias químicas descobertas entre 1981 e 2002 são obtidos de produtos naturais. Outros 20 % dessas novas moléculas são produtos sintetizados mimetizando estruturas encontradas na natureza (NEWMAN et al., 2003; BALUNAS & KINGHORN, 2005). Entre 2001 e 2002 quase um

quarto dos fármacos mais vendidos no mundo foram obtidos diretamente ou derivados de fontes naturais (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

Baseados no conhecimento empírico sobre as propriedades terapêuticas de algumas plantas, desenvolveram-se alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina científica, como os digitálicos, quinina, morfina, atropina, aspirina entre outros (SIMÕES et al., 2003).

No Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS, 1989).

Apesar de a rica flora brasileira representar mais de 20 % das espécies de plantas medicinais conhecidas no mundo, pouco tem sido feito para estudar o seu potencial como fonte de novas moléculas ou de matérias-primas para preparações farmacêuticas. Cerca de 70 % dos recursos fitofarmacêuticos não foram suficientemente estudados, a fim de se obter a confirmação necessária sobre eficácia e segurança (PETROVICK, 1999). Embora o uso de produtos derivados de plantas venha crescendo ao longo dos anos e as grandes indústrias farmacêuticas tais como Glaxo, Boehringer, Sintex, Merck e CIBA possuam departamentos específicos dedicados ao estudo de novas drogas derivadas de fontes naturais, o uso potencial de plantas superiores como fonte de novas drogas tem sido pobremente explorado. Das cerca de 250 mil a 500 mil espécies de plantas estimadas, somente uma pequena percentagem tem sido investigada fitoquimicamente, e uma percentagem menor ainda tem sido apropriadamente estudada em termos de suas propriedades farmacológicas. Na maioria dos casos, somente um *screening* farmacológico ou estudos preliminares têm sido executados (HARVEY, 2000; RATES, 2001).

Nas últimas décadas, observou-se um aumento expressivo no mercado mundial dos medicamentos fitoterápicos, especialmente nos países industrializados. Este mercado é estimado em mais de US\$ 20 bilhões anuais, e somente na Europa, atinge a cifra de US\$ 7 bilhões ao ano sendo a Alemanha responsável por cerca de 50 % desse total (SIANI et al., 2003).

Diversos fatores têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal tais como a descoberta de drogas eficazes para o combate ao câncer, estudos sobre a biodiversidade e a preservação das espécies e a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, fazendo com que vias alternativas mais baratas sejam oferecidas. Por outro lado, a falta de informação e o mau uso dos medicamentos geralmente provocam o aparecimento de efeitos colaterais graves ou então o insucesso do tratamento, causando descrença na sua eficácia (CARVALHO, 2001).

Ao lutarmos por nosso próprio progresso, precisamos ter sempre em mente que não devemos destruir aquilo que nos ajuda a progredir. As plantas foram fiéis servidoras do homem desde os primórdios dos tempos. É difícil imaginar a farmácia ou a medicina sem os glicosídeos do gênero *Digitalis*, os alcalóides do ópio, os antibióticos de tetraciclina ou, a propósito, as antraquinonas da *Cassia angustifolia*. No entanto, sem as plantas, nem estes, nem muitos outros medicamentos tão usados jamais teriam existido. Já é hora de dar a nossa retribuição, ajudando as plantas a continuar ocupando seu lugar de direito no mundo, em que elas já existiam muito antes do *Homo sapiens*. Se falharmos nessa tarefa de conservação, os perdedores serão as farmácias e a humanidade (ROBBERS et al., 1997).

Atualmente, um dos principais alvos relacionados à pesquisa com plantas medicinais são os problemas gastrintestinais, principalmente os males associados ao sistema gástrico. A relação entre os produtos obtidos de fontes naturais e a gastroproteção é antiga e, constantemente, tem sido objeto de estudos incessantes em busca da substância com efeito terapêutico ideal.

## **1.2 Estômago**

O estômago é a maior dilatação do tubo digestivo, apresentando capacidade de um a dois litros e com forma bastante variada conforme a posição do indivíduo. A digestão enzimática é a principal função gástrica (CASTRO, 1985). Este importante órgão está em contato com a parede abdominal anterior, face visceral do lobo esquerdo do fígado e diafragma, que o separa do pericárdio e cavidade pleural esquerda. A parede anterior é completamente coberta por peritônio. Pósterio-inferiormente estão localizadas estruturas que



formam o “leito do estômago” compreendendo uma pequena parte do diafragma, glândula supra-renal esquerda, faces gástricas do baço e rim esquerdo e a face ântero-superior do pâncreas e do colo transversos (HAMILTON, 1982).

Anatomicamente, o estômago é dividido em inúmeras estruturas. O fundo gástrico é situado acima de uma linha horizontal traçada na porção inferior do esôfago e contém ar deglutido. Os dois terços restantes do órgão são denominados corpo do estômago. A porção mais distal compreende o antro pilórico, canal pilórico e piloro. Internamente sua membrana mucosa é rica em pregas, denominadas rugas, que se ramificam e, praticamente desaparecem quando o estômago está cheio (HAM, 1991).

Entre as diversas regiões do organismo o estômago é a que possui o ambiente mais peculiar principalmente pela quantidade elevada de ácido clorídrico (HCl), que mantém o pH na luz do estômago entre 0,9 e 2,0. Esse ambiente ácido, além de participar da digestão, desempenha um papel de extrema importância impedindo a entrada de muitos microrganismos e, portanto, protegendo o organismo de agentes infecciosos. No entanto, isso faz com que a mucosa estomacal e duodenal fique exposta à ação do ácido e da pepsina, responsáveis pelo início do processo de digestão (BIGHETTI et al., 2002).

O estômago secreta cerca de 2,5 litros de suco gástrico diariamente. As principais secreções exócrinas consistem em pepsinogênios, provenientes das células principais ou pépticas, e em HCl e fator intrínseco, provenientes das células parietais ou oxínticas. Três estímulos principais atuam sobre as células parietais: gastrina, acetilcolina (ACh) e histamina. A gastrina e a histamina são hormônios e a ACh é um neurotransmissor. O muco é secretado por células secretoras de muco encontradas entre as células superficiais por toda a mucosa gástrica. Ocorre também secreção de íons bicarbonato, que são retidos no muco, criando um gradiente de pH de 6-7 na superfície mucosa, mesmo com o pH na luz do estômago sendo extremamente ácido. O muco e o bicarbonato formam uma camada inerte semelhante a gel, que protege a mucosa contra o suco gástrico (RANG et al., 2004).

Em condições fisiológicas, existe no estômago um balanço entre os fatores agressores (HCl, pepsina, bile e enzimas pancreáticas) e os mecanismos gastroprotetores (muco-bicarbonato, fluxo sanguíneo e glutatona). Esses mecanismos podem ser classificados, pelo local de ação, em mecanismos de proteção pré-epitelial, epitelial ou subepitelial. A proteção

pré-epitelial é realizada pela barreira muco-bicarbonato. A proteção epitelial é dada pelos surfactantes (fosfolípidios anfóteros) que aumentam a hidrofobicidade das membranas biológicas, tornando-as resistentes aos agentes hidrofílicos agressores, tais como a aspirina. Juntamente com os surfactantes, os compostos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH, glutationa) constituem fatores importantes da proteção epitelial contra radicais livres. A proteção subepitelial é dada pelo fluxo sanguíneo, que suplementa nutrientes e oxigênio, além de remover íons hidrogênio e outros agentes nocivos. Recentemente, evidências experimentais têm enfatizado o papel do fluxo sanguíneo e, em particular a microcirculação na patogênese de injúrias na mucosa gástrica. Atribui-se o controle do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica às prostaglandinas (PG's) (ALPHIN et al., 1977; FORSELL, 1998).

Essa peculiaridade do sistema gastrointestinal faz com que o controle da secreção, da digestão e da produção de fatores citoprotetores seja de extrema complexidade, com a participação do sistema nervoso central, plexo mioentérico, sistema nervoso autônomo, hormônios, neurotransmissores e autacóides. Os neurônios entéricos secretam pelo menos uma dúzia de neurotransmissores cujas funções, da maioria deles, não são ainda totalmente conhecidas. ACh e a noradrenalina (NE) são os mais estudados e provavelmente os mais influentes sobre esse sistema, onde o primeiro estimula suas funções enquanto o outro inibe. A adrenalina liberada pela glândula adrenal também exerce efeitos inibitórios sobre o trato gastrointestinal (TGI). Adenosina trifosfato (ATP), serotonina (5-HT), dopamina, colecistocinina, substância P, peptídeo intestinal vasoativo, somatostatina, leu-encefalina, met-encefalina também são neurotransmissores liberados pelo plexo mioentérico onde alguns têm ações estimulantes e outras ações inibitórias. Um exemplo de sinalizador celular endógeno, o óxido nítrico (NO), também atua de forma efetiva nesse complexo sistema citoprotetor gástrico (GUYTON & HALL, 1996).

A maioria dos hormônios e neurotransmissores que atuam no sistema digestivo também possuem outras funções no organismo e, portanto, drogas que interagem com alguma dessas substâncias podem também exercer outras funções no organismo (CARVALHO, 2006).

As lesões e hiperacidez gástricas estão entre as mais importantes doenças em todo mundo. Como foi visto anteriormente, a mucosa gástrica está continuamente exposta a agentes potencialmente danosos, tais como HCl, pepsina, ácidos biliares, condimentos

alimentares, produtos bacterianos e medicamentos. Estes agentes estão implicados na patogênese das lesões gástricas, por promoverem aumento na secreção do ácido gástrico e pepsina, diminuírem o fluxo sanguíneo gástrico, suprimirem a produção endógena de PG's, inibirem a proliferação celular e o crescimento da mucosa além de alterarem a mobilidade gástrica (TOMA et al., 2002). As ulcerações ocorrem quando há um desequilíbrio causado tanto por aumento dos fatores agressores ou por diminuição da resistência gástrica (SAIRAM et al., 2002).

### 1.3 Doença Péptica Ulcerosa (DPU)

De acordo com o dicionário Aurélio, a palavra úlcera, que vem do latim *ulcuserisé*, significa uma solução de continuidade, aguda ou crônica, de uma superfície dérmica ou mucosa, e que é acompanhada de processo inflamatório.

A úlcera é definida como uma abertura na mucosa do trato digestivo, que se estende através da musculatura da mucosa à submucosa ou mais profundamente (THOMOPOULOS et al., 2004).

Úlcera péptica ou doença péptica ulcerosa é uma denominação genérica, comumente utilizada para designar as úlceras que surgem principalmente no estômago e no intestino, com tecido aparente. Gastrite ou duodenite podem gerar úlceras pépticas. As úlceras esofágicas, mesmo sendo raras, também podem ser consideradas úlceras pépticas.

Podemos definir a DPU como sendo uma doença inflamatória crônica do estômago e duodeno que, apesar da baixa mortalidade que lhe está associada, afeta de forma apreciável a qualidade de vida dos doentes e implica elevados custos econômicos, diretos e indiretos (MARTINS et al., 2005).

Do ponto de vista epidemiológico, a úlcera péptica é uma doença extremamente dinâmica. Sua prevalência é difícil de ser estimada, devido à subjetividade dos sintomas e à semelhança do quadro clínico com os vários tipos de dispepsia. A maioria dos estudos epidemiológicos baseia-se em estatísticas obtidas a partir de atendimentos médicos,

hospitalizações, cirurgias e óbitos, dados estes sujeitos a críticas, como não-representativos de todo o espectro da doença ulcerosa. Hoje, existem dados demonstrando que a diferença de prevalência da úlcera péptica entre os homens e mulheres se apresenta em declínio, evidenciando que esta doença ainda representa um grande problema de saúde. Apesar de ser uma doença extremamente freqüente, não se conhece de modo preciso sua real incidência na população brasileira. Nas diferentes estatísticas, a incidência de úlcera péptica no Brasil varia de 1 a 20 %, o que reflete tão somente diferenças na coleta dos dados, nos critérios de diagnóstico e na variação das populações estudadas. Atualmente, estudos mostram que as úlceras pépticas afetam cerca de 10 % da população mundial. (VERAS, 2007).

A úlcera péptica era, até recentemente, considerada uma doença de etiologia desconhecida, de evolução em geral crônica, com surtos de ativação e períodos de acalmia, resultantes de perda circunscrita de tecido em regiões do trato digestivo capazes de entrar em contato com a secreção cloridropéptica do estômago (COELHO et al., 2005).

Em 1982, Warren e Marshall isolaram uma bactéria presente na parede do estômago, mais tarde denominada *Helicobacter pylori* (HP), que demonstraram estar relacionada com o desenvolvimento e recidiva da úlcera duodenal e da úlcera gástrica, bem como com a gastrite do antro (NIH CONSENSUS CONFERENCE, 1994). A identificação e isolamento do *Helicobacter pylori* proporcionou um enorme desenvolvimento no conhecimento acerca da úlcera péptica (MARSHALL & WARREN, 1984).

A infecção gástrica pelo HP é hoje responsável por mais de 95 % dos casos de úlcera duodenal e 80 % dos portadores de úlcera gástrica (MÉGRAUD, 1993). O HP é uma bactéria gram-negativa adquirida na infância e adaptada à vida no estômago humano cuja prevalência varia entre 15 e 90 % e aumenta com a idade sendo mais elevada nas populações do Sul da Europa e África, comparativamente à das populações do Norte da Europa e da América do Norte (KORMAN, 1990; SOARES et al., 1993; MARQUES et al., 1996; BLASER, 1998; CANHOTO, 1998; SILVA et al., 1998; BROUTET et al., 1999; MCMANUS, 2000; HOFFMAN et al., 2001; JARDIM et al., 2001; SUERBAUM & MICHETTI, 2002).

Outra etiologia associada à úlcera péptica é o consumo de antiinflamatórios não esteróides (AINEs) cujo efeito agressivo sobre a mucosa gastro-duodenal, por ação tóxica, sistêmica ou entero-hepática, é bem conhecido. O uso destes medicamentos foi detectado em

cerca de 40 % dos doentes com úlcera péptica e constitui a segunda forma mais comum de doença ulcerosa, especialmente na população mais idosa, embora 85 % destas úlceras não tenham impacto relevante na clínica. A incidência dos efeitos gastrintestinais graves e potencialmente fatais (hemorragia e perfuração) é de cerca de 2 % por ano, podendo atingir 10 % em utilizadores de AINEs que acumulem outro fator de risco acrescido para gastropatia (BRAZER et al., 1990). Mais raramente, outras etiologias podem estar associadas como gastrinoma (Síndrome de Zollinger-Ellisson) e forma duodenal de doença de Crohn (HARRIS & MIZIEWICZ, 2001).

Em relação à sintomatologia da úlcera péptica, o conceito tradicional do padrão doloroso baseia-se na assertiva de que a acidez gástrica produz dor e sua neutralização a alivia. É por todos conhecida a dor epigástrica, tipo queimação, com ritmicidade, ou seja, com horário certo para seu aparecimento, guardando íntima relação com o ritmo alimentar, ocorrendo 2 a 3 horas após a alimentação ou à noite, e cedendo com o uso de alimentos ou alcalinos. Um fator discriminante importante é a ocorrência de dor noturna, acordando o paciente à noite, entre meia-noite e 3 horas da manhã. Tal sintoma aparece em aproximadamente 2/3 dos ulcerosos duodenais, mas é também encontrado em pacientes dispépticos funcionais. Importante salientar ainda o caráter periódico da dor epigástrica, durando vários dias ou semanas, desaparecendo a seguir por semanas ou meses, para reaparecer meses ou anos depois, com as mesmas características anteriores. A sensibilidade e a especificidade dos sintomas clínicos para o diagnóstico de úlcera péptica variam de país para país (PETERSEN et al., 1988).

Estudos mostram que 30 % a 40 % dos pacientes portadores de úlcera péptica têm familiares de primeiro grau acometidos pela doença. Quando não tratada, as complicações podem ocorrer em até 30 % dos pacientes e incluem a hemorragia digestiva alta (20 %) manifestada por melena, hematêmese ou por perda de sangue oculto nas fezes, a perfuração (6 %) e a obstrução piloro-duodenal (4 %). Curiosamente, em 10 % dos ulcerosos a hemorragia é a primeira manifestação da doença e, em um terço dos pacientes com úlcera perfurada, o episódio perfurativo constituiu o primeiro sintoma da doença (COELHO, 1998).

A confirmação diagnóstica da úlcera péptica é realizada através da endoscopia digestiva alta que, além de mais sensível que a radiologia, permite a realização de biópsias (COTTON & SHORVON, 1984). Os testes de secreção gástrica, dosagem de gastrina sérica e

ecoendoscopia são utilizados apenas em situações especiais ou em ambiente de investigação clínica. Paralelo ao diagnóstico da lesão ulcerosa, impõe-se a pesquisa da presença do HP, que pode ser efetuada durante o procedimento endoscópico, por pesquisa histológica ou pelo teste da urease, ou por meios não invasivos como o teste respiratório com uréia marcada com carbono 13 ou 14, determinação de antígenos fecais e por testes sorológicos com a pesquisa de anticorpos anti-HP (COELHO, 2002).

### **1.3.1 Úlcera gástrica e os modelos animais**

Como vimos anteriormente, as úlceras pépticas se diferem quanto a sua localização. As principais são as que surgem no estômago e no duodeno. Úlceras localizadas no estômago são chamadas úlceras gástricas ou úlceras estomacais, enquanto as úlceras na primeira parte do duodeno são conhecidas como úlceras duodenais.

As úlceras gástricas podem ser lesões agudas ou crônicas. A úlcera gástrica crônica, geralmente é solitária, que pode ocorrer em outras regiões do TGI exposto à ação agressiva dos sucos ácidos. Podem ocorrer, também, as lesões agudas gástricas que variam em profundidade com interrupção e desprendimento do epitélio superficial (gastrite erosiva aguda), às lesões profundas que envolvem toda a espessura da mucosa se aprofundando além da muscular da mucosa (úlcera gástrica aguda) (BERK et al., 1991). Nas formas mais graves da doença, pode haver sangramento ou perfuração da parede gástrica com extravasamento de líquido gástrico para o saco peritoneal (THOMOPOULOS et al., 2004).

Modelos experimentais utilizando o sistema digestivo, ou partes dele, podem ser de grande utilidade para a descoberta de novas drogas. Modelos experimentais de úlcera gástrica e de secreção estomacal têm custos relativamente baixos, pois necessitam basicamente de animais de laboratório e algumas drogas (CARVALHO, 2006).

Nas diferentes espécies animais a distribuição quantitativa e qualitativa das unidades celulares funcionais gástricas é variada. Apesar disso, no que se refere à ativação da bomba de prótons que promove a secreção de íons  $H^+$  para o lúmen gástrico em troca de íons  $K^+$ , elas mostram o mesmo mecanismo de regulação intracelular quando comparadas às células

gástricas das diferentes espécies (histamina – Adenosina 3,5 monofosfato cíclico (AMPC), acetilcolina ou gastrina –  $\text{Ca}^{+2}$  –  $\text{IP}_3$ ) (BERNE et al., 2004).

As investigações sobre a doença péptica gástrica e duodenal tiveram grandes avanços nas últimas duas décadas devido à descoberta de várias técnicas que facilitaram o estudo da mucosa gástrica (BRZOZOWSKI et al., 2003). As lesões na mucosa gástrica podem ser induzidas por diferentes modelos experimentais, e cada um com seu próprio mecanismo (SAMONINA et al., 2004).

Dentre os principais modelos utilizados na pesquisa farmacológica, temos: lesão gástrica induzida por etanol e etanol acidificado (ROBERT et al., 1979; SCMEDA et al., 2002), lesão gástrica induzida por indometacina (RAINSFORD, 1982), lesão gástrica induzida por estresse (TAKAGI et al., 1964; TAKAGI & OKABE, 1968), método da ligadura pilórica (VISSHER et al., 1954), determinação do muco da mucosa gástrica (CORNE et al., 1974) e efeito sobre a motilidade gastrintestinal (STICKNEY & NORTHUP, 1959).

A lesão gástrica por etanol é um modelo extensamente utilizado para avaliação experimental de drogas antiulcerogênicas (PANDIAN et al., 2002). As lesões ocorrem predominantemente na parte glandular do estômago com formação de leucotrienos C4 (LTC4), espécies reativas do oxigênio, produtos secretados pelos mastócitos, diminuição do muco e depleção de grupamentos sulfidrílicos, resultando em danos à mucosa gástrica (RAO et al., 2004). Este modelo possui fundamental importância para a pesquisa científica no que concerne ao fato de podermos avaliar possíveis mecanismos pelos quais as substâncias podem atuar promovendo gastroproteção.

A mucosa gástrica normalmente contém altas concentrações de glutatona reduzida (GSH) que, atuando como antioxidante, desempenha papel importante na manutenção da integridade da mucosa no estômago. Como foi visto anteriormente, as lesões por etanol estão também associadas com diminuição significativa dos níveis de GSH na mucosa gástrica (PONGPIRIYADACHA et al., 2003). Os tióis endógenos, como GSH, por exemplo, são capazes de ligar-se a radicais livres e prevenir a formação das lesões produzidas por vários agentes ulcerogênicos, funcionando assim como um agente gastroprotetor (MAITY et al., 2001). Várias enzimas antioxidantes, tais como a glutatona peroxidase, estão envolvidas na

eliminação de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica, sendo também importantes para a proteção celular (LA CASA et al., 2000).

Outro modelo bastante utilizado é a úlcera induzida por indometacina. Administração intraperitoneal de indometacina reduz, de forma significativa, a secreção de PG's, bicarbonato e o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica em animais experimentais. A inibição das PG's predispõe o estômago e o duodeno à danos na mucosa, enquanto o estímulo das PG's pode exercer um papel de proteção. Assim, o efeito antiulcerogênico citoprotetor de uma droga pode ser mediado pelas PG's endógenas (SZABO & SZELENYI, 1987; TAN et al., 2002).

A exposição de agentes irritantes aumenta a produção de PG's pela mucosa gástrica devido a redução do pH do lúmen gástrica, provavelmente, através da estimulação da secreção ácida. A ação protetora das PG's é mediada pelo aumento na produção de muco e secreção de bicarbonato, modulação da secreção do ácido gástrico, inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos e pela manutenção do fluxo sanguíneo durante a exposição a estes agentes (BATISTA et al., 2004).

O tratamento da doença ulcerosa, objetiva restabelecer o equilíbrio da mucosa gastroduodenal rompido, seja por aumento dos fatores agressivos (HCl, pepsina, bile, medicamentos ulcerogênicos e HP), seja por redução dos fatores defensivos locais (secreção de muco, bicarbonato e PG's) ou, ainda, por ambos os desvios (VERAS, 2007).

Vários progressos farmacológicos se verificaram, no tratamento das úlceras gástricas, durante o século XX (MARTINS et al., 2005). A terapia utilizada para o tratamento das úlceras gástricas inclui o controle da bactéria *Helicobacter pylori* bem como o controle da bomba de prótons ( $H^+/K^+$ -ATPase), da reversão dos danos à mucosa e da inflamação (TOMA et al., 2002). Hoje, existe uma multiplicidade de opções terapêuticas que incluem protetores da mucosa gástrica, antagonistas dos receptores da histamina ( $H_2$ ) e, mais recentemente, os inibidores da bomba de prótons (IBP). Apesar disso, a doença tem demonstrado uma elevada tendência para a recidiva (MARTINS et al., 2005). Muitos medicamentos utilizados no tratamento desta doença não são completamente efetivos e muitos efeitos adversos acompanham estas drogas, além do alto custo desses medicamentos para o paciente (TOMA et al., 2002).



Dessa forma, muitos produtos derivados de plantas apresentam-se como uma fonte atraente de novas drogas e muitos têm mostrado resultados promissores para a clínica (ZAYACHKIVSKA et al., 2005), seja como fonte no desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas ou como um produto adjuvante no tratamento das úlceras gástricas (ARRIETA et al., 2003).

#### **1.4 Produtos naturais e a relação com a gastroproteção**

Tradicionalmente, as plantas medicinais têm sido utilizadas na medicina popular por todo o mundo para o tratamento de várias doenças, em especial a úlcera gástrica (TOMA et al., 2002).

Vários produtos naturais têm sido usados para o tratamento de distúrbios gastrintestinais. A primeira droga sistematicamente efetiva contra úlceras gástricas, a carbenoxolona, foi descoberta como resultado de estudos de *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), comumente usada pelos indígenas no tratamento de úlceras gástricas, bronquite, inflamação e espasmos (AKTAR & MUNIR, 1989). Um ponto importante a ser analisado quando se decide pelo trabalho aplicado com uma dada classe terapêutica é a incidência da morbidade na população, pois este tipo de dado reflete o binômio: importância em saúde pública e mercado local e mundial para a substância potencialmente útil na patologia. Ainda não existe no mercado uma droga que leve à remissão completa das úlceras gastroduodenais (HIRUMA-LIMA, 2000).

Dados recentes na literatura demonstram a grande variedade de substâncias químicas isoladas de plantas que apresentaram atividade antiulcerogênica e contra distúrbios do TGI, como, por exemplo, o trabalho de Hiruma-Lima (2000) que isolou a *trans*-desidrocrotonina e *trans*-crotonina de *Croton cajucara* Benth. (sacaca), e o de Rao et al. (1997) que isolaram a ternatina, um flavonóide tetrametoxilado de *Egletes viscosa* Less (macela). Viana et al. (1995) demonstraram o efeito antiulcerogênico do extrato alcoólico da entrecasca de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) em animais com úlceras gástricas induzidas por estresse ou histamina. A pesquisa por princípios ativos obtidos de plantas medicinais pode

prover a descoberta de novos compostos, úteis para o desenvolvimento de novas drogas, e a preços mais acessíveis para a maioria da população (SILVA et al., 2006).

Diversos produtos obtidos de fontes naturais foram estudados, alguns princípios ativos identificados, bem como o seu mecanismo de ação esclarecido (CARVALHO, 2006). O isolamento e a determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo de organismos vivos assumem importância fundamental para o desenvolvimento científico da química de produtos naturais e contribui para avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no país (FILHO, 2007). Várias substâncias com atividade biológica são isoladas a cada ano e, o metabolismo vegetal, por sua vez, tem sido responsável por uma enorme parcela destes avanços. A diversidade estrutural das moléculas naturais não pode ser superada pela mais ativa imaginação dos químicos orgânicos sintéticos.

### **1.5 Metabolismo Vegetal**

O metabolismo das plantas é dividido didaticamente em metabolismo primário e metabolismo secundário, mas, na realidade, não existe uma divisão exata entre os dois tipos. Admite-se, porém, que os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos, que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. E as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são produtos do metabolismo secundário (VICKERY & VICKERY, 1981).

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes: via do ácido chiquímico e via da acetil-coenzima A (acetil-CoA). A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados (VICKERY & VICKERY, 1981).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas

interessantes. Atualmente, entretanto, já foram reconhecidas várias funções atribuídas a essa classe de metabólitos (HARBORNE, 1988; WINK, 1990).

Atualmente, dentre os metabólitos secundários mais estudados na pesquisa científica estão os flavonóides, do latim *flavus* (amarelo), que constituem um grupo de pigmentos vegetais com ampla distribuição na natureza (SIMÕES, 2003).

### 1.5.1 Flavonóides

Os flavonóides foram descobertos em 1930, pelo Dr. Szent György, vencedor do prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina. Ele extraiu, a partir da casca do limão, a citrina, uma substância que possuía certa capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Assim, esta classe de produtos naturais foi inicialmente denominada como vitamina P (de permeabilidade) e também por vitamina C<sub>2</sub>, visto que algumas das substâncias pertencentes a esta classe apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C. Porém, dada a não confirmação destas substâncias como vitaminas, esta classificação foi abandonada em 1950 (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2002).

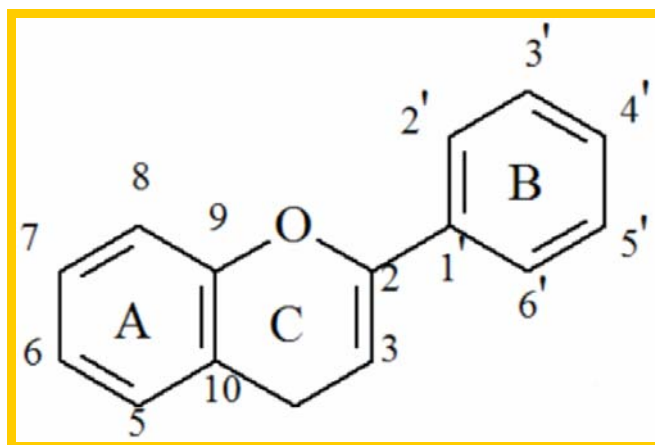
Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais. O termo “fenólico” ou “polifenol” pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros). Entretanto, uma definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, uma vez que existem compostos contendo hidroxilas fenólicas, fazendo parte de outras classes de metabólitos. Dessa forma, é mais conveniente empregar-se uma definição que leva em conta também a origem biogenética (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).

A estrutura química dos flavonóides baseia-se num esqueleto de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, com um anel de cromano ostentando um segundo anel aromático na posição 2, 3, ou 4 (**Figura 1**). Em alguns casos, o anel heterocíclico de seis membros é substituído por um anel de cinco membros (auronas) ou aparece numa forma isomérica de cadeia aberta (chalconas).

Além dos derivados glicosilados, também ocorrem derivados metilados, acilados, prenilados ou sulfatados. Da biossíntese geral dos flavonóides participam como intermediários fundamentais a *p*-cumaroil-CoA e três unidades de malonil-CoA para alongar a cadeia lateral da unidade fenilpropanoídica original (ROBBERS et al., 1997).

Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo. Quando o metabólito (flavonóides, antraquinonas, terpenos, etc.) encontra-se sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo frequentemente denominado de forma livre (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).

Pode-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais, entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (**Figura 1**). Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonóides por 8a e 4a, respectivamente (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).



**FIGURA 1. Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração (RUSSO & SANCHEZ, 2006).**

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Dentre as quais podemos citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta (UV) e visível, além de

proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização, antioxidante, controle da ação de hormônios vegetais, agente alelopáticos, inibidores de enzimas e marcadores taxonômicos (HARBORNE, 1989; HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

Os flavonóides são amplamente consumidos na dieta humana e de animais, sendo capazes de modular a atividade de diferentes enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo assim que estes compostos possam ter significativas atividades biológicas, podendo apresentar usos terapêuticos sendo, portanto, indispensável que pesquisas continuem sendo feitas, tanto na identificação dos compostos quanto no estudo de suas atividades. Sendo os flavonóides um grupo com cerca de 8000 compostos separados em diversas classes (chalconas, flavonóis, flavonas, dihidroflavonóides, flavanonas e flavanonóis, antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, entre outros), somente alguns, ou as formas substituídas em que eles se encontram, parecem estar relacionados a algum efeito biológico (DI-CARLO et al., 1999; PARK et al., 2002).

Dentre as principais atividades biológicas associadas a esta classe de substâncias, podemos citar: antiulcerogênica (BLANK et al., 1997; RAO et al., 1997; BRZOZOWSKI et al., 2005; ZAIACHKIVSKA et al., 2005), antioxidante (MIZUI et al., 1987; SOUZA et al., 1999), antiinflamatória (RAO et al., 2003; VIEIRA et al., 2004), antialérgica (KAWAI et al., 2007), antidiarreica (RAO et al., 1997), hepatoprotetora (RAO et al., 1994; ALARCÓN DE LA LASTRA et al., 1995), antinociceptiva (MEOTTI et al., 2006), anti-anafilática (SOUZA et al., 1992), antiviral (BAE et al., 2000), antitumoral (CHANG & KINGHORNE, 2001) e hormonal (KNIGHT & EDEN, 1995).

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos flavonóides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas, e de modular sistemas enzimáticos, incluindo ciclooxigenases e lipoxigenases. Esses efeitos são devidos a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes (BRODY, 1994).

Pesquisas realizadas por Lale & Herbert (1996) demonstraram que os flavonóides daidzeína, daidzína, pseudobaptigenina, karangina, himokiflavona e silibina apresentaram habilidade em inibir a atividade procoagulante de monócitos humanos. O efeito antitrombótico dos flavonóides parece estar relacionado com sua ação antioxidante. As ações

antitrombótica e vasoprotetora de alguns flavonóides têm sido atribuídas à habilidade destas substâncias de ligarem-se à membrana de plaquetas e eliminarem radicais livres. Por sua ação antioxidante, os flavonóides restabelecem a biossíntese e ação de prostaciclina ( $PGI_2$ ) endotelial e fator de relaxamento derivado do endotélio, os quais são inibidos pelos radicais livres (LALE & HERBERT, 1996). Um dos mais potentes mecanismos, pelo qual os flavonóides inibem a agregação plaquetária, é mediar o aumento dos níveis de AMPc plaquetário através da estimulação da atividade da enzima adenilato ciclase ou por inibição da fosfodiesterase do AMPc (COOK & SAMMAN, 1996).

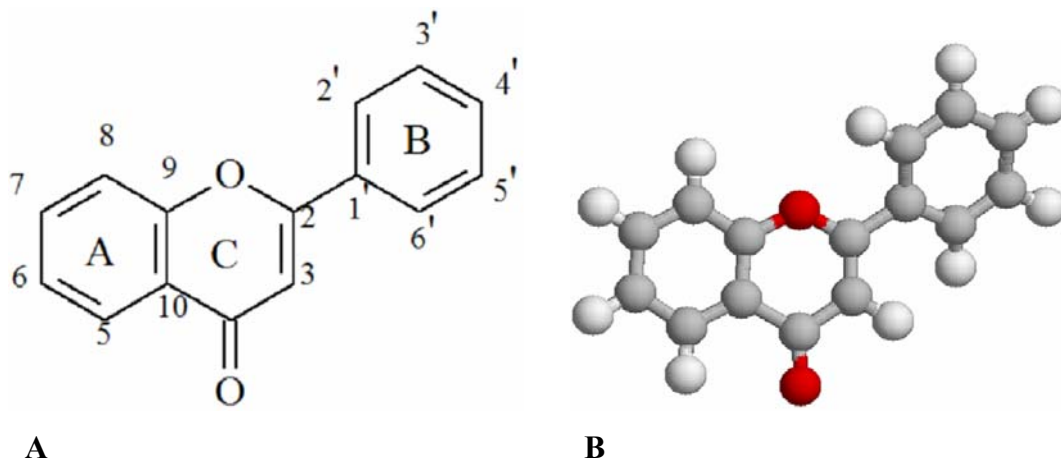
As PG's parecem preservar a integridade microvascular e reduzir a subjacente congestão dos vasos sangüíneos. Entretanto, nem todos os eicosanóides exercem efeito protetor sobre a mucosa gástrica. Os leucotrienos, potentes vasoconstritores, são gerados pela mucosa gástrica, e têm sido ali identificados, particularmente, após o aparecimento de lesões causadas por etanol. Pesquisas recentes têm mostrado que alguns flavonóides podem interferir com a produção de metabólitos do ácido araquidônico, por meio da inibição da enzima lipoxigenase, e reduzir a concentração de leucotrienos em diferentes sistemas biológicos (HOMMAM et al., 2000).

O efeito de proteção da mucosa gástrica, exercida pela naringenina, por exemplo, pode ser devido à regulação da liberação de substâncias vasoativas como os leucotrienos. Além disso, radicais livres podem estar envolvidos na patogênese de lesões agudas da mucosa gástrica (ISIHAWA et al., 2000).

Brzozowski et al. (2005) demonstraram o efeito gastroprotetor de flavonóides via ativação de PG's, NO e nervos sensoriais, em modelos de úlcera induzida por etanol ou estresse, em ratos. Blank et al. (1997) verificaram o papel do fluxo sanguíneo e da adesão leucocitária na gastroproteção promovida por flavonóides, em ratos. Mizui et al. (1987) avaliaram o efeito antiperoxidativo de flavonóides em modelos animais de lesão gástrica induzida por etanol. Rao et al. (1997) investigaram o papel das prostaglandinas endógenas no efeito gastroprotetor da ternatina, uma tetrametoxiflavona, em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina, em camundongos. As flavonas se caracterizam por serem uma das principais classes de flavonóides que, atualmente, em virtude de suas importantes propriedades biológicas, têm sido alvo de intensas pesquisas na área farmacológica.

### 1.5.1.1 Flavonas

Esses compostos, juntamente com os flavonóis, fazem parte de um grande grupo de flavonóides de origens biossintéticas muito próximas. Como os flavonóis são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila, essas duas classes são em geral classificadas juntas. Isto é justificado uma vez que suas análises, síntese e reações químicas possuem uma base teórica comum. As cores das flavonas variam do branco ao amarelo, sendo identificadas em quase todo o reino vegetal. As flavonas naturais são freqüentemente oxigenadas, substituídas com hidroxilas e/ou metoxilas. Outros substituintes encontrados com bastante freqüência são: acila, metileno, dioxila, isopreno, pirano, furano e seus derivados clorados. A maioria das flavonas, identificadas em plantas, estão sob forma conjugada, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxilas por uma ligação hemiacetal facilmente destruída por hidrólise ácida. Além disso, existem formas desses flavonóides possuindo um ou mais sulfatos ligados à hidroxila e/ou parte osídica da molécula (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).

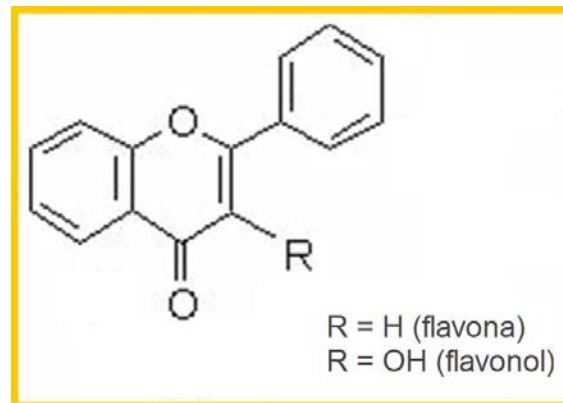


**FIGURA 2 - A. Fórmula estrutural condensada do núcleo 2-fenilcromona (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).**

**FIGURA 2 - B. Arranjo espacial da molécula de 2-fenilcromona (NPPN, 2007).**

As flavonas (**Figura 3**) são derivadas da 2-fenilcromona (**Figura 2**), e, possuindo um grupamento metoxila ou isoprenila ligados ao carbono 3 são chamadas de 3-metóxi-flavonas ou 3-prenilflavonas, respectivamente. De uma maneira geral, as flavonas são pouco solúveis

em água. Com relação à numeração do núcleo fundamental, o que se observa é que, nos heterosídeos, os carbonos dos açúcares são numerados por números ordinários seguidos de uma linha ('), segundo a distância deste da aglicona. As flavonas apigenina e luteolina, livres (agliconas) ou conjugadas (heterosídeos), são as mais abundantes encontradas em plantas (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).



**FIGURA 3. Núcleo fundamental das flavonas (GROSSO et al., 2007).**

Estudos mostram que algumas flavonas possuem propriedades biológicas importantes tais como anti-alérgica (YANO et al., 2007), antiinflamatória (KIM et al., 2004; LEE et al., 2007), antinociceptiva (RAJENDRAN et al., 2000), antioxidante (BENEDEK et al., 2006), antiulcerogênica (TAKASE et al., 1994; LA CASA et al., 2000), antiespasmódica (GILANI et al., 2006), antiviral (BRINKWORTH et al., 1992) e antitumoral (CABRERA et al., 2007).

A flavona baicaleína, extraída de *Scutellaria baicalensis* Georgi, apresenta atividade antioxidante sendo empregada na indústria de alimentos (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003). A flavona jaceosidina, isolada a partir de espécies do gênero *Arnica*, apresentou citotoxicidade para células colorretais humanas e carcinoma de intestino delgado (WOERDENBAG et al., 1994).

À flavona hesperidina, tem sido atribuída certa propriedade protetora capilar ou ação tônico-venosa. Chamada historicamente de fator P ou vitamina P, esta substância é empregada no tratamento de enfermidades caracterizadas por hemorragias e fragilidade capilar. Assim, especialidades farmacêuticas a base de flavonas são comercializadas, no Brasil e em países europeus, indicadas no tratamento de alguns distúrbios circulatórios (ZUANAZZI &



MONTANHA, 2003). Estudos das décadas de 30 e 40 já relatavam que a administração diária de 30 mg de hesperidina diminuía a permeabilidade e aumentava a resistência capilar. O efeito benéfico desta substância foi observado no tratamento da púrpura hemorrágica e da fragilidade capilar, tendo sido atribuída à sua ação sobre a enzima hialuronidase, que tem a capacidade de aumentar a permeabilidade e diminuir a fragilidade capilar (GARG et al., 2001).

Estudos clínicos mostraram que especialidades farmacêuticas, contendo uma mistura das flavonas diosmina e hesperidina micronizadas, melhoram o tônus venoso, aumentando a microcirculação em pacientes com insuficiência venosa, reduzindo os sintomas da crise aguda de hemorróidas (COSPIE, 1994). No Brasil, este produto é comercializado como venotônico e vasculoprotetor, sendo assim indicado no tratamento de varizes, hemorróidas e hemorragias.

Lu et al. (2001) demonstraram os efeitos preventivos das flavonas 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona e luteolina na geração de superóxidos e de proteínas fosforiladas em neutrófilos humanos.

Estudos têm mostrado que algumas flavonas atuam como um agente antiagregante, inibindo a atividade da enzima ciclooxigenase de plaquetas humanas. Landolfi et al. (1984) demonstraram o efeito de vários flavonóides sobre agregação plaquetária bem como sobre o AMPc e metabolismo do ácido araquidônico. As flavonas crisina, apigenina e fletetina inibiram a agregação plaquetária por inibir a via da ciclooxigenase. A inibição da ciclooxigenase pode ser devida a um aumento do AMPc. Além disso, crisina e apigenina reduziram o AMPc plaquetário em resposta a PGI<sub>2</sub>, efeito, provavelmente, mediado pela inibição da adenilato ciclase. Entretanto, os flavonóides miricetina e quercetina aumentaram o AMPc plaquetário, aumento induzido por PGI<sub>2</sub>. A potencialização do efeito da PGI<sub>2</sub> sobre os níveis de AMPc pela quercetina pode ser devida à inibição da fosfodiesterase. O efeito oposto, exercido por diferentes flavonóides sobre a resposta do AMPc, induzida por PGI<sub>2</sub> pode ser devido à inibição preferencial da fosfodiesterase ou adenilato ciclase. É possível sugerir que a inibição da ciclooxigenase desempenha um papel importante sobre o efeito da inibição da agregação plaquetária exercido pelas flavonas apigenina, crisina e fletetina, inibição devida a um aumento do AMPc.

As flavonas podem ser encontradas em diferentes espécies de plantas distribuídas entre os mais diversos gêneros e famílias. As principais famílias dentre as quais esta importante classe de flavonóides está inserida são: Leguminosae, Rutaceae, Passifloraceae, Lamiaceae, Solanaceae, Moraceae, Bignoniaceae, Hypericaceae, Ochnaceae, Asteraceae, Apocynaceae, Piperaceae, Trimeniaceae, Chloranthaceae, Boraginaceae entre outras.

## 1.6 A família Leguminosae

Das Angiospermas, as Leguminosas constituem um dos maiores e mais importantes grupos, amplamente distribuídos, com aproximadamente 650 (seiscentos e cinqüenta) táxons genéricos e 18.000 (dezoito mil) espécies (QUEIROZ, 1999).

As plantas que formam esta família têm hábitos muito variados, podendo ser desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e ainda trepadeiras. Podem ser encontradas em diferentes ambientes, inclusive com variações de altitude e latitude. As folhas são sempre de disposição alternada, compostas, pari ou imparipenadas. Suas flores são variadas, sempre cíclicas, de simetria radial até fortemente zigomorfa, com androceu formado de 4 a 10 estames, livres ou soldados entre si e óvulo sempre súpero, unicarpelar e unicolor. Assim como as folhas, os folíolos são sempre pulvinos, o que permite movimento diuturno. Apresenta fruto variado, em geral legume. As sementes são algumas vezes envoltas em mucilagem ou polpa doce (JOLY, 1977).

Ainda segundo Joly (1977), a família Leguminosae pode ser dividida em três importantes subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinoideae e a Papilionoideae.

- Mimosoideae: é a menor dentre as leguminosas compreendendo cerca de 40 gêneros. Dentre os gêneros que se encontram no Brasil, destacam-se pelo número de espécies: *Mimosa*, *Calliandra*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Parkia* e *Piptadenia*.
- Caesalpinoideae: esta subfamília contém cerca de 150 gêneros. O gênero com maior número de espécie é *Cassia*. Outros gêneros freqüentemente são: *Caesalpinia*, *Dimorphandra*, *Bauhinia*, *Copaifera*, *Hymenaea* e *Swartzia*.

- Papilionoideae: também conhecida por Fabaceae, compreende cerca de 400 gêneros sendo, portanto a maior dentre as leguminosas. Além de *Harpalyce*, estão incluídos nesta categoria todos os nossos legumes: *Phaseolus* (feijão), *Pisum* (ervilha), *Lens* (lentilha), *Vicia* (fava), *Cicer* (grão de bico), etc. Os gêneros nativos brasileiros que mais se destacam são: *Phaseolus*, *Crotalaria*, *Erythrina*, *Andira*, *Sophora*, *Dalbergia*, *Platymiscium*, *Indigofera*, *Desmodium*, *Clitoria* e *Mucuna*.

Muitos táxons de Leguminosae, como os pertencentes aos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Caesalpinia* e *Senna*, contribuem para a formação dos estratos arbóreos e arbustivos que compõem a paisagem característica das caatingas (QUEIROZ, 2006a). A família Leguminosae, por apresentar: grande número de táxons nas caatingas, diferentes padrões de distribuição (QUEIROZ, 2002) e diversificação antiga em áreas secas (LAVIN et al., 2004), reúne atributos que permite usar dados de distribuição de suas espécies para inferir relações entre as diferentes unidades florísticas incluídas no semi-árido (QUEIROZ, 2006b).

O táxon *Lonchocarpus* pertence às Papilionoideae, considerada a subdivisão mais evoluída das Leguminosae. Compreende árvores ou arbustos; estípulas rudimentares, geralmente caducas, folhas alternas imparipenadas, com 2-7 (-10) jugos, raramente 1 ou 3-folioladas; Inflorescência pseudo-racemosa geralmente axilar, com eixo de segunda ordem 2(-3) flores ou as vezes geminadas, raros solitários, as vezes raros pseudo-racemos agrupados verticalmente, ou combinados em pseudo-panículas ou pseudo-corimbos terminais; Flores dispostas mais ou menos alternadamente ao longo do eixo, brácteas pequenas orbiculares, ovais ou lineares em número equivalente ao das flores nos eixos de segunda e terceira ordens, geralmente caducas, duas bractéolas para cada flor, pequenas de forma variada; Fruto oblongo-lanceolado, geralmente alongado (QUEIROZ, 2004). A partir de um levantamento dos espécimes incorporados ao acervo do Herbário Prisco Bezerra/EAC, da Universidade Federal do Ceará (UFC), 04 (quatro) espécies foram identificadas: *Lonchocarpus arapirensis* Bentham (**Figura 4**), *Lonchocarpus campestris* Bentham, *Lonchocarpus obtusus* Bentham e *Lonchocarpus sericeus* (Poiret) Kunth.

### 1.7 *Lonchocarpus araripensis* Bentham

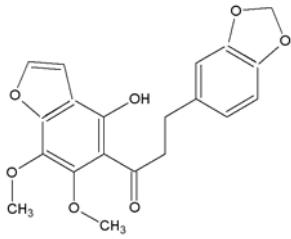
Em 1980, Nascimento e Mors, do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, isolaram nove flavonóides deste espécime endêmico da Região Nordeste do Brasil, o *Lonchocarpus araripensis* ou *Derris araripensis* (LIMA, 2007). A estrutura química de cada um dos nove flavonóides isolados, pode ser observada na **Figura 5**.

Segundo Fernandes et al. (1964).

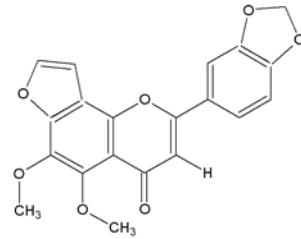
*“O Lonchocarpus araripensis é uma espécie pertencente à família Leguminosae-Papilionoideae (Fabaceae), é uma árvore de pequeno a médio porte, geralmente de 3-5m de altura, folhas 7 ou 9 folioladas, alterno-espiraladas; pecíolo delgado, cilíndrico a angular, fruto 1 (-2) por eixo de 2ª ordem, que pode chegar até 5cm comprimento, sementes reniformes, marrom-avermelhadas com algumas manchas negras. Sua distribuição se restringe a região Nordeste do Brasil e pode ser encontrada principalmente nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Maranhão em formações vegetais diversas, tais como tabuleiros, matas do litoral, carrascais, cerrados e campos sujos. Ocorre desde as regiões litorâneas: solos arenosos, pedregosos, terrenos baixos e úmidos, até chapadas e serras. A espécie é conhecida no Ceará por anjelim, coção ou sucupira-branca. Em Pernambuco por rabo-de-cavalo, no Piauí por pau-de-formiga e na Paraíba por sucupira-de-concha. O período de floração estende-se do final de setembro a dezembro, quando já se pode observar o início da frutificação, abundante até o mês de março, embora material frutífero tenha sido coletado até no mês de Julho. O período de floração corresponde ao da primavera, que na região Nordeste é precedida pelas chuvas, quando então a planta reinicia seu desenvolvimento vegetativo, com o aparecimento das folhas, e inicia seu processo reprodutivo. A inflorescência paniculada subterminal é a característica básica utilizada na identificação desta espécie. Em associação, a forma e textura do folíolo também podem ser satisfatoriamente utilizadas, bem como forma, indumento e coloração do cálice e peça da corola, além da pilosidade nas anteras e filetes dos estames”*



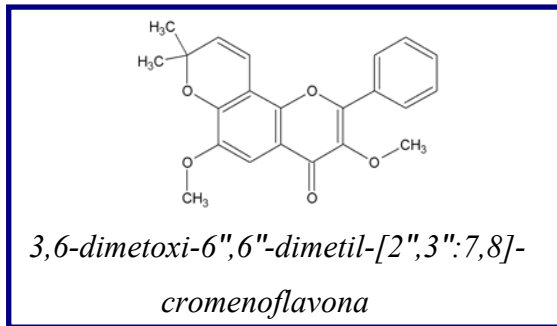
**FIGURA 4.** *Lonchocarpus araripensis* Bentham.



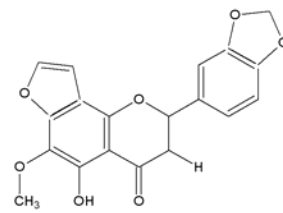
*Metilenodioxi-(3,4)-2'-hidroxi-5',6'-  
dimetoxifurano-[3',4':2'',3'']-di-hidrochalcona*



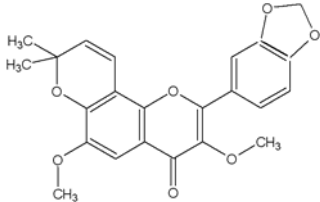
*Metilenodioxi-(3',4')-5,6-dimetoxi-[2'',3'':7,8]-  
furanoflavona*



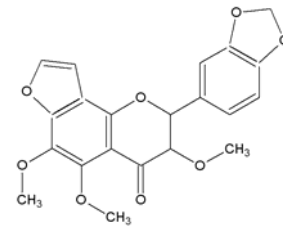
*3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-  
cromenoflavona*



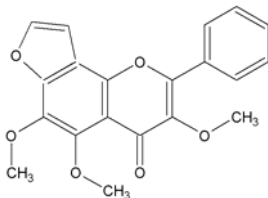
*Metilenodioxi-(3',4')-5-hidroxi-6-metoxi-[2'',3'':7,8]-  
furanoflavanona*



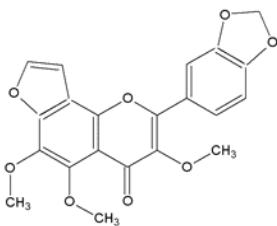
*Metilenodioxi-(3',4')-3,6-dimetoxi-6'' 6''-dimetil-  
[2'',3'':7,8]-cromenoflavona*



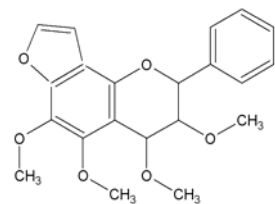
*3,5,6-trimetoxi-[2'',3'':7,8]-flavononol*



*3,5,6-trimetoxi-[2'',3'':7,8]-furanoflavona*



*Metilenodioxi-(3',4')-3,5,6-trimetoxi-  
[2'',3'':7,8]-furanoflavona*



*3,4,5,6-tetrametoxi-[2'',3'':7,8]-furanoflavona*

**FIGURA 5. Estrutura química dos compostos isolados de *L.araripensis* por Nascimento e Mors em 1980.**

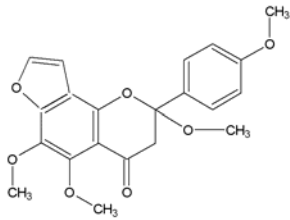


Em Fevereiro de 2005, uma amostra do material vegetal, obtida da espécie *Lonchocarpus araripensis*, foi coletada na fazenda do Garapa situada no município de Acarape - CE, para estudo dos constituintes químicos. A planta foi identificada pelo Professor Afrânio Gomes Fernandes, do departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). A exsicata nº 11074 da planta encontra-se depositada no Herbário Bezerra / UFC.

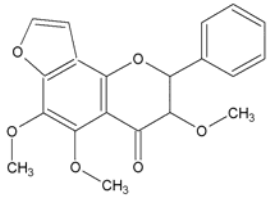
Embora não se tenha evidências de algum uso terapêutico popular atribuído a esta espécie, estudos mostram que outras espécies, também do gênero *Lonchocarpus* tais como *Lonchocarpus sericeus* possuem propriedades farmacológicas de fundamental importância, tais como atividade antiinflamatória (ALENCAR et al., 2005; NAPIMOGA et al., 2007). Ao *Lonchocarpus oaxacensis* Pittier e ao *Lonchocarpus guatemalensis* Benth são atribuídos efeitos inibitórios gastroprotetores sobre a bomba de prótons (REYES-CHILPA et al., 2006).

Além dos flavonóides isolados na década de 80, novos compostos já foram isolados e caracterizados no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. Atualmente, mais sete compostos já foram identificados e tiveram suas estruturas moleculares elucidadas (**Figura 6**), o que totaliza dezesseis substâncias obtidas até o momento. Algumas substâncias isoladas do *Lonchocarpus araripensis* são ainda desconhecidas na pesquisa farmacológica como o 6a-hidroxi-medicarpin, a 2',5',6'-trimetoxifurano-[3',4':2'',3'']-di-hidrochalcona e a 2,4',5,6-tetrametoxi-[2'',3'':7,8]-furanodihidroflavona. Já outros compostos, como os constituintes terpenicos ácido betulínico e o lupeol, são exemplos de substâncias com atividades biológicas bem caracterizadas farmacologicamente.

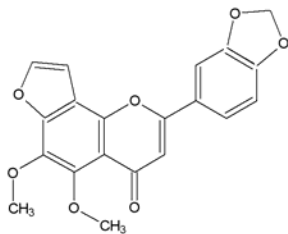
O ácido betulínico (ácido 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico) é um triterpenóide pentacíclico pertencente ao grupo dos lupanos que apresenta atividades farmacológicas importantes. Fujioka et al. (1994) e Evers et al. (1996) associaram este composto à ação anti-HIV, sendo um potente inibidor da replicação viral. Pisha et al. (1995) descreveram a atividade do ácido betulínico como inibidor seletivo do melanoma, através de indução da apoptose. Posteriormente foi demonstrado que tal ação se devia à inibição da aminopeptidase N (MELZIG & BORMANN, 1998). O ácido betulínico tem despertado interesse pelas atividades biológicas potenciais exibidas, tais como, antitumoral, antimalárica e antiinflamatória (LUNARDI et al., 2001).



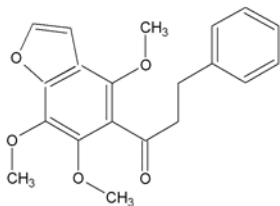
*2,4',5,6-tetrametoxi-[2'',3'':7,8]-  
furanodihidroflavona*



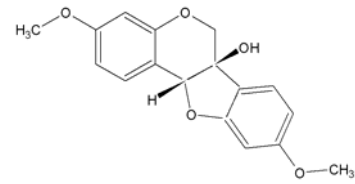
*3,5,6-trimetoxi-[2'',3'':7,8]-furanodihidroflavona*



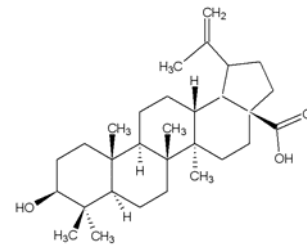
*3',4'-metilendioxi-5,6-dimetoxi-[2'',3'':7,8]-  
furanoflavona*



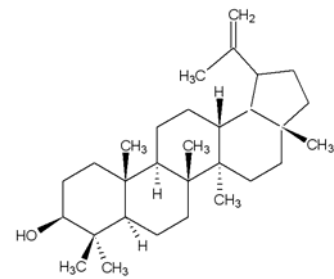
*2',5',6'-trimetoxifurano-[3',4':2'',3'']-di-  
hidrochalcona*



*6a-hidroxi-medlicarpin*



*ácido betulínico (ácido 3β-hidroxi-lup-  
20(29)-en-28-óico)*



*lupeol (lup-20(29)-en-3β-ol)*

**FIGURA 6. Estrutura química dos novos compostos isolados de *L. araripensis*.**

O lupeol (lup-20(29)-en-3β-ol) é reportado na literatura como possuidor de várias propriedades farmacológicas como antiinflamatória, antiartrítica, antimutagênica (GEETHA et al., 1998) e no controle de formação de cálculos renais (VIDYA & VARALAKSHMI, 2000). Estudos demonstram que muitas plantas com atividade antitumoral contêm o triterpeno lupeol como um de seus principais constituintes (MILES & KOKOPOL, 1976; SALEEM et al., 2001).



## 2. OBJETIVOS

A despeito da inexistência de uso popular, bem como de estudos farmacológicos, envolvendo a espécie *Lonchocarpus araripensis*, mas, tendo em vista que, constituintes com atividades biológicas importantes já foram isolados da mesma (ácido betulínico e lupeol) e, tendo conhecimento de que as flavonas demonstram importantes atividades biológicas tais como antiulcerogênica (TAKASE et al., 1994; LA CASA et al., 2000), antiinflamatória (LEE et al., 2007; KIM et al., 2004) e antioxidante (BENEDEK et al., 2006), decidimos então investigar a atividade antiulcerogênica gástrica de uma flavona, a 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF), isolada de *L. araripensis*.

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial efeito antiulcerogênico gástrico da DDF em modelos experimentais de lesões gástricas em camundongos e verificar os possíveis mecanismos de ação.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda da DDF em camundongos.
- Investigar o efeito antiulcerogênico gástrico da DDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina em camundongos.
- Analisar a possível participação das prostaglandinas (PG's), do óxido nítrico (NO) e dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

- Averiguar a participação do receptor TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.
- Avaliar uma possível ação antioxidante (níveis de NP-SH gástricos) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

## 3. MATERIAIS

### 3.1 Material Botânico

O composto 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF) foi obtido no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Otília Desusdênia Loiola Pessoa, a partir do extrato hexânico da casca das raízes de *Lonchocarpus araripensis* Benth. A planta foi coletada na fazenda do Garapa situada no município de Acarape-CE e identificada pelo Professor Afrânio Gomes Fernandes, do departamento de Biologia da UFC. A exsicata nº 11074 da planta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da UFC.

### 3.2 Animais experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss Webster, adultos, ambos os sexos, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em jejum de sólidos por 18 h, antes da realização dos experimentos. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC (Protocolo nº 101 / 07).

### 3.3 Drogas e Reagentes

#### Drogas e Reagentes

#### Origem

Ácido ditio bis-2-nitrobenzóico (DTNB)

Sigma, U.S.A

Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA)	Proanalysis
Ácido tricloroacético (TCA)	Sigma, U.S.A
Álcool etílico absoluto (96 %)	Quimex, Brasil
Capsaicina	Calbiochem, U.S.A
Capsazepina	Sigma, U.S.A
Cloreto de sódio	Vetec, Brasil
Diazóxido	Sigma, U.S.A
Formaldeído P.A	Sigma, U.S.A
Glibenclamida	Sigma, U.S.A
Glutathiona reduzida	Sigma, U.S.A
Hidroximetil-aminometano-ácido clorídrico (Tris-HCl)	Sigma, U.S.A
Indometacina (Indocid <sup>®</sup> )	Predome, Brasil
L-Arginina	Sigma, U.S.A
Misoprostol (Cytotec <sup>®</sup> )	Continental Pharma, Itália
N-acetilcisteína (Fluimucil <sup>®</sup> )	Eurofarma, Brasil
N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina-metilester (L-NAME)	Sigma, U.S.A
Tween 80	Riedel, Alemanha

### 3.4 Aparelhos

<b>Aparelho</b>	<b>Origem</b>
Balança para animais (mod. MF-6)	Filizola, Brasil
Balança analítica (mod. AX200)	Shimadzu Corporation, Japão
Centrífuga, refrigerada, modelo CT 5500 DR	Cientec, Brasil
Espectrofotômetro	Bayer-RA 50
Freezer (-75°C)	Legacy Sistem, U.S.A
Pipetas automáticas	Jencons Scientific Inc., U.S.A
Seringas plásticas	B-D Plastipak

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Obtenção da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF) a partir da casca das raízes de *Lonchocarpus araripensis*

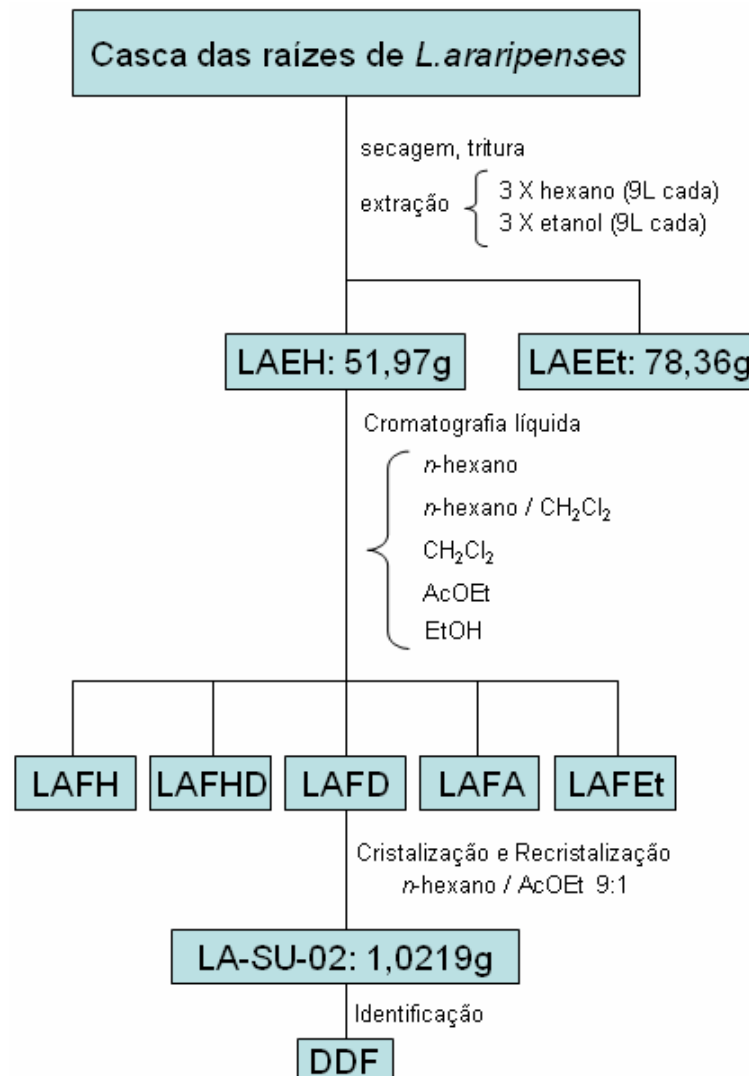
A casca das raízes de *L. araripensis* (1,93 Kg) foi seca, triturada e extraída três vezes com hexano (9 L cada) e em seguida, por três vezes com etanol (9 L cada), à temperatura ambiente (**Figura 7**). A destilação dos solventes foi realizada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, levando a obtenção de 51,97 g de um extrato hexânico, viscoso, de cor marrom, denominado LAEH (*Lonchocarpus araripensis*: extrato hexânico) e 78,36 g de um extrato etanólico, viscoso, de cor preta, denominado LAEEt (*Lonchocarpus araripensis*: extrato etanólico).

O extrato hexânico (LAEH) (51,97 g) foi cromatografado sobre gel de sílica (100 g), empregando sucessivas eluições com *n*-hexano, *n*-hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (diclorometano), AcOEt (acetato de etila) e EtOH (etanol), para que fossem obtidas as respectivas frações (**Tabela 1**): LAFH (*Lonchocarpus araripensis*: fração hexano), LAFHD (*Lonchocarpus araripensis*: fração hexano-dicloro), LAFD (*Lonchocarpus araripensis*: fração dicloro), LAFA (*Lonchocarpus araripensis*: fração acetato) e LAFEt (*Lonchocarpus araripensis*: fração etanol).

**TABELA 1.** Frações obtidas a partir do extrato hexânico (LAEH) da casca das raízes de *L. araripensis*.

Solvente	Fração	Peso (g)
Hexano	LAFH	1,4658
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	LAFHD	21,4992
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	LAFD	3,6781
AcOEt	LAFA	5,8619
EtOH	LAFEt	0,5562

Na fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3,7 g) do extrato hexânico foi observado a presença de um material sólido. Inicialmente, foi adicionado a esta fração, uma mistura de solventes (*n*-hexano/AcOEt 9:1) com a finalidade de melhorar a pureza do material em questão. Em seguida o composto foi purificado, por recristalização, com a mesma mistura de solventes, obtendo-se 1,0219 g de um cristal branco denominado inicialmente de LA-SU-02 (*L. araripensis* – substância 02), o qual se mostrou uniforme em Cromatografia de Camada Delgada (CCD), apresentando certo grau de pureza. Posteriormente a substância foi estabelecida como sendo a 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF). As etapas que levaram a obtenção do composto estão resumidas na **Figura 7**.



**FIGURA 7.** Método de isolamento da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF).

## 4.2 Toxicidade aguda

Na avaliação da toxicidade aguda da DDF, foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g), ambos os sexos, escolhidos aleatoriamente, separados em grupos de 10 animais cada e mantidos em jejum por 18 horas. DDF foi administrada, por via intraperitoneal, em doses crescentes de 500, 1000 e 2000 mg/Kg de peso, no volume de 10 mL/Kg. O grupo controle recebeu igual volume de veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.). Os animais foram observados 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min após a administração de DDF e então em intervalos de 24 horas até completarem 72 horas (MILLER & TAINTER, 1944).

Os animais foram observados quanto às alterações comportamentais (sensibilidade ao toque, sensibilidade ao reflexo, ptose palpebral, piloereção, letargia, frequência respiratória, dispnéia, convulsões e sialorréia), alterações nos padrões fisiológicos de evacuação e micção e quanto ao número de mortes ocorridas, por um período de setenta e duas horas.

## 4.3 Atividade Gastroprotetora

### 4.3.1 Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

Camundongos Swiss, machos, com peso em torno de 25-30 g, divididos em grupos (n=8), foram tratados com N-acetilcisteína (750 mg/Kg, v.o.), um conhecido antioxidante, 1 h antes, ou com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou DDF (25, 50, 100 ou 200 mg/Kg, i.p.) 45 min antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Decorridos 30 min da administração do etanol<sub>abs</sub>, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9 % e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. O percentual de área gástrica lesionada (porção glandular) foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*). A área ulcerada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico (ROBERT et al., 1979).

### 4.3.2 Lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, (n=8/grupo) foram tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou DDF (25, 50, 100 ou 200 mg/Kg, i.p.) 45 min antes da administração oral de indometacina (30 mg/Kg), preparada em 0,5 % de carboximetilcelulose. Após 6 h da administração da indometacina, os animais foram sacrificados, os estômagos foram removidos, instilados com formalina a 5 % por 30 min e, em seguida, abertos pela grande curvatura, lavados em salina 0,9 % (RAINSFORD, 1982) e a extensão das lesões foi registrada, atribuindo-se escores, de acordo com a escala de Szabo et al. (1985), evidenciada no **Quadro 1**.

1. Perda de pregas da mucosa	1 ponto
2. Descoloração da mucosa	1 ponto
3. Edema	1 ponto
4. Hemorragias	1 ponto
5. Número de petéquias	
• até 10	2 pontos
• mais de 10	3 pontos
6. Intensidade da ulceração	
• úlceras ou erosão de até 1mm	n x 2 pontos
• úlceras ou erosão maiores que 1mm	n x 3 pontos
• úlceras perfuradas	n x 4 pontos

n = número de úlceras encontradas

**QUADRO 1. Determinação do índice de lesões gástricas induzidas por indometacina (SZABO et al., 1985).**



#### **4.3.3 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos**

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos (n=8), foram tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou DDF (100 mg/Kg, i.p.) 45 min antes, ou L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.) ou N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) (20 mg/Kg, s.c.) 30 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Para avaliar o papel do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico da DDF, também foram realizadas combinações onde L-NAME (20 mg/Kg, s.c.) foi administrado 15 min antes da DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.). Decorridos 30 min da administração do etanol<sub>abs</sub>, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9 % e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. O percentual de área gástrica lesionada (porção glandular) foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*). A área lesionada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico.

#### **4.3.4 Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K<sub>ATP</sub>), no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos**

Grupos de camundongos (n=8) Swiss, machos, com peso em torno de 25-30 g, foram tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.), DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) 45 min antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 ml/animal). Para avaliar a possível participação dos canais de K<sub>ATP</sub> no efeito gastroprotetor da DDF, foram realizadas combinações nas quais glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) foi administrada 15 min antes do tratamento com DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou diazóxido (3 mg/Kg, i.p.). 30 min depois da administração do etanol<sub>abs</sub>, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9 % e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. O percentual de área gástrica lesionada (porção glandular) foi determinado com o auxílio de um programa de

planimetria computadorizada e a área lesionada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico, como descrito anteriormente.

#### **4.3.5 Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos**

Para avaliar a possível participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da DDF, camundongos (n=8/grupo) Swiss, machos, 25-30 g foram tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.), DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou misoprostol (50 µg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Combinações também foram realizadas e, indometacina (10 mg/Kg, v.o.) foi administrada 2 h antes da administração da DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou do misoprostol (50 µg/Kg, v.o.). Após 30 min da administração do etanol<sub>abs</sub>, os animais foram sacrificados, os estômagos foram removidos, abertos pela grande curvatura e a análise do percentual de lesão gástrica procedeu-se como descrito anteriormente.

#### **4.3.6 Papel dos receptores TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos**

Para avaliar a possível participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina no efeito gastroprotetor da DDF, camundongos Swiss, machos, com peso em torno de 25-30 g, foram divididos em grupos (n=8) e tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.), DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Também foram realizadas combinações nas quais capsazepina (5 mg/Kg, i.p.) foi administrada 30 min antes do tratamento com DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.). Decorridos 30 min da administração do etanol<sub>abs</sub>, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica.

#### **4.3.7 Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos**

Para avaliar uma possível ação antioxidante no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, grupos de camundongos Swiss (n=8), machos, foram tratados com N-acetilcisteína (750 mg/Kg, v.o.) 1 h antes, ou com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou DDF (100 mg/Kg, i.p.) 45 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Um outro grupo, tratado apenas com solução salina 0,9 %, foi incluído no estudo. Após 30 min da administração do etanol<sub>abs</sub>, os animais foram sacrificados e tiveram seus estômagos retirados. A quantificação dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) foi realizada segundo o método de Sedlak & Lindsay (1968). A porção glandular de cada estômago foi removida, pesada e homogeneizada com EDTA 0,02 M gelado, para preparação do homogenato a 10 %. Em seguida, adicionou-se, a uma alíquota de 1 mL do homogenato, 800 µL de água destilada e 200 µL de ácido tricloroacético (TCA 50 % em solução aquosa) e então as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 15 min. Um volume de 1 mL foi então retirado do sobrenadante e adicionou-se 2 mL de tampão Tris 0,4 M, pH 8,9 e 50 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.

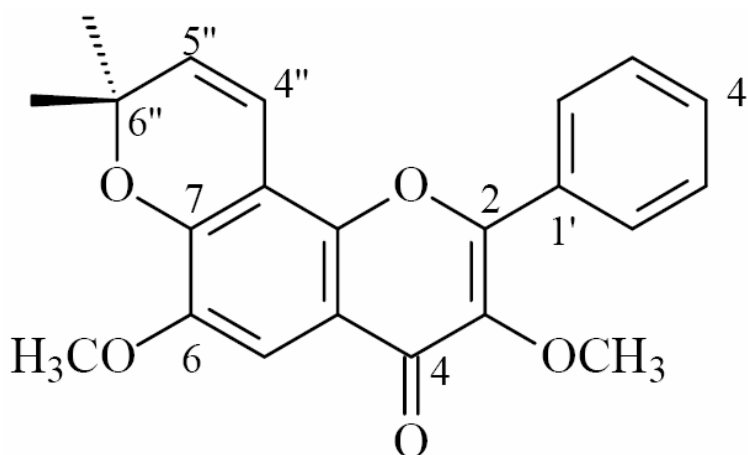
#### **4.4 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). 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. A DE50 (dose capaz de promover 50 % do efeito máximo) da DDF foi calculada através de análise por software (GraphPAD) e expressa em termos de intervalo de confiança de 95 %.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação da 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-cromenoflavona (DDF).

A estrutura da LA-SU-02 (*L. araripensis* – substância 02), posteriormente estabelecida como sendo a 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-cromenoflavona (DDF) (**Figura 8**), foi identificada por métodos espectroscópicos incluindo IV, EM, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, sendo também comparada com trabalhos relacionados já publicados (NASCIMENTO & MORS, 1981; ARRIAGA et al., 2001).



**FIGURA 8.** 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-cromenoflavona (DDF).

A extração de DDF a partir de 1,93 Kg de casca das raízes de *Lonchocarpus araripensis* produziu 1,0219 g de substância pura (cristal branco), o que corresponde a um rendimento em torno de 0,05 %. Utilizando-se procedimentos físico-químicos tais como destilação e métodos cromatográficos, a DDF foi isolada diretamente a partir da fração dicloro (LAFD – *Lonchocarpus araripensis*: fração dicloro) resultante do extrato hexânico (LAEH – *Lonchocarpus araripensis*: extrato hexânico) obtido com a casca das raízes. Todo o material foi isolado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa.

## 5.2 Toxicidade aguda.

A administração intraperitoneal de DDF nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg não foi capaz produzir alterações comportamentais ou alterações nos padrões fisiológicos de evacuação e micção além de não induzir mortalidade nos animais, durante o período de observação de 72 horas.

## 5.3 Efeito da DDF nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

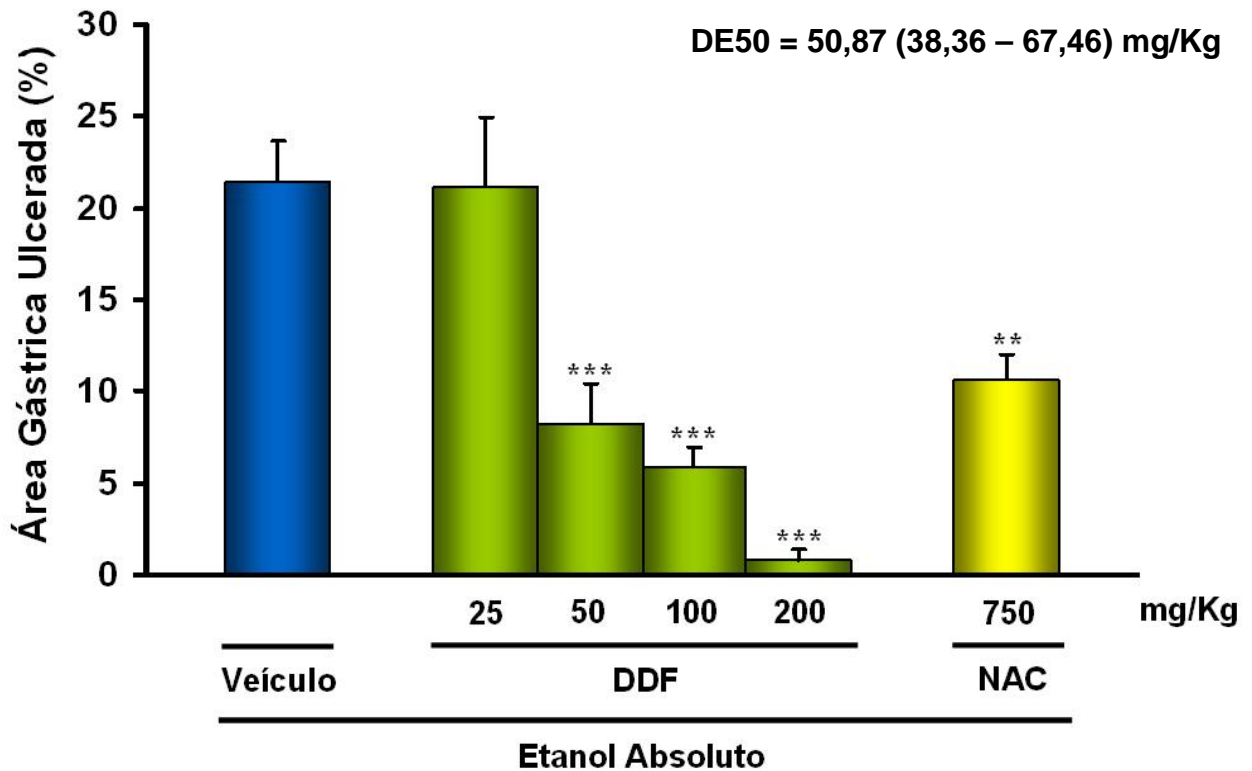
Os efeitos da DDF e N-acetilcisteína (NAC) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol, em camundongos, estão demonstrados na **Tabela 2 e Figura 9**.

Os animais que receberam apenas veículo mostraram, após a administração oral do etanol absoluto, extensa área de lesão da mucosa gástrica. DDF na dose de 25 mg/Kg, i.p., não conseguiu reduzir de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o percentual de lesão gástrica ( $21,2 \pm 3,71$  %) em comparação com o grupo controle ( $21,42 \pm 2,22$  %). DDF nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, i.p., reduziu de forma significativa ( $p < 0,001$ ) e dose-dependente o percentual de área ulcerada para  $8,21 \pm 2,19$ ;  $5,88 \pm 1,06$  e  $0,83 \pm 0,54$  %, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ( $21,42 \pm 2,22$  %), o que corresponde a um percentual de inibição de 62, 73 e 96 %, respectivamente. NAC (750 mg/Kg, v.o.), um conhecido antioxidante, reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) as lesões gástricas ( $10,62 \pm 1,39$  %), quando comparada ao grupo controle ( $21,42 \pm 2,22$  %), o que corresponde a uma redução de 50 %. O valor relativo à DE50 da flavona nesse modelo, obtido em torno do seu respectivo intervalo de confiança de 95 %, foi de 50,87 (38,36 – 67,46) mg/Kg.

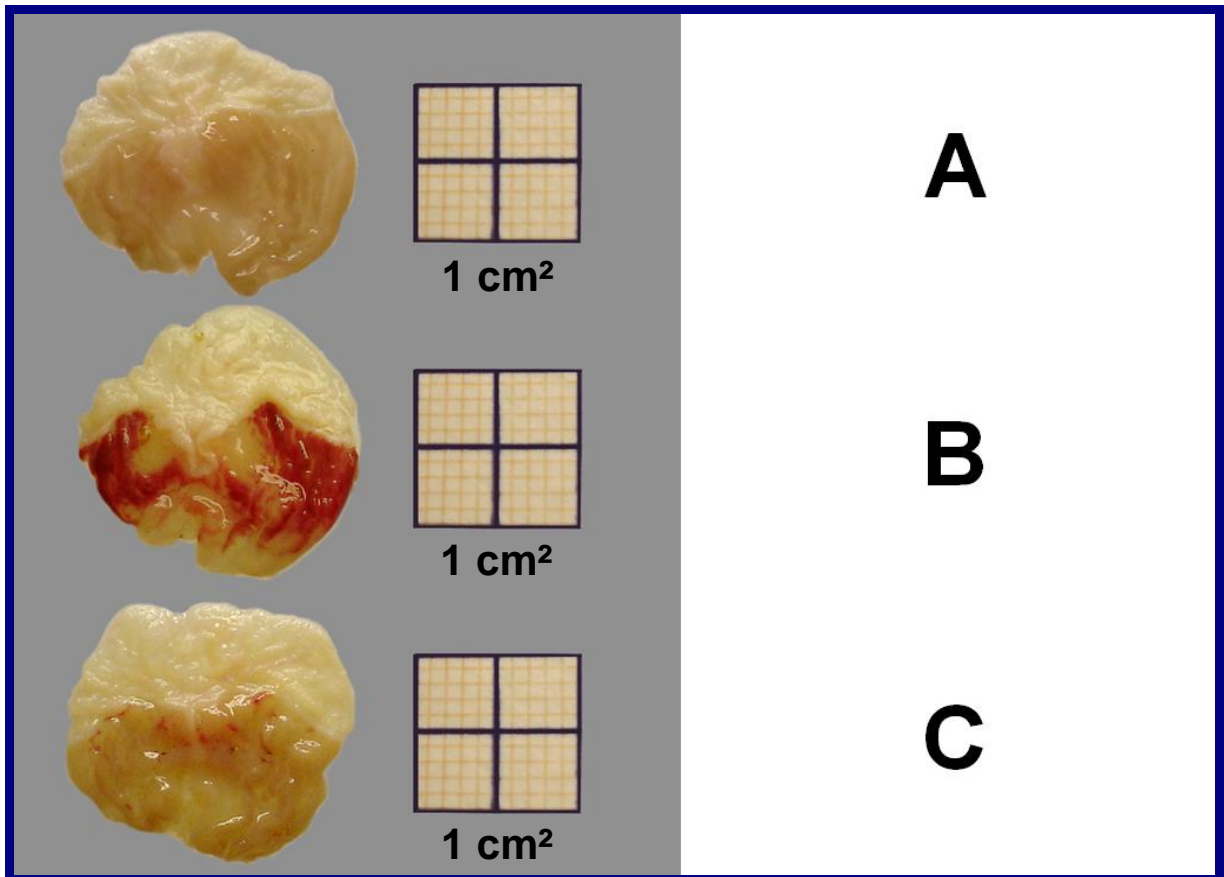
**TABELA 2. Efeito da DDF no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>DOSE (mg/Kg; via)</b>	<b>ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)</b>
Controle (veículo)	-	21,42 ± 2,22
DDF	25, i.p.	21,2 ± 3,71
	50, i.p.	8,21 ± 2,19***
	100, i.p.	5,88 ± 1,06***
	200, i.p.	0,83 ± 0,54***
NAC	750, v.o.	10,62 ± 1,39**

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. N-acetilcisteína (NAC) foi administrada, por via oral, 1 h antes e, veículo (2 % de Tween 80 em água destilada) ou DDF, por via intraperitoneal, 45 min antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Os animais foram sacrificados 30 min após a administração do etanol<sub>abs</sub>. Foram utilizados 8 animais por grupo. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs controle (ANOVA e teste de Student Newman Keul).



**FIGURA 9.** Efeito da DDF no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/Kg, v.o.) foi administrada 1 h antes e, veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou DDF (25, 50, 100 e 200 mg/Kg, i.p.), 45 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).



**FIGURA 10. Aspectos macroscópicos de estômago de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol.** (A) – Estômago aberto pela grande curvatura de um camundongo no qual foi administrado apenas veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.). (B) – Estômago aberto pela grande curvatura de um camundongo tratado com veículo 45 min antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). (C) – Estômago aberto pela grande curvatura de um camundongo tratado com DDF (100 mg/Kg, i.p.) 45 min antes da administração oral de etanol absoluto.



#### 5.4 Efeito da DDF nas lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.

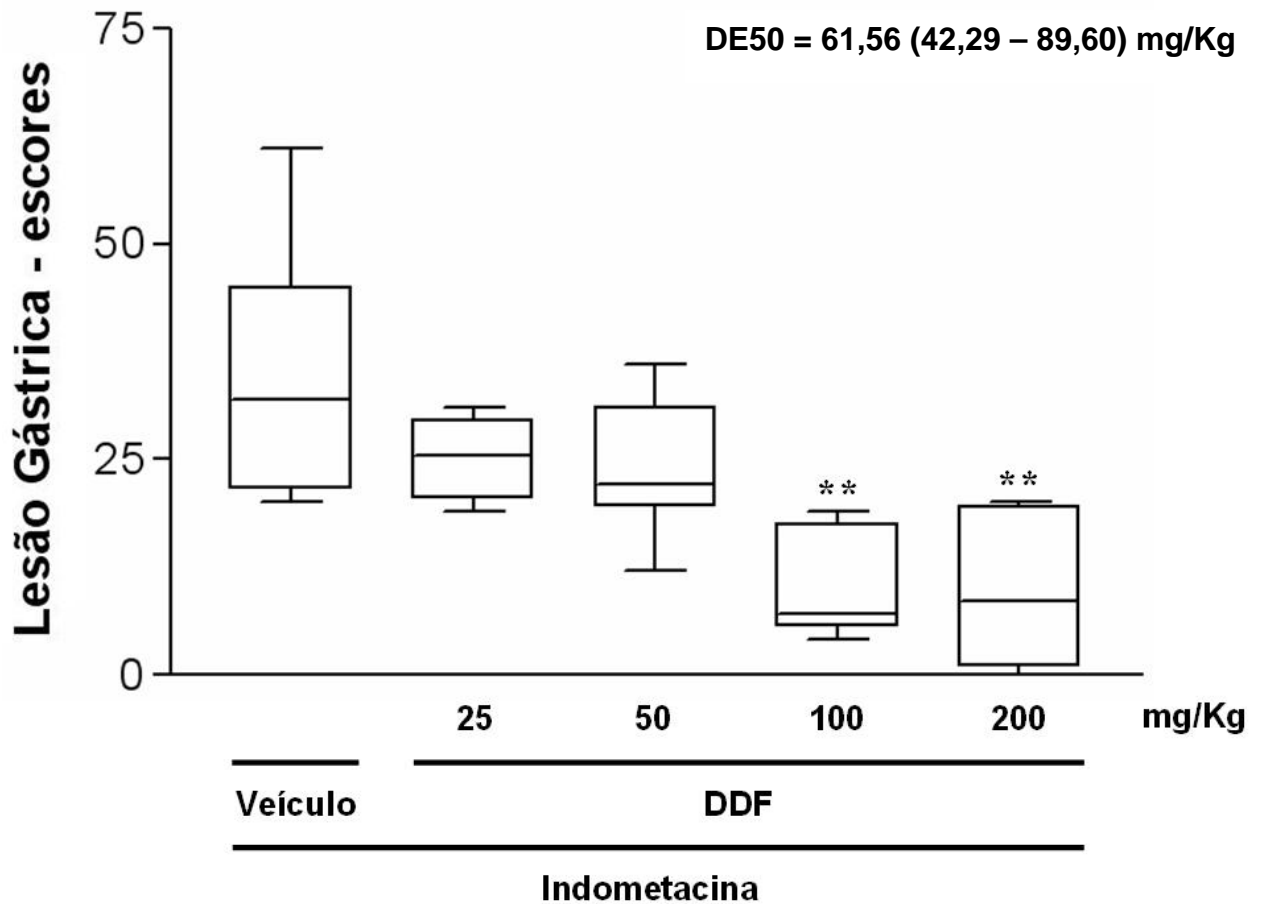
Os efeitos da DDF sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina, em camundongos, estão demonstrados na **Tabela 3** e **Figura 11**.

Os animais que receberam apenas veículo mostraram, após a administração oral da indometacina (30 mg/Kg), elevado índice de lesão gástrica com base nos escores obtidos a partir da escala de Szabo et al. (1985). DDF nas doses de 25 e 50 mg/Kg, i.p., onde as medianas relacionadas aos escores obtidos foram 25,5 (19,0 a 31,0) e 22,0 (12,0 a 36,0), respectivamente, não conseguiu reduzir de forma significativa ( $p>0,05$ ) o índice de lesão gástrica em comparação com o grupo controle que, por sua vez, apresentou mediana 32,0 (20,0 a 61,0). DDF nas doses de 100 e 200 mg/Kg, i.p., onde as medianas relacionadas aos escores obtidos foram 7,0 (4,0 a 19,0) e 8,5 (0 a 20,0), respectivamente, reduziu de maneira significativa ( $p<0,01$ ) o índice de lesão gástrica em comparação com o grupo controle. O valor relativo à DE50 da flavona nesse modelo, obtido em torno do seu respectivo intervalo de confiança de 95 %, foi de 61,56 (42,29 – 89,60) mg/Kg.

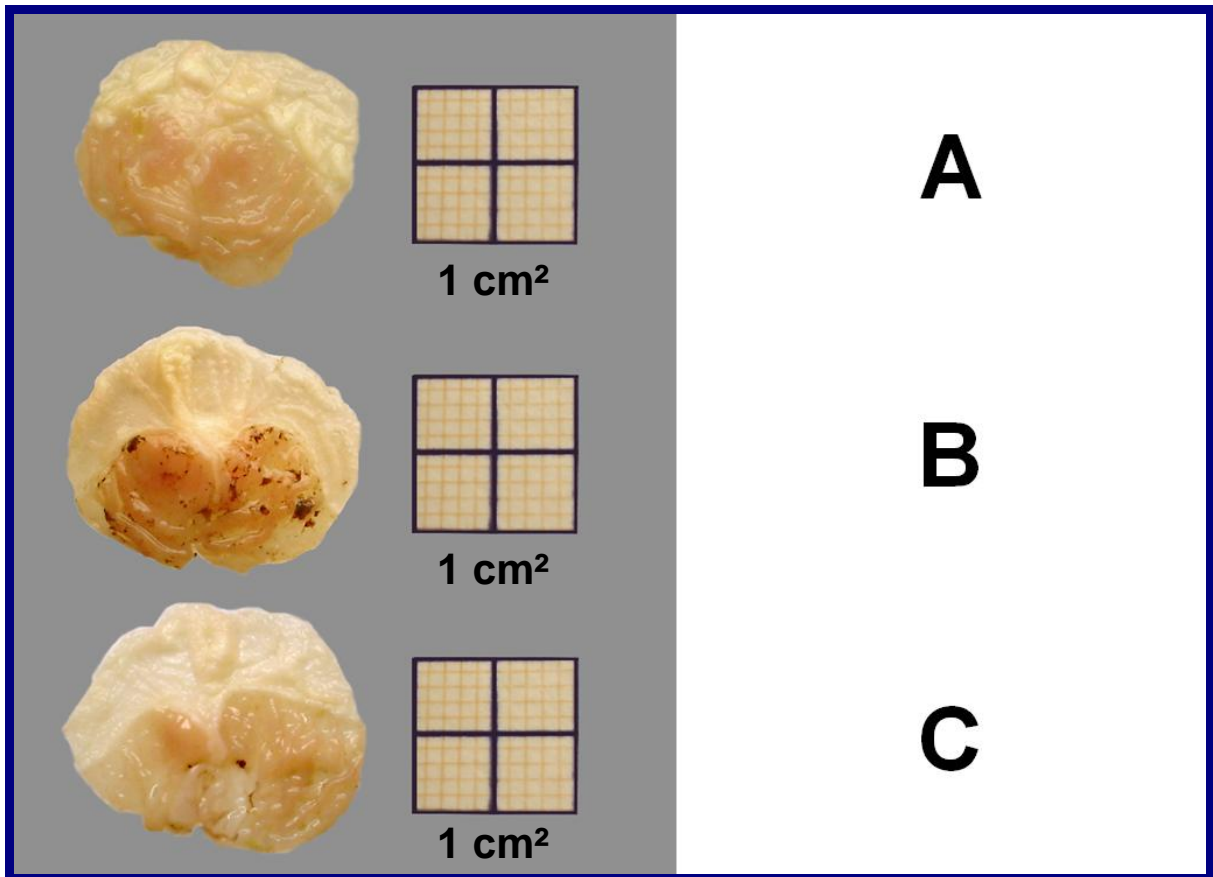
**TABELA 3. Efeito da DDF no modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>DOSE (mg/Kg; via)</b>	<b>ESCORES DE LESÃO GÁSTRICA</b>
Controle (veículo)	-	32,0 (20,0 – 61,0)
DDF	25, i.p.	25,5 (19,0 – 31,0)
	50, i.p.	22,0 (12,0 – 36,0)
	100, i.p.	7,0 (4,0 – 19,0) **
	200, i.p.	8,5 (0 – 20,0) **

Os valores estão expressos como mediana (mínimo – máximo) do índice de lesão gástrica relacionada aos escores obtidos com a escala proposta por Szabo et al. (1985). Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada) ou DDF foram administrados, por via intraperitoneal, 45 min antes da administração oral de indometacina (30 mg/Kg). Os animais foram sacrificados 6 h após a administração da indometacina. Foram utilizados 8 animais por grupo. \*\* $p < 0,01$  vs controle (Kruskall-Wallis e teste de Dunn).



**FIGURA 11. Efeito da DDF no modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.** Os valores representam a mediana (mínimo – máximo) do índice de lesão gástrica relacionada aos escores obtidos com a escala proposta por Szabo et al. (1985). Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou DDF (25, 50, 100 e 200 mg/Kg, i.p.) foram administrados 45 min antes da administração de indometacina (30 mg/Kg, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo. \*\* $p < 0,01$  vs controle veículo (Kruskall-Wallis e teste de Dunn).



**FIGURA 12. Aspectos macroscópicos de estômago de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina.** (A) – Estômago aberto pela grande curvatura de um camundongo no qual foi administrado apenas veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.). (B) – Estômago aberto pela grande curvatura de um camundongo tratado com veículo 45 min antes da administração oral de indometacina (30 mg/Kg). (C) – Estômago aberto pela grande curvatura de um camundongo tratado com DDF (100 mg/Kg, i.p.) 45 min antes da administração oral de indometacina.

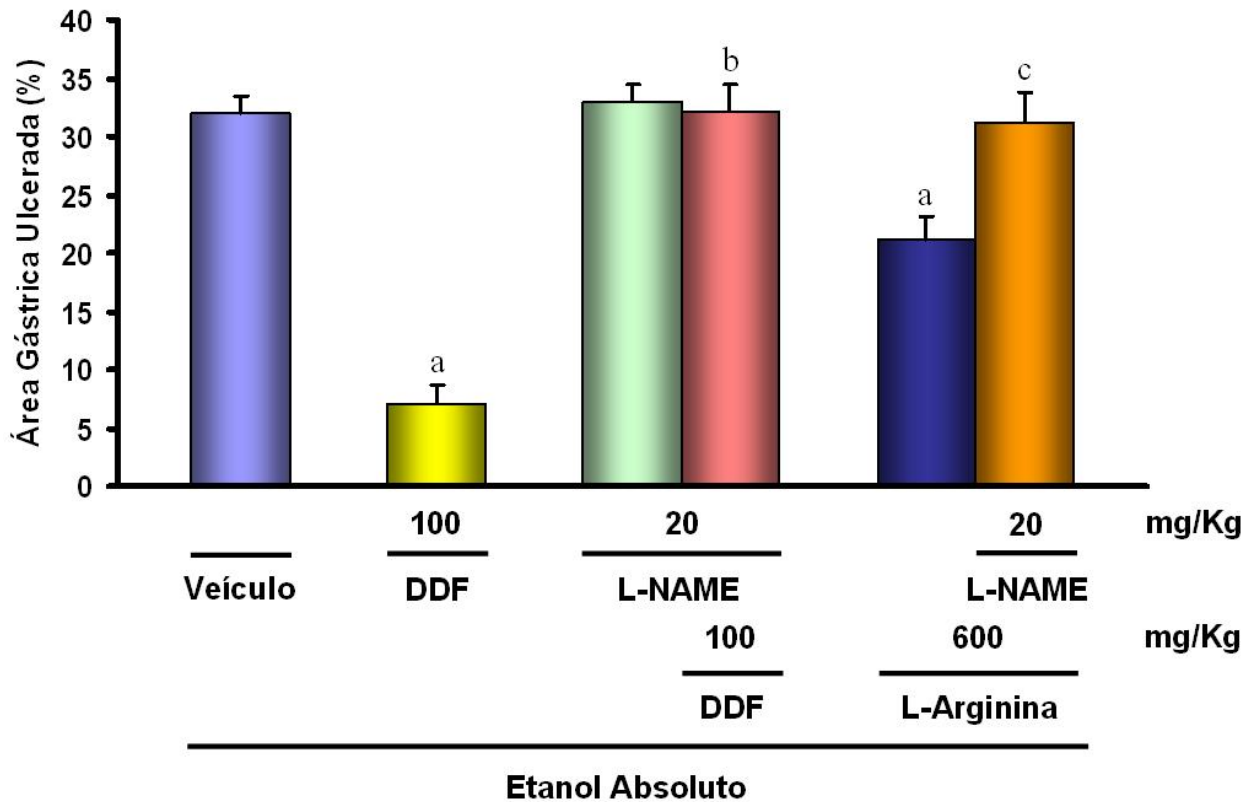
### 5.5 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Os animais que receberam apenas veículo mostraram, após a administração oral do etanol absoluto, extensa área de lesão da mucosa gástrica. DDF (100 mg/Kg, i.p.) reduziu de forma significativa ( $p < 0,001$ ) o percentual de lesão gástrica ( $7,10 \pm 1,54$  %) em comparação com o grupo controle ( $31,97 \pm 1,40$  %), o que corresponde a um percentual de inibição de 78 %. Os animais tratados com L-NAME (20 mg/Kg, s.c.), um inibidor não seletivo das isoformas da NOS (Óxido Nítrico Sintase), não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no percentual de área gástrica ulcerada ( $32,90 \pm 1,49$  %), quando comparado ao grupo controle ( $31,97 \pm 1,40$  %). O efeito gastroprotetor da DDF (100 mg/Kg, i.p.) foi bloqueado ( $32,17 \pm 2,20$  %) de forma significativa ( $p < 0,001$ ) na presença do L-NAME (20 mg/Kg, s.c.). L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.), um aminoácido que funciona como substrato para a síntese de óxido nítrico, reduziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ), cerca de 34 % do percentual de área gástrica ulcerada ( $21,16 \pm 1,89$  %), quando comparado ao grupo controle ( $31,97 \pm 1,40$  %). L-NAME (20 mg/Kg, s.c.) reverteu ( $31,22 \pm 2,52$  %), significativamente ( $p < 0,001$ ), o efeito gastroprotetor da L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.). Os resultados obtidos com a avaliação do papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF, nesse modelo, podem ser observados na **Tabela 4 e Figura 13**.

**TABELA 4. Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>DOSE (mg/Kg; via)</b>	<b>ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)</b>
Controle (veículo)	-	31,97 ± 1,40
DDF	100, i.p.	7,10 ± 1,5 <sup>a</sup>
L-NAME	20, s.c.	32,90 ± 1,49
L-NAME + DDF	20, s.c. + 100, i.p.	32,17 ± 2,20 <sup>b</sup>
L-Arginina	600, i.p.	21,16 ± 1,89 <sup>a</sup>
L-NAME + L-Arginina	20, s.c. + 600, i.p.	31,22 ± 2,52 <sup>c</sup>

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada) ou DDF foram administrados, por via intraperitoneal, 45 min antes e, L-NAME, por via subcutânea ou L-Arginina, por via intraperitoneal, 30 min antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Nas combinações, L-NAME foi administrado, por via subcutânea, 15 min antes da DDF ou L-Arginina, sendo estes administrados por via intraperitoneal. Os animais foram sacrificados 30 min após a administração do etanol<sub>abs</sub>. Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup>p<0,01 vs controle; <sup>b</sup>p<0,001 vs DDF; <sup>c</sup>p<0,001 vs L-Arginina (ANOVA e teste de Student Newman Keul).



**FIGURA 13. Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.** Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada. Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou DDF (100 mg/Kg, i.p.) foram administrados 45 min antes e, L-NAME (20 mg/Kg, s.c.) ou L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.), 30 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, L-NAME (20 mg/Kg, s.c.) foi administrado 15 min antes da DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.). Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,01$  vs controle veículo; <sup>b</sup> $p < 0,001$  vs DDF (100 mg/Kg, i.p.); <sup>c</sup> $p < 0,001$  vs L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.) (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

### **5.6 Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

Os resultados obtidos com a avaliação do papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor da DDF, neste modelo, podem ser observados na **Tabela 5 e Figura 14**.

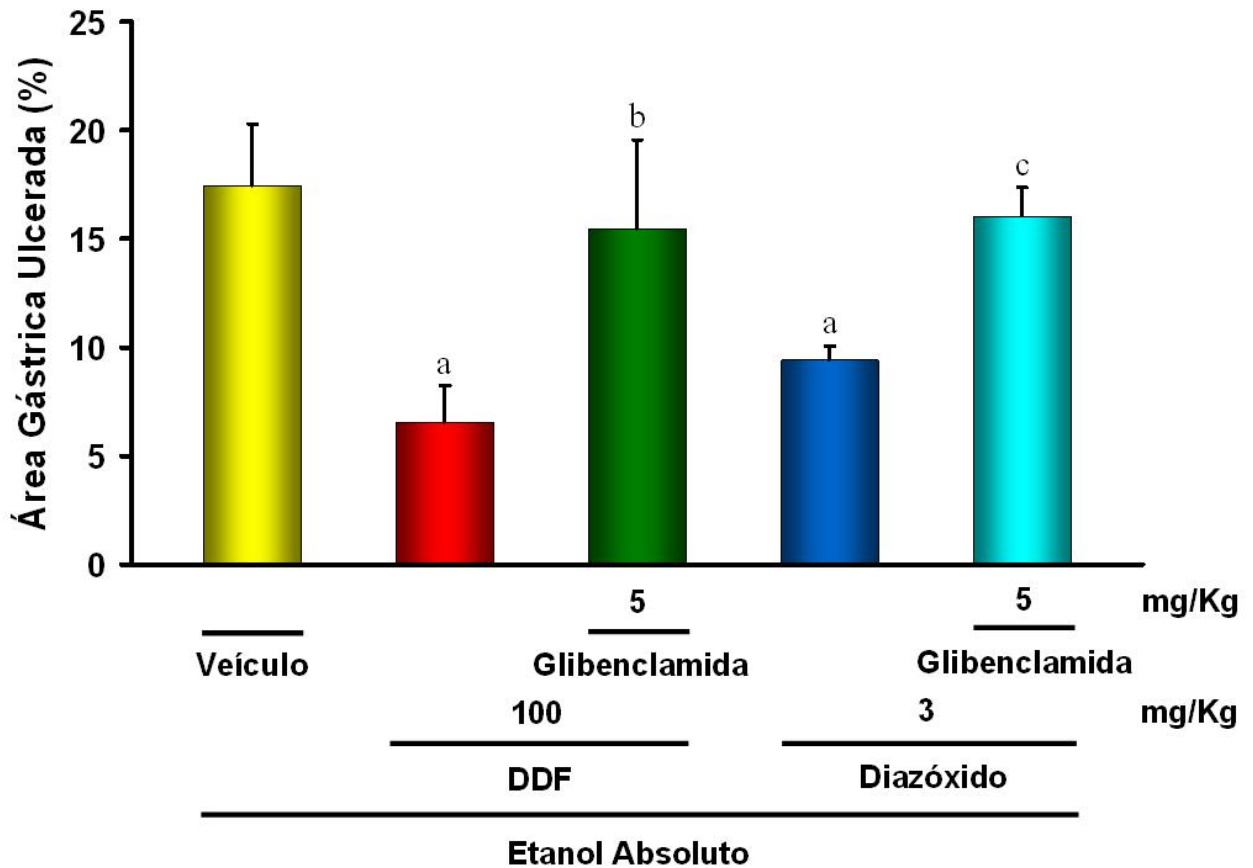
DDF (100 mg/Kg, i.p.) reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ), cerca de 63 % do percentual de lesão gástrica ( $6,53 \pm 1,67$  %) em comparação com o grupo controle ( $17,41 \pm 2,87$  %). O efeito gastroprotetor da DDF (100 mg/Kg, i.p.) foi bloqueado ( $15,46 \pm 4,13$  %) de forma significativa ( $p < 0,05$ ) na presença de glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.), um bloqueador dos canais de potássio ATP-dependentes. Diazóxido (3 mg/Kg, i.p.), uma substância que promove a abertura de  $K_{ATP}$ , reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o percentual de área gástrica ulcerada ( $9,43 \pm 0,68$  %), quando comparado ao grupo controle ( $17,41 \pm 2,87$  %), o que corresponde a um percentual de inibição de 46 %. Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) reverteu ( $16,02 \pm 1,37$  %), de maneira estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ), o efeito gastroprotetor do diazóxido (3 mg/Kg, i.p.).



**TABELA 5. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>DOSE (mg/Kg; via)</b>	<b>ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)</b>
Controle (veículo)	-	17,41 ± 2,87
DDF	100, i.p.	6,53 ± 1,67 <sup>a</sup>
Glibenclamida + DDF	5, i.p. + 100, i.p.	15,46 ± 4,13 <sup>b</sup>
Diazóxido	3, i.p.	9,43 ± 0,68 <sup>a</sup>
Glibenclamida + Diazóxido	5, i.p. + 3, i.p.	16,02 ± 1,37 <sup>c</sup>

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada), DDF ou diazóxido foram administrados, por via intraperitoneal, 45 min antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Nas combinações, glibenclamida foi administrada, por via intraperitoneal, 15 min antes da DDF ou diazóxido, sendo estes administrados também por via intraperitoneal. Os animais foram sacrificados 30 min após a administração do etanol<sub>abs</sub>. Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup>p<0,05 vs controle; <sup>b</sup>p<0,05 vs DDF; <sup>c</sup>p<0,05 vs diazóxido (ANOVA e teste de Student Newman Keul).



**FIGURA 14. Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.** Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada. Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.), DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) foram administrados 45 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) foi administrada 15 min antes da DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou diazóxido (3 mg/Kg, i.p.). Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs controle veículo; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs DDF (100 mg/Kg, i.p.); <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

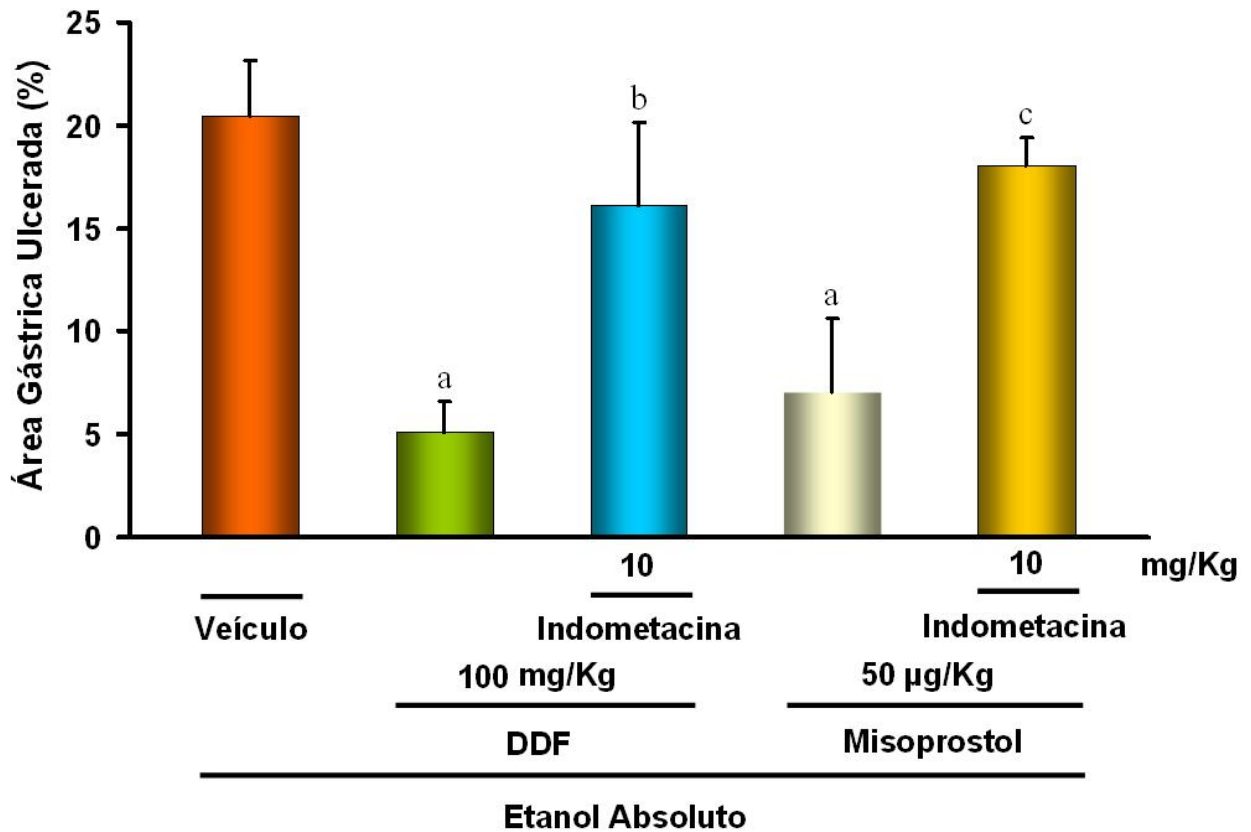
### **5.7 Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

Os animais do grupo controle, os quais receberam apenas veículo antes da administração oral do etanol absoluto, apresentaram extenso percentual de área gástrica ulcerada ( $20,43 \pm 2,69$  %). DDF (100 mg/Kg, i.p.) reduziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) o percentual de lesão gástrica ( $5,06 \pm 1,52$  %) em comparação com o grupo controle ( $20,43 \pm 2,69$  %), o que corresponde a um percentual de inibição de 75 %. O efeito gastroprotetor da DDF (100 mg/Kg, i.p.) foi bloqueado ( $16,13 \pm 3,98$  %) de forma significativa ( $p < 0,05$ ) na presença de indometacina (10 mg/Kg, v.o.), um antiinflamatório não esteroidal (AINE) que atua inibindo as ações da enzima ciclooxigenase (COX). Misoprostol (50  $\mu$ g/Kg, v.o.), um análogo das prostaglandinas do tipo E1 (PGE1), reduziu de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) cerca de 66 % do percentual de lesão gástrica ulcerada ( $7,03 \pm 3,61$  %), quando comparado ao grupo controle ( $20,43 \pm 2,69$  %). Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) reverteu ( $18,03 \pm 1,36$  %), significativamente ( $p < 0,05$ ), o efeito gastroprotetor do misoprostol (50  $\mu$ g/Kg, v.o.). Os resultados obtidos com o modelo que avalia do papel das PG's no efeito gastroprotetor da DDF estão demonstrados também na **Tabela 6 e Figura 15**.

**TABELA 6. Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>DOSE (mg ou µg/Kg, via)</b>	<b>ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)</b>
Controle (veículo)	-	20,43 ± 2,69
DDF	100 mg/Kg, i.p.	5,06 ± 1,52 <sup>a</sup>
Indometacina + DDF	10mg/Kg, v.o. + 100mg/Kg, i.p.	16,13 ± 3,98 <sup>b</sup>
Misoprostol	50 µg/Kg, v.o.	7,03 ± 3,61 <sup>a</sup>
Indometacina + Misoprostol	10mg/Kg, v.o. + 50µg/Kg, v.o.	18,03 ± 1,36 <sup>c</sup>

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada), DDF foram administrados, por via intraperitoneal, e misoprostol, por via oral, 1 h antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Nas combinações, indometacina foi administrada, por via oral, 2 h antes da DDF ou misoprostol, sendo estes administrados por via intraperitoneal e oral respectivamente. Os animais foram sacrificados 30 min após a administração do etanol<sub>abs.</sub>. Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup>p<0,05 vs controle; <sup>b</sup>p<0,05 vs DDF; <sup>c</sup>p<0,05 vs misoprostol (ANOVA e teste de Student Newman Keul).



**FIGURA 15. Papel das prostaglandinas (PG's) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.** Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.), DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou misoprostol (50  $\mu$ g/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, indometacina (10 mg/Kg, v.o.) foi administrada 2 h antes da DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou misoprostol (50  $\mu$ g/Kg, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs controle veículo; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs DDF (100 mg/Kg, i.p.); <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs misoprostol (50  $\mu$ g/Kg, v.o.) (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

### **5.8 Papel dos receptores TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

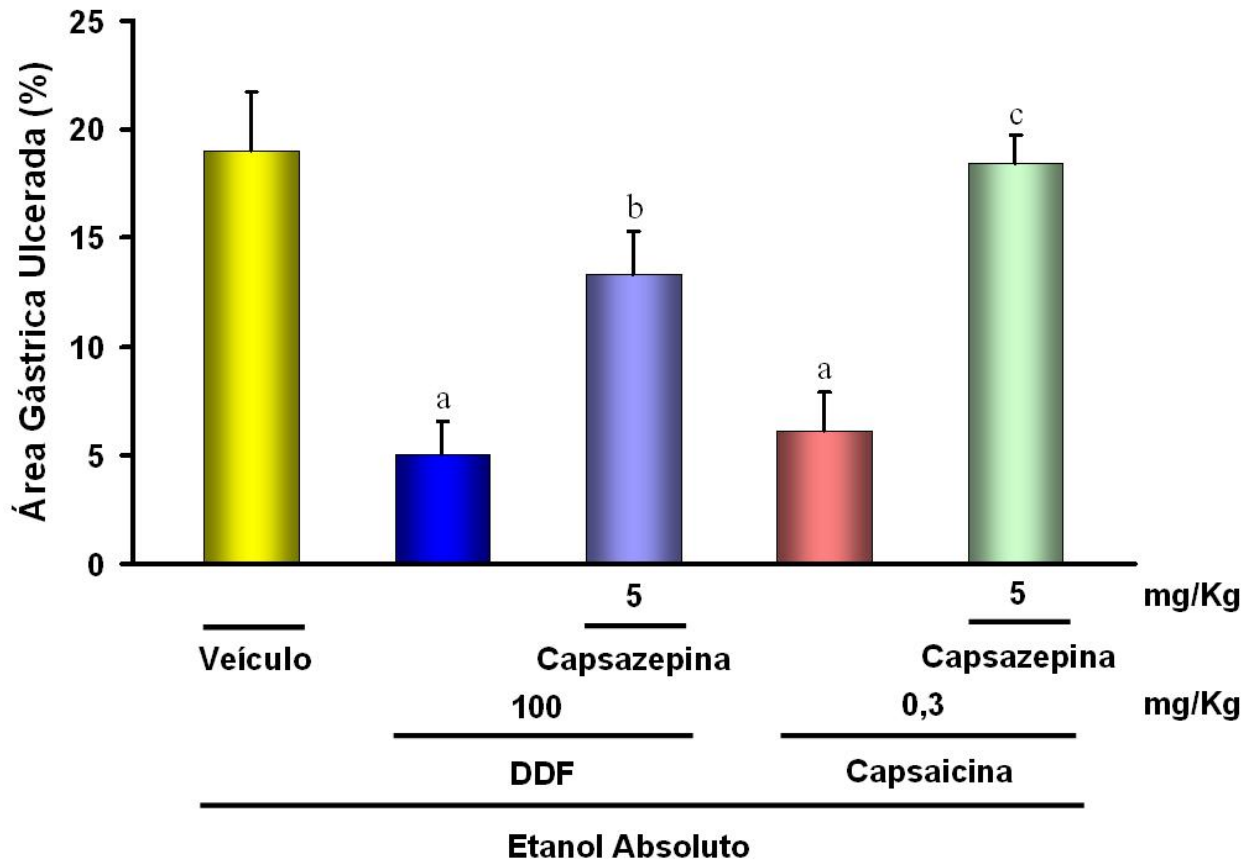
Os resultados obtidos com a avaliação do papel dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina no efeito gastroprotetor da DDF, neste modelo, podem ser observados na **Tabela 7** e **Figura 16**.

DDF (100 mg/Kg, i.p.) reduziu de forma significativa ( $p < 0,001$ ) cerca de 73 % do percentual de lesão gástrica ( $5,06 \pm 1,52$  %) em comparação com o grupo controle ( $19,01 \pm 2,71$  %). O efeito gastroprotetor da DDF (100 mg/Kg, i.p.) foi bloqueado ( $13,32 \pm 2,00$  %) de forma significativa ( $p < 0,05$ ) na presença de capsazepina (5 mg/Kg, i.p.), um bloqueador seletivo dos receptores TRPV1. Capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.), uma substância agonista dos receptores TRPV1, reduziu de maneira significativa ( $p < 0,001$ ) o percentual de área gástrica ulcerada ( $6,11 \pm 1,79$  %), quando comparado ao grupo controle ( $19,01 \pm 2,71$  %), o que corresponde a um percentual de inibição de 68 %. Capsazepina (5 mg/Kg, i.p.) reverteu ( $18,42 \pm 1,34$  %), significativamente ( $p < 0,001$ ), o efeito gastroprotetor da capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.).

**TABELA 7. Papel dos receptores TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>DOSE (mg/Kg; via)</b>	<b>ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)</b>
Controle (veículo)	-	19,01 ± 2,71
DDF	100, i.p.	5,06 ± 1,52 <sup>a</sup>
Capsazepina + DDF	5, i.p. + 100, i.p.	13,32 ± 2,00 <sup>b</sup>
Capsaicina	0,3, v.o.	6,11 ± 1,79 <sup>a</sup>
Capsazepina + Capsaicina	5, i.p. + 0,3, v.o.	18,42 ± 1,34 <sup>c</sup>

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Foram administrados veículo (2 % de Tween 80 em água destilada) ou DDF, por via intraperitoneal, ou capsaicina, por via oral, 1 h antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Nas combinações, capsazepina foi administrada, por via intraperitoneal, 30 min antes da DDF ou capsaicina, sendo estes administrados por via intraperitoneal e oral respectivamente. Os animais foram sacrificados 30 min após a administração do etanol<sub>abs</sub>. Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup>p<0,001 vs controle; <sup>b</sup>p<0,05 vs DDF; <sup>c</sup>p<0,001 vs capsaicina (ANOVA e teste de Student Newman Keul).



**FIGURA 16.** Papel dos receptores TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada. Veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.), DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, capsazepina (5 mg/Kg, i.p.) foi administrada 30 min antes da DDF (100 mg/Kg, i.p.) ou capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,001$  vs controle veículo; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs DDF (100 mg/Kg, i.p.); <sup>c</sup> $p < 0,001$  vs capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.) (ANOVA e teste de Student Newman Keul).



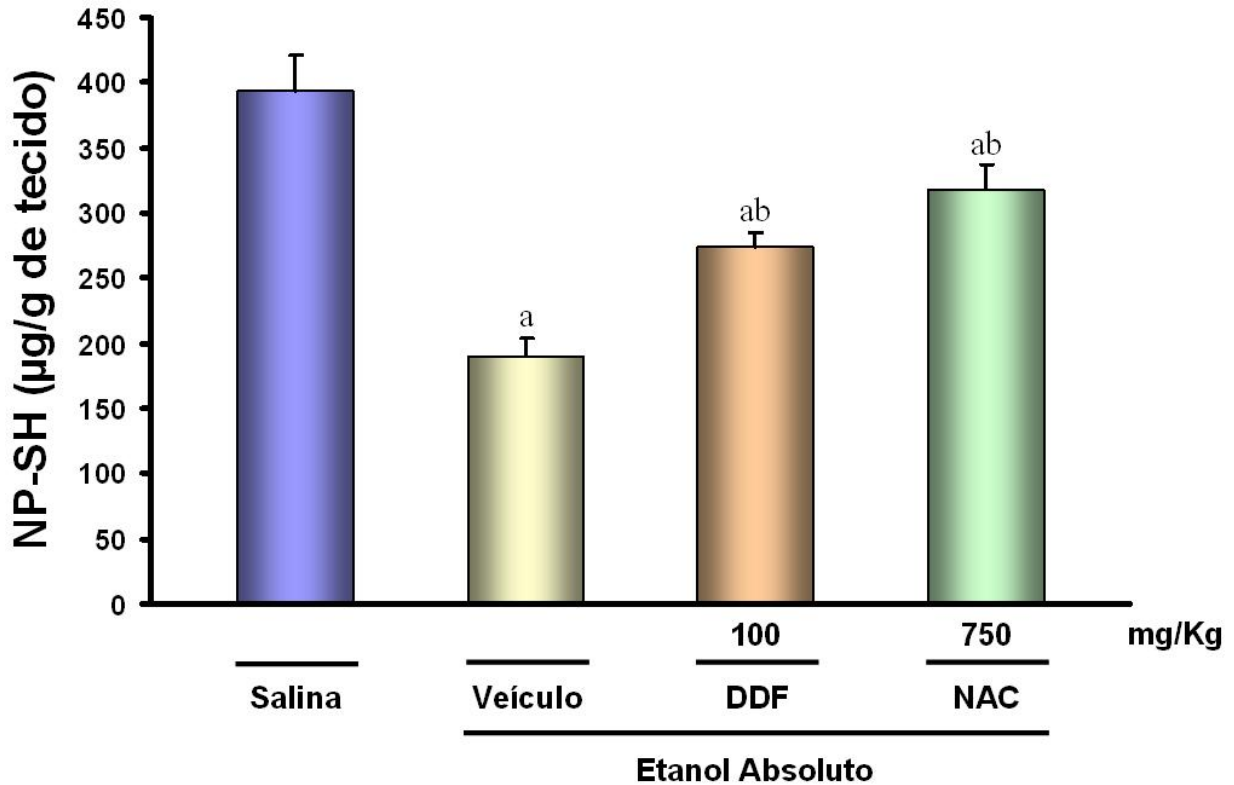
### **5.9 Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

Os animais que receberam apenas veículo mostraram, após a administração oral do etanol absoluto, significativa redução ( $p < 0,05$ ) nos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) ( $189,8 \pm 14,1 \mu\text{g/g}$  de tecido) quando comparado ao grupo controle salina ( $393,8 \pm 26,7 \mu\text{g/g}$  de tecido). DDF (100 mg/Kg, i.p.) foi capaz de restaurar, não completamente, mas de maneira significativa ( $p < 0,01$ ), os níveis de NP-SH ( $273,9 \pm 10,6 \mu\text{g/g}$  de tecido) em comparação com o grupo controle veículo. NAC (750 mg/Kg, v.o.) também conseguiu restabelecer ( $318,1 \pm 18,9 \mu\text{g/g}$  de tecido), significativamente ( $p < 0,01$ ), cerca de 81 % dos níveis de NP-SH em comparação com o grupo controle veículo (**Tabela 8 e Figura 17**).

**TABELA 8. Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>DOSE (mg/Kg; via)</b>	<b>NP-SH (µg/g de tecido)</b>
Controle (salina)	-	393,8 ± 26,7
Controle (veículo)	-	189,8 ± 14,1 <sup>a</sup>
DDF	100, i.p.	273,9 ± 10,6 <sup>ab</sup>
NAC	750, v.o.	318,1 ± 18,9 <sup>ab</sup>

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis gástricos de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH). Os níveis de NP-SH foram analisados 30 min após a administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). N-acetilcisteína (NAC) foi administrada, por via oral, 1 h antes e, veículo (2 % de Tween 80 em água destilada) ou DDF, por via intraperitoneal, 45 min antes da administração oral do etanol absoluto. Os animais foram sacrificados 30 min após a administração do etanol<sub>abs</sub>. Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup>p<0,05 vs controle salina; <sup>b</sup>p<0,01 vs controle veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).



**FIGURA 17. Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.** Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. para os níveis gástricos de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH). Os níveis NP-SH foram analisados 30 min após a administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/Kg, v.o.) foi administrada 1 h antes e, veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou DDF (100 mg/Kg, i.p.), 45 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs controle salina; <sup>b</sup> $p < 0,01$  vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

## 6. DISCUSSÃO

Os compostos de origem natural desempenham quatro papéis importantes na medicina moderna. Em primeiro lugar, fornecem alguns medicamentos extremamente úteis, cuja produção e comercialização na forma sintética são difíceis, se não impossível. De fontes naturais também são retirados compostos básicos que podem ser ligeiramente modificados para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicos. O terceiro papel desempenhado pelos produtos naturais é sua utilidade como protótipos ou modelos para medicamentos sintéticos que tenham atividades fisiológicas semelhantes às dos originais. Há um quarto papel desempenhado pelos produtos naturais, bem diferente dos acima citados, mas não menos importante. Alguns produtos naturais contêm compostos que apresentam atividade pequena ou nula em si mesmos, mas que podem ser modificados por métodos químicos ou biológicos para produzir drogas potentes, não obtidas facilmente por outros métodos (ROBBERS et al., 1997).

A medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para os mais diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica (MITSCHER et al., 1987). Isto é justificado, em parte, pelo alto grau de aceitabilidade das plantas medicinais, bem como, a grande disponibilidade destes recursos, diferente do que ocorre com os medicamentos industrializados, que na maioria, dependem de tecnologia e matéria-prima externas (AMORIM et al., 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 65 a 80 % da população mundial (estimada em 7 bilhões de pessoas), principalmente nos países em desenvolvimento, dependem primariamente das plantas medicinais na atenção básica à saúde. Dessa forma, as plantas medicinais, por constituírem matéria-prima de fácil acesso, de baixo custo e de fácil manipulação, têm contribuído muito para a saúde da população. São bilhões de pessoas utilizando essa alternativa, mas somente uma pequena percentagem sob indicação médica. São muitos os fatores que colaboram no uso de plantas medicinais, sobretudo econômicos e sociais. Sendo assim, o trabalho de pesquisa com plantas medicinais tende a produzir medicamentos com custos inferiores e mais acessíveis à população, a qual muitas vezes não

consegue arcar com os custos elevados da aquisição de medicamentos em atendimento às necessidades básicas de saúde (OLIVEIRA, 2005).

Plantas do gênero *Lonchocarpus* são conhecidas, não apenas pelo uso popular, mas também por suas atividades biológicas já caracterizadas através da pesquisa farmacológica, tais como, antimicrobiana de *Lonchocarpus montanus* (MAGALHÃES et al., 2007), antiinflamatória de *Lonchocarpus sericeus* (ALENCAR et al., 2005; NAPIMOGA et al., 2007), efeitos gastroprotetores atribuídos ao *Lonchocarpus oaxacensis* Pittier e ao *Lonchocarpus guatemalensis* Benth (REYES-CHILPA et al., 2006), antitumoral e antiprotozoária de *Lonchocarpus spp.* (BORGES-ARGÁEZ et al., 2007) e antioxidante de *Lonchocarpus utilis* (CABONI et al., 2004).

O *Lonchocarpus araripensis* Benth (Leguminosae), uma planta restrita da Região Nordeste, popularmente conhecida como anjelim, coção ou sucupira-branca, possui vários compostos isolados a partir do extrato hexânico obtido da casca de suas raízes, tais como os terpenos ácido betulínico e lupeol, além de vários flavonóides dentre os quais podemos citar a 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF).

Os flavonóides constituem um grupo de pigmentos polifenólicos vegetais de ampla distribuição na natureza que apresentam diversas atividades biológicas já reportadas na literatura, tais como antiulcerogênica (BLANK et al., 1997; RAO et al., 1997; BROZOZOWSKI et al., 2005; ZAIACHKIVSKA et al., 2005), antioxidante (MIZUI et al., 1987; SOUZA et al., 1999), antiinflamatória (RAO et al., 2003; VIEIRA et al., 2004), antialérgica (KAWAI et al., 2007), antidiarreica (RAO et al., 1997), hepatoprotetora (RAO et al., 1994; ALARCÓN DE LA LASTRA et al., 1995), antinociceptiva (MEOTTI et al., 2006), anti-anafilática (SOUZA et al., 1992), antiviral (BAE et al., 2000), antitumoral (CHANG & KINGHORNE, 2001) e hormonal (KNIGHT & EDEN, 1995).

Constituindo uma das principais classes derivadas desse grupo de polifenóis, as flavonas são substâncias responsáveis por alguns dos principais efeitos biológicos atribuídos aos flavonóides. A importância das flavonas para a pesquisa farmacológica está relacionada principalmente com a enorme quantidade de estudos já realizados demonstrando várias atividades tais como anti-alérgica (YANO et al., 2007), antiinflamatória (KIM et al., 2004; LEE et al., 2007), antinociceptiva (RAJENDRAN et al., 2000), antioxidante (BENEDEK et

al., 2006), antiulcerogênica (TAKASE et al., 1994; LA CASA et al., 2000), antiespasmódica (GILANI et al., 2006), antiviral (BRINKWORTH et al., 1992) e antitumoral (CABRERA et al., 2007).

Tendo em vista as ações farmacológicas atribuídas a espécies do gênero *Lonchocarpus*, assim como as atividades biológicas apresentadas pelos flavonóides, o trabalho objetivou estudar o efeito gastroprotetor da DDF, isolada de *Lonchocarpus araripensis*, e avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos, através de modelos experimentais clássicos de úlcera gástrica induzida por etanol ou indometacina em camundongos.

A descoberta, principalmente nas últimas décadas, de técnicas que facilitaram o estudo da mucosa gástrica, ocasionou um grande avanço nas investigações sobre a doença péptica ulcerosa (DPU) (BRZOZOWSKI, 2003). Não obstante os avanços, a DPU ainda possui um papel importante na gastroenterologia clínica mundial com custos anuais, somente nos Estados Unidos, de aproximadamente 4 bilhões de dólares. Além disso, cerca de meio milhão de novos casos e de quatro milhões de recorrências são diagnosticados anualmente (MOYSÉS, 1998).

Em condições fisiológicas, a mucosa gástrica não é propensa a ser digerida de forma proteolítica por sua própria secreção endógena de pepsina e ácido clorídrico (TEORELL, 1939). As úlceras gástricas são lesões profundas da mucosa, onde, tanto os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (MILANI & CALABRÒ, 2001). Essas lesões parecem ser produzidas quando há um desequilíbrio entre as forças lesivas (HCl, pepsina, gastrina, proteases, radicais livres, etanol, nicotina, isquemia, leucotrienos, AINEs, estresse e *Helicobacter pylori*) e os mecanismos de defesa da mucosa (óxido nítrico, grupos sulfidrílicos não-protéicos, prostaglandinas, muco, bicarbonato e fluxo sanguíneo na mucosa) (GLAVIN & SZABO, 1992).

O álcool é a causa mais comum de ulceração gástrica entre os homens. É conhecido como uma substância necrosante que causa injúria na mucosa gástrica e, sua ingestão excessiva, pode resultar em gastrite, caracterizada por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987). O

etanol absoluto rapidamente promove a formação de lesões hemorrágicas na mucosa gástrica, sendo devido a uma reação inflamatória aguda que provoca como característica comum, um aumento na permeabilidade vascular (SZABO et al., 1985).

No estômago o álcool interfere na secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado pela histamina e gastrina. A barreira da mucosa é a principal proteção da mucosa gástrica contra o ácido gástrico e o etanol em altas concentrações aumenta a permeabilidade epitelial como conseqüência de mudanças no potencial celular, causando re-difusão de íons  $H^+$  (DAVENPORT, 1967; DAVENPORT, 1969). Nesse órgão também causa depleção dos grupos sulfidrílicos, que são necessários para estabilização das membranas celulares, bem como na eliminação de radicais livres. Ainda no estômago, o etanol influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo gástrico, provocando estase, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando os riscos de hemorragias, hiperemia, erosão e necrose tecidual com formação de estrias, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (MACMATH, 1990; BODE & BODE, 1997; SANTOS & RAO, 2001). A congestão capilar é quase sempre acompanhada de estase circulatória que não está associada somente com a constrição de vênulas na submucosa, mas também com a dilatação de arteríolas na submucosa (BOU-ABBOUD et al., 1988; OATES & HAKKINEN, 1988).

Além dos danos causados aos microvasos, o etanol pode causar dano direto à célula da mucosa gástrica. Estes efeitos somados levam à liberação de mediadores inflamatórios e vasoconstritores de artérias na submucosa, podendo resultar em isquemia, liberação de endotelina e degranulação de mastócitos. Mediadores vasoativos como a histamina, agem na microvasculatura, desencadeando uma séria de eventos que podem causar danos no tecido submucoso (AL-HARBI et al., 1997; GONZALEZ et al., 2001; TAN et al., 2002; MATSUDA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004). Fisiopatologicamente, as lesões na mucosa provocadas pelo álcool podem ser mediadas ou moduladas, diretamente ou indiretamente, por várias moléculas celulares, tais como as ciclooxigenases (COX), lipoxigenases, diversas citocinas, citocromo P450 2E1, tromboxanos e radicais livres derivados do oxigênio (ROBERT et al., 1979; TARNAWSKI et al., 1988). Alguns produtos do metabolismo do ácido araquidônico têm sido implicados na patogênese da injúria gástrica causada por etanol (PESKAR et al., 1986; SAMONINA et al., 2004). Os produtos da via 5-Lipoxigenase parecem ter papel chave no desenvolvimento de úlcera induzida por agentes irritantes como o etanol (LANGE et al., 1985).

O etanol também causa depleção de muco, possivelmente por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago, contribuindo assim, para a formação de úlceras (CHO et al., 1983; ISHIHARA et al., 1988). A liberação de muco em resposta a aplicação de agentes irritantes possui um papel importante no reparo do epitélio e no processo de restituição. Alguns autores demonstraram que o óxido nítrico e as prostaglandinas são capazes de aumentar a secreção de muco no estômago (ROWN et al., 1992).

No modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos, a administração intraperitoneal de DDF nas doses de 50, 100 ou 200 mg/Kg, preveniu, de maneira dose dependente, o aparecimento de lesões na mucosa gástrica. As doses inibiram em 62, 73 e 96 %, respectivamente, o percentual de área gástrica ulcerada em comparação com o grupo controle veículo, assim como a N-acetilcisteína (NAC) (750 mg/Kg), um conhecido antioxidante, que inibiu em cerca de 50 %. A dose de 25 mg/Kg da DDF não foi capaz de promover uma significativa inibição no processo ulcerativo e os animais se mostraram com um percentual de área gástrica ulcerada semelhante ao grupo controle veículo.

Drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINE<sub>s</sub>), como a indometacina, são conhecidas pelos seus efeitos tóxicos renais e por induzir dano gástrico através de múltiplos mecanismos. Drogas como a indometacina, agem inibindo o metabolismo do ácido araquidônico pela via das ciclooxigenases (COX) e assim alteram o equilíbrio entre os fatores agressores e protetores da mucosa do estômago promovendo aumento da acidez, redução do fluxo sanguíneo, bloqueio ou redução da síntese de prostaglandinas (PG's) além de ferir diretamente o estômago por sua ação irritante local (GONZALEZ et al., 2001). Além disso, essa substância também é capaz de aumentar a produção de leucotrienos (LTs), e o papel destes como mediadores da úlcera gástrica é bem notado na aplicação local de leucotrieno do tipo C4 (LTC<sub>4</sub>), que leva a uma vasoconstrição na mucosa gástrica de ratos e pode induzir estase nas arteríolas e vênulas na submucosa ( WHITTLE et al., 1985). A indometacina é um inibidor não-seletivo das COX e o modelo de úlcera gástrica induzida por essa substância é um teste bastante utilizado quando se deseja estudar possíveis mecanismos de drogas antiulcerogênicas (LANZA et al., 1995; TAHA et al., 1995; WAGNER et al., 1995).

Com o objetivo de avaliar a capacidade da DDF em inibir os danos gástricos causados pelos AINE<sub>s</sub>, realizamos um modelo clássico de indução da lesão gástrica por indometacina.



DDF, nas doses de 100 e 200 mg/Kg, i.p., foi capaz de prevenir o aparecimento de lesões gástricas em animais submetidos ao tratamento com este antiinflamatório não-esteroidal, na sua dose ulcerogênica. Já nas doses de 25 e 50 mg/Kg, i.p., a DDF não conseguiu promover significativa inibição do processo ulcerogênico em comparação com o grupo controle veículo. Os resultados sugerem um possível envolvimento da estimulação ou preservação da liberação de PG's, ou uma inibição de LTs no efeito citoprotetor/antiulcerogênico da DDF, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, i.p. Vários compostos com potencial gerador de PG's têm sido relatados como protetores de mucosa gástrica contra vários agentes ulcerogênicos (FRANZONE et al., 1988; DAJANI & AGRAWAL, 1995). Blank et al. (1997) demonstraram o efeito gastroprotetor dos flavonóides 5-metoxiflavona e 5-metoxiflavanona em modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina. Os autores sugeriram que o aumento da perfusão vascular gástrica e a redução da adesão leucocitária, principalmente ao nível de vênulas mesentéricas, poderiam estar contribuindo para o efeito gastroprotetor dos flavonóides.

É bem conhecido que as PG's têm efeito anti-secretório e gastroprotetor (ROBERT et al., 1979). O mecanismo pelo qual as PG's protegem a mucosa não foi completamente esclarecido, mas o aumento da secreção de muco e bicarbonato é uma possível explicação (SMEDIFORDS & JOHANSSON, 1986; WILSON et al., 1986) assim como o aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (COLTON et al., 1978). Dessa forma, os AINE<sub>s</sub> atuam aumentando a susceptibilidade da mucosa gástrica a lesões. As complicações causadas pelo consumo abusivo destas substâncias, resultam em maior parte, da inibição da isoenzima ciclooxigenase do tipo 1 (COX-1). A COX-1 é responsável por manter a integridade da mucosa e fluxo sanguíneo enquanto a ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2) está envolvida no processo inflamatório (VANE & BOTTING, 1998). Pesquisas extensivas têm levado à síntese de inibidores altamente seletivos de COX-2 que, presumivelmente, possuem menos efeitos danosos sobre o trato gastrointestinal. Recentemente, a teoria de segurança dos inibidores seletivos de COX-2 tem sido mudada mostrando que a COX-2 está envolvida na fisiologia renal (ROSSAT et al., 1999), participa na defesa da mucosa gástrica (SCHMASSMANN et al., 1998; MARICIC et al., 1999), contribui para a síntese de prostaglandinas no estômago de rato (TEGEDER et al., 2000), e que, a COX-1, está envolvida no processo inflamatório (LANGEBACH et al., 1995). Tanaka et al. (2004) evidenciaram que os inibidores não-seletivos de COX como a indometacina, o naproxen e o diclofenaco, inibem as prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e aumentam a motilidade gástrica causando sérias lesões gástricas, e sugerem que as propriedades ulcerogênicas dos AINE<sub>s</sub> não acontecem unicamente

por inibição da COX-1, mas requer a inibição de ambas as isoenzimas (COX-1 e COX-2) (TAKEUCHI et al., 2004).

A ação protetora das PG's na mucosa gástrica é mediada pelo aumento na produção de muco e secreção de bicarbonato, modulação da secreção do ácido gástrico, inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos e na manutenção do fluxo sanguíneo durante a exposição a agentes irritantes (BATISTA et al., 2004). É conhecido que a prostaglandina E2 (PGE2) possui uma ação protetora contra a lesão gástrica provocada pelo etanol (GLAVIN et al., 1996) e que essa proteção decorre de um aumento de guanosina-3',5'-monofosfato cíclica (GMPc) intracelular, que é mediado via aumento da concentração de cálcio intracelular livre e pela produção de óxido nítrico (SAKAI et al., 1995).

Para avaliarmos uma efetiva participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da DDF, utilizamos o misoprostol, um análogo das prostaglandinas do tipo E1 (PGE1), bem como indometacina, um inibidor da síntese de PG's.

Os resultados obtidos mostram que o misoprostol (50 µg/Kg, v.o.) inibiu significativamente o aparecimento das lesões gástricas quando comparado com o controle veículo. Esse resultado reflete bem os dados obtidos na literatura, os quais demonstram que o aparecimento de úlceras induzidas por etanol é inibido pela liberação de prostaglandinas endógenas na superfície da mucosa gástrica (HOLLANDER et al., 1984). O misoprostol inibe a secreção de ácido gástrico, tanto no estado basal quanto em respostas a alimentos, histamina, pentagastrina e cafeína, através de uma ação direta sobre a célula parietal. Além disso, essa substância aumenta o fluxo sanguíneo da mucosa e a secreção de muco e bicarbonato (RANG et al., 2004). Tanto o efeito gastroprotetor promovido pela DDF quanto pelo misoprostol, foram revertidos pelo pré-tratamento com indometacina (10 mg/Kg, v.o.), sugerindo que as PG's possuem um papel importante no mecanismo de gastroproteção da DDF. Possivelmente, a DDF poderia estar modulando a secreção gástrica ou promovendo um aumento na liberação de PG's e conseqüentemente, aumento no fluxo sanguíneo gástrico, na produção de muco e bicarbonato. Motilva et al. (1994) estudaram o efeito protetor do flavonóide naringenina sobre lesões de mucosa gástrica, produzidas por etanol, e o possível envolvimento de prostaglandinas endógenas nesse efeito gastroprotetor. Konturek et al. (1986) demonstraram a participação das prostaglandinas endógenas no efeito gastroprotetor de um flavonóide sintético derivado da soforadina.

A descoberta do óxido nítrico (NO) como um agente de sinalização celular foi um dos mais importantes acontecimentos na fisiologia humana dos anos 80-90. O NO é um gás de radical livre e não carregado que tem chamado a atenção pela sua participação na sinalização de inúmeros processos fisiológicos tais como: relaxamento do músculo liso e vasodilatação, neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação dos mecanismos pró e anti-apoptóticos, controle da pressão arterial e fluxo sanguíneo regional (RADOMSKI & MONCADA, 1993; KIM et al., 2001). Além disso, a produção excessiva ou ação inadequada de NO pode estar envolvida em vários processos patológicos como doenças inflamatórias, câncer e doenças neurodegenerativas (RANG et al., 2004).

Nas células do endotélio vascular, na presença do oxigênio molecular, as enzimas óxido nítrico sintases (NOS) catalisam a oxidação de cinco elétrons da L-Arginina, um aminoácido endógeno, produzindo o radical livre gasoso, NO e L-citrulina (MARLETTA, 1993; BUTTLER et al., 1995; KUO & SCHROEDER, 1995). Atualmente, existem três isoformas conhecidas das NOS: uma forma induzível (iNOS ou NOS-II) e duas formas constitutivamente expressas, sendo denominadas de NOS endotelial (eNOS ou NOS-III) e NOS neuronal (nNOS ou NOS-I) (MONCADA et al., 1991; PFEILSCHIFTER et al., 2001).

A iNOS é induzida principalmente por estímulos pró-inflamatórios e produz uma quantidade de NO aproximadamente 10.000 vezes maior do que as isoformas constitutivas. Sob condições fisiológicas as células produzem apenas pequenas quantidades de NO, e essa produção depende das enzimas constitutivas (eNOS e nNOS), indicando que o NO atua diretamente no controle de diversas respostas celulares. A eNOS produz NO para manutenção da homeostase vascular normal, é encontrada, além do endotélio, nos miócitos cardíacos, nas células mesangiais renais, nos osteoclastos, osteoblastos, plaquetas e possui uma atividade basal que é inibida por inibidores da NOS, como o  $N^G$ -nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) e  $N^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA) (FLEMING & BUSSE, 1999; RANG et al., 2004). O NO produzido pela ação da nNOS possui função de neurotransmissão, mas também pode ser utilizado para a regulação do tônus muscular do trato gastrointestinal (TGI) e músculo esquelético (FORSTERMANN et al., 1994; EISERICH et al., 1998).

No estômago o NO possui um importante papel na preservação e reparo de injúrias no TGI, participando no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato, na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrointestinal, além de atuar como agente citoprotetor,

antiinflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (WALLACE & GRANGER, 1996; MUSCARA & WALLACE, 1999). Estudos mostram que a presença de NO em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto o NO em altas concentrações pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens celulares (WALLACE & MILLER, 2000).

Os resultados obtidos com a avaliação do papel do óxido nítrico no efeito gastroprotetor da DDF no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos, mostram que, os animais que receberam L-NAME (20 mg/Kg, s.c.), apresentaram uma extensa área gástrica ulcerada, após a administração do etanol absoluto, semelhante ao grupo controle veículo. A DDF (100 mg/Kg, i.p.) conseguiu inibir o aparecimento das lesões gástricas em cerca de 78 %, 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 controle veículo, e esse efeito também foi revertido no pré-tratamento com L-NAME. Nahavandi et al. (1999) demonstraram que o L-NAME aumenta e a L-Arginina diminui a quantidade e intensidade da lesão provocada por álcool no estômago de ratos. Além disso, a L-Arginina acelera a cicatrização da úlcera gástrica estimulando fatores envolvidos na microcirculação e angiogênese (KONTUREK et al., 1993). Zayachkivska et al. (2005) demonstraram o efeito gastroprotetor de diversos flavonóides provavelmente devido a um aumento na expressão de NOS constitutiva e liberação de NO e neuropeptídeos. Assim, nossos resultados sugerem uma possível participação do óxido nítrico no efeito gastroprotetor da DDF. A DDF poderia estar atuando de modo a facilitar um maior fornecimento de NO, talvez por induzir um aumento na expressão das NOS constitutivas, ou até mesmo aumentar a eficiência de suas ações catalíticas. Além disso, a DDF poderia atuar também inibindo competitivamente uma ação efetiva do L-NAME sobre as NOS. Alguns autores mostraram que drogas que aumentam a liberação de NO constitutivo protegem a mucosa gástrica contra os AINEs, além de aumentar a cicatrização da úlcera induzida por esses fármacos (CALATAYUD et al., 1999; ELLIOTT et al., 1995).

Como foi visto anteriormente, o óxido nítrico pode atuar complementando o efeito gastroprotetor promovido pelas prostaglandinas (SAKAI et al., 1995; WALLACE & GRANGER, 1996; MUSCARA & WALLACE, 1999). Sabe-se também que o NO é capaz de aumentar a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias

(RANG et al., 2004). Estudos mostram que existe uma modulação cooperativa na defesa da mucosa gastrintestinal promovida pelas PG's e o NO (WALLACE, 1996). Hristovska et al. (2007) demonstraram que a PGE2 causava vasodilatação através da ativação de eNOS. Com relação ao nosso trabalho, os dados supracitados são de fundamental importância, pois poderíamos reforçar a hipótese de uma possível interação entre esses dois mediadores visto que conseguimos demonstrar suas participações no efeito gastroprotetor promovido pela DDF.

Os canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) pertencem a uma grande família de proteínas de membrana. Estes canais regulados por ligantes são definidos tendo por base a sua sensibilidade ao ATP intracelular, que inibe sua atividade. Foram descobertos inicialmente no coração (NOMA, 1983) e posteriormente em outros tecidos como o pâncreas (ASHCROFT et al., 1984), músculo esquelético (SPRUCE et al., 1985), músculo liso (STANDEN et al., 1989), rim (HUNTER & GIEBSCH, 1988) e cérebro (ASHFORD et al., 1988). O papel fisiológico dos canais de  $K_{ATP}$  tem sido mais bem caracterizado nas células  $\beta$ -pancreáticas. Nestas células, o aumento na concentração de ATP e do metabolismo da glicose fecha os canais de  $K_{ATP}$  (COOK et al., 1988). No sistema vascular, esses canais estão implicados no relaxamento do músculo liso vascular, possuindo um papel importante no controle da pressão sanguínea (NELSON & QUAYLE, 1995). Essa vasodilatação pode ser bloqueada pela glibenclamida, uma sulfonilreia que causa bloqueio dos canais  $K_{ATP}$  (BEECH et al., 1993). Tem sido postulado que os canais de  $K_{ATP}$  estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas do estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade do estômago (TOROUDI et al., 1999).

Alguns compostos como diazóxido, cromacalina, pinacidil e o nicorandil são substâncias que ativam e abrem os canais de potássio em diversos tecidos, causando hiperpolarização da membrana plasmática e redução da atividade elétrica (ASHCROFT & GRIBLLE, 2000; JAHANGIR et al., 2001). Trabalhos recentes estudando os efeitos do diazóxido no estômago demonstraram que ele inibiu as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol, enquanto a glibenclamida, um agente hipoglicemiante oral que estimula a secreção de insulina por bloquear os canais de potássio ATP-dependentes, aumentou as lesões gástricas (TOROUDI et al., 1999). A diminuição do fluxo sanguíneo gástrico é uma das possibilidades pelas quais a glibenclamida poderia aumentar as lesões gástricas induzidas por etanol. Também foi mostrado que o efeito lesivo direto da indometacina na mucosa gástrica de rato

pode ser agravado pelo uso da glibenclamida. Entretanto esse efeito pode ser inibido com o uso de cromacalina ou diazóxido (AKAR et al., 1999; GOMES et al., 2006). Peskar et al. (2002) demonstraram que a gastroproteção promovida pelas prostaglandinas é inibida não somente pela indometacina, mas também pela glibenclamida. Estes dados sugerem que o mecanismo de ação das prostaglandinas endógenas e exógenas envolve a ativação dos canais de  $K_{ATP}$ . Assim, todos esses trabalhos sugerem que a modulação, tanto da abertura como do fechamento dos canais de  $K_{ATP}$ , no estômago, pode ser um mecanismo de defesa da mucosa gástrica e agressões externas.

A capacidade da glibenclamida e do diazóxido de alterar a resposta de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento dos canais de  $K_{ATP}$  nos eventos biológicos que resultam em gastroproteção (STANDEN et al., 1989). No presente estudo, avaliamos o papel dos canais de  $K_{ATP}$  no efeito gastroprotetor da DDF no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. A DDF (100 mg/Kg, i.p.) conseguiu reduzir, de forma significativa, o percentual de área gástrica ulcerada em comparação com o grupo controle veículo. De forma semelhante, o diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) também inibiu o aparecimento das lesões gástricas em comparação com o mesmo grupo controle veículo. O efeito gastroprotetor promovido por essas duas substâncias foi revertido na presença de glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.). Esses resultados sustentam a hipótese de uma possível participação dos canais de  $K_{ATP}$  no efeito gastroprotetor da DDF. Avaliando os resultados até o presente momento, podemos sugerir ainda que a participação das prostaglandinas e do óxido nítrico no efeito gastroprotetor da DDF, confirmada após a realização dos experimentos de lesão gástrica induzida por etanol, poderia estar acoplada a um sistema de abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, com conseqüente relaxamento endotelial na vasculatura gástrica e aumento do fluxo sanguíneo na região afetada, impedindo assim a formação das úlceras.

Uma das mais interessantes substâncias obtidas da pimenta vermelha (*Pipper*) é a capsaicina. Essa substância age sobre os neurônios sensoriais estimulando os receptores de membrana, predominantemente receptores vanilóides (TRPV1), liberando neuropeptídeos tais como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Em pequenas doses, a capsaicina funciona como um potente gastroprotetor, estimulando a microcirculação gástrica, porém em altas doses, ela destrói seletivamente as terminações neuronais das fibras

C resultando em uma inativação dos nervos sensoriais e perda dos reflexos nos quais estes nervos estão envolvidos (SZOLCSANYI & BAETHO, 2001; EVANGELHISTA, 2006).

Evidências mostram que, no estômago, os nervos sensoriais aferentes sensíveis à capsaicina estão envolvidos no mecanismo de defesa local contra a formação de úlceras gástricas e que a administração oral de capsaicina exerce proteção contra lesões gástricas induzidas por etanol (PARK et al., 2000).

Com base no exposto acima, decidimos investigar o papel das fibras aferentes sensíveis à capsaicina no efeito gastroprotetor da DDF em modelo de lesão gástrica induzida por etanol. Para tanto, utilizamos capsaicina em uma pequena dose oral (3 mg/Kg), e também a capsazepina, um antagonista específico dos receptores TRPV1.

De forma semelhante à capsaicina, a DDF reduziu significativamente o percentual de área gástrica ulcerada em comparação com o grupo controle veículo. O efeito gastroprotetor promovido por essas duas substâncias foi revertido na presença de capsazepina. Esses resultados evidenciam a possível participação das fibras sensoriais aferentes no mecanismo de ação da DDF. Acredita-se que o mecanismo pelo qual a capsaicina exerce sua gastroproteção, deve-se às prostaglandinas e ao aumento da microcirculação na mucosa gástrica via NO, aumento na secreção de muco e bicarbonato, efeitos estes, mediados pela ativação dos neurônios sensoriais aferentes no estômago (KATO et al., 2003). Brzowski et al. (2005) atribuíram aos flavonóides presentes no extrato das sementes de pomelo, o efeito antiulcerogênico evidenciado em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. Nesse mesmo trabalho, os autores sugerem o aumento na geração de PG's endógenas, a supressão da lipoperoxidação e a hiperemia possivelmente mediada pelo NO e CGRP liberados pelas fibras sensoriais aferentes, como possíveis mecanismos de ação gastroprotetor.

Como já tínhamos evidenciado anteriormente uma possível participação das prostaglandinas, dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) e do NO, no efeito gastroprotetor da DDF, podemos sugerir que esta poderia atuar promovendo gastroproteção de forma inespecífica através de um complexo sistema que envolveria a sensibilização dos TRPV1 e, conseqüentemente, liberação de NO e PG's, sendo que as PG's poderiam atuar, tanto via canais de  $K_{ATP}$  como por ativação de eNOS e conseqüente liberação de NO, e este, por sua vez, poderia levar novamente à uma liberação de PG's, principalmente PGE2, como também poderia atuar diretamente via canais de  $K_{ATP}$ . Todos esses efeitos somados levariam a

um aumento no fluxo sanguíneo gástrico, na secreção de muco e bicarbonato e no poder de cicatrização das úlceras. Contudo, essas ações ainda precisam ser investigadas de forma mais detalhadas para que possamos evidenciar de maneira efetiva, possíveis mecanismos pelos quais a DDF atuaria levando a uma gastroproteção.

Um ponto essencial para o nosso trabalho seria avaliar um possível efeito antioxidante promovido pela DDF, pois como vimos anteriormente, a indução de lesão gástrica por etanol ocorre de maneira multifatorial e o estresse oxidativo com certeza se apresenta como um dos fatores mais importantes na fisiopatologia das úlceras gástricas induzidas por etanol.

Estudos têm demonstrado que as lesões induzidas pelo etanol são oriundas de dano direto às células da mucosa gástrica, resultando no desenvolvimento de radicais livres e, conseqüentemente, lipoperoxidação. Compostos antioxidantes podem ser ativos, nesse modelo experimental, complexando-se com os radicais livres e, assim, produzir efeitos antiulcerogênicos (MATSUDA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004). De certa forma, isso explica o fato da NAC (750 mg/Kg) ter conseguido reduzir o percentual de área gástrica ulcerada em comparação com o grupo controle veículo.

Etanol, ainda, depleta os níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH), contidos nos tecidos estomacais, e a restauração destes parece ser importante na gastroproteção. Os radicais livres citotóxicos parecem ser detoxificados por ligação com glutathiona (GSH), o maior componente endógeno do “pool” dos NP-SH (PARK et al., 2000; GONZALES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína. A atividade antioxidante do GSH é mediada por dois mecanismos: primeiro, o GSH pode diretamente remover radicais livres; segundo, ela pode funcionar como um substrato para a glutathiona peroxidase (GPX), eliminando peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos no citosol e mitocôndrias (REED & FARISS, 1984). Na década de 80, um grande número de pesquisadores relatou sobre a importância do GSH na defesa da mucosa gástrica. Essa tese foi inicialmente baseada na observação de que, tanto no homem como em animais, o GSH está presente em altas concentrações no estômago quando comparado com outros órgãos, sugerindo seu papel protetor como um composto antioxidante endógeno (MILLER et al., 1985; MUZUI & DOTEUCHI, 1986).



Normalmente, o GSH atua como um sequestrador de radicais livres e de substâncias tóxicas presentes no TGI, produzidas durante a alimentação (SHIRIN et al., 2001). Sob condições de estresse oxidativo, como no tratamento com etanol, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas pelo GSH com a concomitante formação de glutatona oxidada (GSSG). Além da sua ação como um antioxidante químico, o GSH também atua na primeira linha de defesa antioxidante como um cofator da glutatona peroxidase na redução de peróxidos que também resulta na formação de GSSG (CNUBBEN et al., 2001).

Na tentativa de determinar uma possível ação antioxidante da DDF, avaliamos a participação dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor dessa flavona em modelo de úlcera induzida por etanol. Os resultados mostram que o etanol promoveu depleção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos na mucosa gástrica. A administração de NAC (750 mg/Kg, v.o.) foi efetiva em restabelecer os níveis de NP-SH no estômago. De forma semelhante, a administração de DDF (100 mg/Kg, i.p.) também foi capaz 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, possivelmente, a DDF seja capaz de promover gastroproteção através de um mecanismo que dependa também de uma ação antioxidante. Além disso, esses dados obtidos conseguem refletir estudos já estabelecidos na literatura os quais demonstram o papel antioxidante atribuído a grande parte dos flavonóides. A rutina, um exemplo de flavonóide bastante estudado atualmente, é conhecida por suas propriedades antiinflamatória, vasoativa e antiulcerogênica. Existem relatos de que a rutina é um importante agente anti-lipoperoxidante e também um forte sequestrador de radicais hidroxil e superóxidos, os quais estão envolvidos na injúria tecidual (LA CASA et al., 2000).

## 7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos, no presente estudo, com a 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona (DDF), uma substância isolada de *Lonchocarpus araripensis*, nos permitiram delinear as seguintes conclusões:

- A DDF, nas doses testadas, na avaliação da toxicidade aguda, não promoveu sinais de toxicidade e não foi capaz de induzir mortalidade nos animais.
- A DDF demonstrou atividade gastroprotetora em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina em camundongos.
- No modelo de lesões gástricas induzidas por etanol, tanto o L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, como a glibenclamida, um antagonista de canais de potássio ATP dependentes ( $K_{ATP}$ ), reverteram, de maneira significativa, a gastroproteção promovida pela DDF, sugerindo uma possível participação do óxido nítrico e dos canais de  $K_{ATP}$  no seu efeito protetor.
- As prostaglandinas (PG's) e os receptores vanilóides do tipo TRPV1 presentes nas fibras aferentes sensíveis à capsaicina, também parecem possuir um papel importante no mecanismo de ação da DDF, visto que drogas como a indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxigenase ou a capsazepina, um antagonista específico dos receptores TRPV1, conseguiram inibir significativamente seu efeito gastroprotetor em lesões gástricas induzidas por etanol.
- O efeito gastroprotetor da DDF parece estar relacionado também com uma possível ação antioxidante porquanto essa substância foi capaz de restabelecer, de maneira significativa, os níveis gástricos de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol.

- Os resultados obtidos nesse estudo fornecem evidências para uma futura utilização terapêutica do *Lonchocarpus araripensis* e parte dessa ação pode ser explicada pela presença da DDF, visto que suas atividades biológicas demonstradas servem como requisitos importantes para qualificar essa molécula como uma ferramenta farmacológica, em potencial, no tratamento de gastropatias associadas ao uso abusivo de etanol ou DAINES.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFI, F.U.; KHALIL, E.; TAMIMI, S.O.; DISI, A. **Evaluation of the gastroprotective effect of *Laurus nobilis* seeds on ethanol induced gastric ulcer in rats.** Journal of Ethnopharmacology; v. 58, p. 9-14, 1997.

AKAR, F.; UYDES-DOGAN, B.S.; BUHARALIOGLU, C.K.; ABBAN, G.; HEINEMANN, A.; HOLZER, P.; VAN DE VOORDE, J. **Protective effect of cromokalim, diazóxide and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury.** European Journal of Pharmacology; v. 25, p. 461-470, 1999.

AKTAR, M.S.; MUNIR, M. **Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleraceae* and *Ocimum basilicum* in rats.** Journal of Ethnopharmacology; v. 27, p. 163-176, 1989.

ALARCÓN DE LA LASTRA, A.C.; MARTÍN, M.J.; MOTILVA, V.; JIMÉNEZ, M.; LA CASA, C.; LÓPEZ, A. **Gastroprotection induced by silymarin, the hepatoprotective principle of *Silybum marianum* in ischemia-reperfusion mucosal injury: role of neutrophils.** Planta Med.; v. 61, n. 2, p. 116-119, 1995.

ALENCAR, N.M.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.; NOGUEIRA, N.A.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. **Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis.** J. Pharm. Pharmacol.; v. 57, p. 919-922, 2005.

AL-HARBI, M.M.; QURESHI, S.; RAZA, M.; AHMED, M.M. AFZAL, M.; SHAH, A.H. **Gastric antiulcer and cytoprotective effect of *Commiphora molmol* in rats.** J. Ethnopharmacol.; v. 55, p. 141-50, 1997.

ALPHIN, R.S.; VOKAC, V.A.; GREGORY, R.L.; BOLTON, P.M.; TAWES, J.W. **Role of intragastric pressure, pH, and pepsin in gastric ulceration in the rat.** Gastroenterology; v. 73, p. 495-500, 1977.

AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A.; HIGINO, J.S.; SILVA, L.R.S.; ALBUQUERQUE, U.P. **Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida.** Infarma; v. 15, n. 1-3, p. 66-69, 2003.

ARRIAGA, A. M. C.; GOMES, G. A.; BRAZ-FILHO, R. **Constituents of *Bowdichia virgilioides***. *Fitoterapia*; 71: 211-212, 2000.

ARRIETA, J.; BENÍTEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. **Purification of gastroprotective triterpenóides from stem bark of *Amphipterygium adstringes*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons**. *Planta Médica*; v. 69, p. 905-909, 2003.

ASHCROFT, F.M.; GRIBBLE, F.M. **New windows on the mechanism of action of KATP channel openers**. *Trends in Pharmacological Sciences*; v. 21, n. 11, p. 439-445, 2000.

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

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

BAE, E.A.; HAN, M.J.; LEE, M.; KIM, D.H. ***In vitro* inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity**. *Biol. Pharm. Bull.*; v. 23, p. 1112-1124, 2000.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. **Drug Discovery from Medicinal Plants**. *Life Sciences*; v. 78, p. 431-441, 2005.

BATISTA, L.M.; ALMEIDA, A.B.; PIETRO, M.L.; TOMA, W.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; BRITO, B.A.R.S. **Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira**. *Biol. Pharm. Bull.*; v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.

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

BENEDEK, B.; WENIGER, B.; PAREJO, I.; BASTIDA, J.; ARANGO, G.J.; LOBSTEIN, A.; CODINA, C. **Antioxidant activity of isoflavones and biflavones isolated from *Godoya antioquiensis***. *Arzneimittelforschung*; v. 56, p. 661-644, 2006.

BERK, J.E.; HAUBRICH, W.; KALSER, M.H.; ROTH, J.L.A.; FENTON, S. **Bockus Gastroenterologia**. Livraria Ed. Santos 4ª ed.; p. 415, 1991.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**. Elsevier Editora Ltda. 5ª ed.; p. 573-600, 2004.

BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E. **Regulação e modulação da secreção gástrica**. Rev. Ciênc. Méd.; v. 11, p. 55-60, Campinas, 2002.

BLANK, M.A.; EMS, B.L.; O'BRIEN, L.M.; WEISSHAAR, P.S.; ARES, J.J.; ABEL, P.W.; MCCAFFERTY, D.M.; WALLACE, J.L. **Flavonoid-induced gastroprotection in rats: role of blood flow and leukocyte adherence**. Digestion; v. 58, n. 2, p. 147-154, 1997.

BLASER, M.J. **Helicobacter pylori and gastric diseases**. BMJ; v. 316, p. 1507-1510, 1998.

BODE, C.; BODE, J.C. **Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders**. Alcohol Health Res. World; v. 21, n. 1, p. 76-83, 1997.

BONTEMPO, M. **Medicina natural**. São Paulo: Nova Cultural, 1990.

BORGES-ARGÁES, R.; BALNBURY, L.; FLOWERS, A.; GIMENEZ-TURBA, A.; RUIZ, G.; WATERMAN, P.G.; PENA-RODRIGUES, L.M. **Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus spp.*** Phytomedicine; v. 14, n. 7-8, p. 530-533, 2007.

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

BRAZER, S.R.; TYOR, M.P.; PANCOTTO, F.S.; NICKL, N.J.; WILDERMANN, N.M.; HARRELL, F.E.; JR. et al. **Studies of gastric ulcer disease by community-based gastroenterologists**. Am. J. Gastroenterol.; v. 85, n. 7, p. 824-828, 1990.

BRINKWORTH, R.I.; STOERMER, M.J.; FAIRLIE, D.P. **Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase**. Biochem. Biophys. Res. Commun.; v. 188, p. 631-637, 1992.

BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. Academic Press, San Diego, 658p, 1994.

BROUTET, N.; GISBERT, J.P.; PAJARES, J.M. **Epidemiology**. Current opinion in Gastroenterology; v. 15, n. 1, p. 43-47, 1999.

BRZOZOWSKI, T. **Experimental production of peptic ulcer, gastric damage in cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements.** J. Physiol. Pharmacol.; v. 54, n. 3, p. 99-126, 2003.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, S.J.; ZAYACHIVSKA, O.; PAJDO, R.; KWIECIEN, S.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. **Grapefruit-seed extract attenuates ethanol-and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways.** World J. Gastroenterol.; v. 11, n. 41, p. 6450-8, 2005.

BUTTNER, A.R.; FLITNEY, F.W.; WILLIAMS, D.L.H. **NO, nitrosium íons, nitroxide íons, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective.** Trend in Pharmacological Sciences; v. 16, n. 1, p. 18-22, 1995.

CABONI, P.; SHERER, T.B.; ZHANG, N.; TAYLOR, G.; NA, H.M.; GREENAMYRE, J.T.; CASIDA, J.E. **Rotenone, dequalin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease.** Chem. Res. Toxicol.; v. 17, n. 11, p. 1540-1548, 2004.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M.L.; PIRO, O.E.; CASTELLANO, E.E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; DE CERAIN, A.L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M. **Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships.** Bioorg. Méd. Chem.; v. 15, p. 3356-3367, 2007.

CALATAYUD, S.; SANZ, M.J.; CANET, A. **Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat.** British Journal of Pharmacology; v. 127, p. 1111-1118, 1999.

CANHOTO, L. **Helicobacter pylori.** Rev-Saúde; v. 3, n. 2, p. 24-33, 1998.

CARVALHO, J.E. **Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese.** Divisão de Farmacologia e Toxicologia. CPQBA/UNICAMP, 2006.

CARVALHO, J.E. **Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento?** In: MERCADANTE, A.Z.; BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; PEREIRA, J.L.; PASTORE, G.M. ed. *Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas*, vol. II. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, p.196-202, 2001.

CASTRO, S. V. **Anatomia fundamental.** 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1985.

CHANG, L.C.; KINGHORN, A.D. **Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents.** In TRINGALI, C. (ed). *Bioactive Compounds from Natural Sources*. London; Taylor & Francis, 2001.

CHATONET, J. **As plantas medicinais: preparo e utilização.** Rio de Janeiro, Martins Fontes; 175p, 1979.

CHO, C.H.; HUA, M.F.; CHOU, C.K.; HO, L.T. **Protection of zinc sulphate against necrosis induced by ethanol in rats.** *Proc. Natl. Sci. Counc.*; v. 7, p. 261-267, 1983.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. J. **The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*; v. 10, p. 141-152, 2001.

COELHO, L.G.V. **H. pylori e doenças gastroduodenais.** In: MINCIS, M., editor. *Gastroenterologia e hepatologia*. 2ª ed. São Paulo: Lemos Editorial e Gráfica; p. 331-358, 2002.

COELHO, L.G.V. **Úlcera péptica gastroduodenal.** In: DANI, R., editor. *Gastroenterologia essencial*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.132-146, 1998.

COELHO, L.G.V. **Úlcera péptica.** In: JATENE, F.B.; CUTAIT, R.; NOBRE, M.R.C.; BERNARDO, W.M. (Org.). *Projeto Diretrizes*. São Paulo: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina; v. 3, p. 377-388, 2005.

COLTON, D.G.; DRISKILI, D.R.; PHILLIPS, E.L.; POY, P.; DAJANI, E.Z. **Effect of SC-29333, an inhibitor of gastric secretion, on canine gastric mucosal blood flow and serum gastrin levels.** *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*; v. 236, p. 86-95, 1978.

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

COOK, N.O.; SAMMAN, S. **Flavonoids — chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources — review.** *J. Nutr. Biochem.*; v. 7, p. 66-76, 1996.

CORNE, S.J.; MORRISEY, S.M.; WOODS, R.J. **A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus.** *J. Physiol. Lond.*; v. 242, p. 116-17, 1974.



COSPITE, M. **Double-blind, placebo-controlled evaluation of clinical activity and safety of Daflon 500 mg in the treatment of acute hemorrhoids.** *Angiology*; v. 45, p. 566-573, 1994.

COTTON, P.B.; SHORVON, P.J. **Analysis of endoscopy and radiography in the diagnosis, follow-up and treatment of peptic ulcer disease.** *Clin. Gastroenterol.*; v. 13, p. 383-403, 1984.

DAJANI, E.Z.; AGRAWAL, N.M. **Prevention and treatment of ulcers induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update.** *J. Physiol. Pharmacol.*; v. 46, n. 3, p. 16, 1995.

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

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

DI-CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A. **Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs.** *Life Sci.*; v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B.O. **Pathophysiology of nitric oxide and related species: free reactions and modification of biomolecules.** *Molec. Aspects Med.*; v. 19, p. 221-357, 1998.

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

EVANGELHISTA, S. **Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers.** *Curr. Pharm. Des.*; v. 12, n. 23, p. 2977-2984, 2006.

EVERS, M.; POUJADE, C.; SOLER, F.; RIBEILL, Y.; JAMES, C.; LELIEVRE, Y.; GUEGUEN, J.C.; REISDORF, D.; MORIZE, I. PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; HENIN, Y.; BOUSSEAU, A.; MAYAUX, J.F.; LE PECQ, J.B.; DEREU, N. **Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action.** *Journal of Medicinal Chemistry*; v. 39, n. 5, p. 1056-1068, 1996.

FERNANDES, A. G. **Leguminosas do município de Fortaleza sub-família Papilionoideae.** *Boletim da Sociedade Cearense de Agronomia*; v. 5, p. 45-62, 1964.

FILHO, R.B. **Identificação de princípios ativos isolados de plantas medicinais – Biopirataria, química de produtos naturais e biodiversidade fitoquímica de plantas brasileiras.** Disponível em: <[http://www.reacao.com.br/programa\\_sbpc57ra/sbpceontrol/textos/raimundobrazfilho.htm](http://www.reacao.com.br/programa_sbpc57ra/sbpceontrol/textos/raimundobrazfilho.htm)>. Acesso em: 09 de Agosto de 2007.

FLEMING, I.; BUSSE, R. **Endothelial Dysfunction: a Novel Therapeutic Target NO: the Primary EDRF.** J. Mol. Cell Cardiol.; v. 31, p. 5-14, 1999.

FORSELL, H. **Gastric mucosal defence mechanisms. A brief review.** Gastroenterology; p. 23-28, 1988.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. **Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions.** Hypertension; v. 23, p. 1121-1131, 1994.

FRANZONE, J.S.; CIRILLO, R.; CRAVANZOLA, A.C. **Cytoprotective activity of deboxamet: a possible interferente with prostaglandin and prostacyclin metabolism in rat gastric mucosa.** Int. J. Tissue React.; v. 10, n. 3, p. 149-158, 1988.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R.E.; COSENTINO, L.M.; BALLAS, L.M.; JIANG, J.B.; JANZEN, W.P.; CHEN, I.S.; LEE, K.H. **Anti-aids agents, 11. Betulinic acid and platonic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids.** Journal of Natural Products; v. 57, n. 2, p. 243-247, 1994.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L.J.D.; SINGLA, A.K. **Chemistry and Pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin.** Phytother Res.; v. 15, p. 655-669, 2001.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P.; MARYLATHA, R. **Effect of triterpene from *Crataeva nurvala* stem bark on lipid peroxidation in adjuvant induced arthritis in rats.** Pharmacological Research; v. 37, p. 191-195, 1998.

GILANI, A.H.; KHAN, A.U.; GHAYUR, M.N.; ALI, S.F.; HERZIG, J.W. **Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K<sup>+</sup>-channel activation.** Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.; v. 99, p. 365-373, 2006.

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

GLAVIN, G.B.; SZABO, S.; JOHNSON, B.R.; XING, P.L.; MORALES, R.E.; PLEBANI, M.; NAGY, L. **Isolated rat gastric mucosal cells: optimal conditions for cell harvesting, measures of viability and direct cytoprotection.** J. Pharmacol. Exp. Ther.; v. 276, p. 1174-1179, 1996.

GOMES, A.S.; LIMA, L.M.F.; SANTOS, C.L.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.L.P. **LPS from *E.coli* protects indomethacin-induced gastropathy in rats – role of ATP-sensitive K channels.** European Journal of Pharmacology; In Press, 2006.

GONZALEZ, F.G.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C.; **Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*.** Journal Ethnopharmacology; v. 77, p. 41-47, 2001.

GROSSO, G.S.; RAMÍREZ, C.; RUBIANO, L.; GONZÁLEZ, E.V.; HERNÁNDEZ, E.J.; OSORIO, M. **Origen naturaleza y características de los propóleos Comlobianos.** Disponível em: <[http://images.google.com.br/imgres?imgurl=www.beekeeping.com/articulos/salamanca/origen\\_propoleos\\_7.gif&imgrefurl=http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/origen\\_propoleos\\_1.htm&h=113&w=160&sz=2&hl=pt-BR&start=4&tbnid=oN\\_MPzyu7zq8dM:&tbnh=69&tbnw=98&prev=/images%3Fq%3Dflavonas%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dpt-BR](http://images.google.com.br/imgres?imgurl=www.beekeeping.com/articulos/salamanca/origen_propoleos_7.gif&imgrefurl=http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/origen_propoleos_1.htm&h=113&w=160&sz=2&hl=pt-BR&start=4&tbnid=oN_MPzyu7zq8dM:&tbnh=69&tbnw=98&prev=/images%3Fq%3Dflavonas%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dpt-BR)>. Acesso em: 13 de Agosto de 2007.

GUSLANDI, M. **Effect of etanol on the gastric mucosa.** Dig. Disg.; v. 5, p. 21-32, 1987.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology.** Guyton and Hall ed. 9<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1996.

HAM, A. W. **Histologia.** 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

HAMILTON, W. J. **Tratado de anatomia humana.** 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1982.

HARBORNE, J.B. **Biosynthesis and function of antinutritional factors in plants.** Aspects of Applied Biology; v. 19, p. 21-28, 1989.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry.** 3<sup>a</sup> ed. London: Academic, 1988.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. **Advances in flavonoid research since 1992.** Phytochemistry; v. 52, p. 481-504, 2000.

HARRIS, A.; MISIEWICZ, J.J. **ABC of the upper gastrointestinal tract: management of *Helicobacter pylori* infection.** BMJ; v. 323, p. 1047-1050, 2001.

HARVEY, A. **Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products.** Drug Discov. Today; v. 5, p. 294-300, 2000.

HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; RODRÍGUEZ, J.A.; HAUN, M.; NUNES, D.S.; SOUZA-BRITO, A.R.M. **Gastroprotective Effect of Essential Oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae).** Journal of Ethnopharmacology; v. 69, n. 3, p. 229-234, 2000.

HOFFMAN, J.S.; CABE, D.R. **Helicobacter Pylori-Related Diseases: Demographics, Epidemiology and Pathophysiology of Gastritis, Ulcers and Cancer.** In: FRESTON, J.W. Diseases of the Gastroesophageal Mucosa: The Acid-Related. TOTOWA, N.J. The Humana Press, p. 29-41, Inc. 2001.

HOLLANDER, D.; TARNAWSKI, A.; GERGELY, H.; ZIPSER, R.D. **Sucralfate protection of the gastric mucosa against ethanol-induced injury: A prostaglandin-mediated process?** Scand. J. of Gastroenterol.; v. 19, p. 97-102, 1984.

HOMMAM, M.; MINAMI, M.; TANIGUCHI, O.; OKA, K.; MORITAS, N.I.; TSUMA, T. **Inhibitory effects of lignans and flavonoids in saibokuto, a herbal medicine for bronchial asthma, on the release of leukotrienes from human polymorphonuclear leukocytes.** Planta Med.; v. 66, p. 88-91, 2000.

HRISTOVSKA, A.M.; RASMUSSEN, L.E.; HANSEN, P.B.L.; NIELSEN, S.S.; NUSING, R.M.; NARUMIYA, S.; VANHOUTTE, P.; SKOTT, O.; JENSEN, B.L. **Prostaglandin E2 Induces Vascular Relaxation by E-Prostanoid 4 Receptor-Mediated Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase.** Hypertension; v. 50, n. 3, p. 525-530, 2007.

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

ISHIHARA, K.; KUWARA, H.; OHARA, S.; OHKAWA, H.; OKABE, H.; HOTTA, K. **Mucus glycoprotein and mucosal protection.** Journal Clinical Gastroenterology; v. 10, p. 24-27, 1988.

ISHIHIWA, J.; SATO, T.; MINAKI, Y.; SASCHIDA, Y.; YANO, M.; ITO, A. **A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts.** J. Rheumatol.; v. 27, p. 20-25, 2000.

JAHANGIR, A.; TERZIC, A.; SHEN, W. **Potassium channel openers: therapeutic potential in cardiology and medicine.** Expert Opin. Pharmacother.; v. 2, n. 12, p. 1995-2010, 2001.

JARDIM, A.I.; RIBEIRO, J.; MORNA, H.; MARTINS, J.C.; VASCONCELOS, R.; TEIXEIRA, R. et al. **Prevalência do *Helicobacter pylori* no arquipélago da Madeira.** Gastrenterol-Cir.; v. 18, n. 98, p. 227-231, 2001.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal.** Ed. Nacional. São Paulo, 777p, 1977.

KATO, S.; AIHARA, E.; NAKAMURA, A.; XIN, H.; MATSUI, H.; KOHAMA, K.; TAKEUCHI, K. **Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection.** Biochem. Pharmacol.; v. 66, p. 1115-1121, 2003.

KAWAI, M.; HIRANO, T.; HIGA, S.; ARIMITSU, J.; MARUTA, M.; KUWAHARA, Y.; OHKAWARA, T.; HAGIHARA, K.; YAMADORI, T.; SHIMA, Y.; OGATA, A.; KAWASE, I.; TANAKA, T. **Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances.** Allergology International; v. 56, p. 113-123, 2007.

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. **Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms.** J. Pharmacol. Sci.; v. 96, p. 229-245, 2004.

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

KNIGHT, D.C.; EDEN, J.A. **Phytoestrogens – a short review.** Maturitas; v. 22, p. 167-175, 1995.

KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T.; MAJKA, J.; PYTKO-POLONCZYK, J.; STACHURA, J. **Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers.** European Journal of Pharmacology; v. 239, p. 215-217, 1993.

KONTUREK, S.J.; RADECKI, T.; BRZOZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D.; PIASTUCKI, I.; MURAMATSU, M.; TANAKA, M.; AIHARA, H. **Antiulcer and gastroprotective effects of solon, a synthetic flavonoid derivative of sophoradin. Role of endogenous prostaglandins.** Eur. J. Pharmacol.; v. 125, n. 2, p. 185-92, 1986.

KORMAN, M.G. ***Helicobacter pylori*: fact or fiction?** Gastroenterology; v. 25, n. 175, p. 159-65, 1990.

KUO, P.C.; SCHROEDER, R.A. **The emerging multifaced roles of nitric oxide.** Ann Surg.; v. 221, n. 3, p. 230-35, 1995.

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

LALE, A.; HERBERT, J.M. **Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human mono cytes.** J. Nat. Prod.; v. 59, n. 273-276, 1996.

LANDOLFI, R.; MOWER, R.L.; STEINER, M. **Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids.** Biochem. Pharmacol.; v. 33, p. 1525-1530, 1984.

LANGEBACH, R.; MORHAM, S.G.; TIANO, H.F.; LOFTIN, C.D.; GHANAYEM, B.I.; CHULADA, P.C. **Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration.** Cell; v. 83, p. 483-492, 1995.

LANGE, K.; PESKAR, B.A.; PESKAR, B.M. **Stimulation of rat mucosal leukotriene formation by ethanol.** Naunyn Schmiedebergs Archiv fur Pharmacologie; v. 27, p. 3305, 1985.

LANZA, L.L.; WALKER, A.M.; BORTNICHAK, E.A.; DREYER, N.A.; **Peptic ulcer and gastrointestinal hemorrhage associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use in patients younger than 65 years.** Arch. Intern. Med.; v. 155, p. 1371-1377, 1995.

LAVIN, M.; SCHRIRE, B. P.; LEWIS, G. P.; PENNINGTON, R. T.; DELGADO-SALINAS, A.; THULIN, M.; HUGHES, C. E.; MATOS, A. B.; WOJCIECHOWSKI, M. F. **Metacommunity process rather than continental tectonic history better explains geographically structured phylogenies in legumes.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences; v. 359, n. 1450, p. 1509-1522, 2004.

LEE, J.S.; KIM, H.S.; HAHM, K.B.; SOHN, M.W.; YOO, M.; JOHNSON, J.A.; SURH, Y.J. **Inhibitory effects of 7-carboxymethoxy-3',4',5-trimethoxyflavone (DA-6034) on *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and iNOS expression in AGS cells.** Ann. N. Y. Acad. Sci.; v. 1095, p. 527-535, 2007.

LIMA, A.F. **Estudo Fitoquímico das cascas das raízes de *Lonchocarpus araripensis*.** Fortaleza. Tese (Dissertação de Mestrado em Química Orgânica). Centro de Ciências. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade Federal do Ceará, 2007.

LU, H.W.; SUGAHARA, K.; SUGAHARA, Y.; MASHOKA, N.; ASAKA, Y.; MAUABE, M.; KODAMA H. **Effect of three flavonoids 5,7,3', 4'-tetrahydroxy-3-methoxy flavone luteolin, and quercetin on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophil.** Arch. Biochem. Biophys.; v. 393, p. 73-77, 2001.

LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; DA SILVA, C.C.; SHUQUEL, I.T.A.; BASSO, E.A.; VIDOTTI, G.J. **Triterpenic Acids from *Eugenia moraviana*.** Journal of the Brazilian Chemical Society; v. 12, p. 180-183, 2001.

MACMATH, T.L. **Alcohol and gastrointestinal bleeding.** Emerg. Md. Clin. North Am.; v. 8, n. 4, p. 859-872, 1990.

MAGALHÃES, A.F.; TOZZI, A.M.; MAGALHÃES, E.G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO MDEL, M.P.; PEREZ, M.A. **Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity.** An. Acad. Bras. Cienc.; v. 79, n. 3, p. 351-367, 2007.

MAITY, S.; VEDASIROMONI, J.R.; CHAUDHURI, L.; GANGULY, D.K. **Role of reduced glutathione and nitric oxide in the black tea extract-mediated protection against ulcerogen-induced changes in motility and gastric emptying in rats.** Jpn. J. Pharmacol.; v. 85, n. 4, p. 358-364, 2001.

MARHUENDA, E.; MARTIN, M.J.; ALARCON DE LA LASTRA, C. **Antiulcerogenic activity of aescine in different experimental models.** Phytotherapy Res.; v. 7, p. 13-16, 1993.

MARICIC, N.; EHRLICH, K.; GRETZER, B.; SCHULIGOI, R.; RESPONDEK, M.; PESKAR, B.M. **Selective cyclooxygenase-2 inhibitors aggravate ischaemia-reperfusion injury in the rat stomach.** Br. J. Pharmacol.; v. 128, p. 1659-1666, 1999.

MARLETA, M.A. **Nitric oxide synthase structure and mechanism.** Biol. Chem.; v. 268, n. 17, p. 12231-12234, 1993.

MARQUES, A.D.; RAMOS J.S.; BETTENCOURT, M.J.; OLIVEIRA, M.; SANTO, C.E.; DUPRET, D. et al. ***Helicobacter pylori* como factor de morbilidade na República de Cabo Verde e em Portugal.** Gastrenterol. Cir.; v. 13, n. 64, p. 35-40, 1996.

MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R. **Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.** Lancet; v. 1, p. 1311-1315, 1984.

MARTÍNEZ-FLORES, S.; GONZÁLEZ GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M. **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.** Nutr. Hosp.; v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MARTINS, A.P.; ASCENSÃO, P.; CEIA, C.P.; SILVA, M.L.; FERREIRA, P.; FALCÃO, I.M.; MADUREIRA, B.; CABRITA, J.; GUERREIRO, A.S. **Regimes terapêuticos para a úlcera péptica e erradicação de *Helicobacter pylori* nos utentes da Rede Médicos-Sentinelas.** Ver. Port. Clin. Geral; v. 21, p. 431-444, 2005.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** Fortaleza: IOCE, 1989.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. **Gastroprotections of escins Ia, Ib, IIa and IIb on ethanol-induced gastric mucosa lesions in rats.** European Journal of Pharmacology; v. 373, p. 63-70, 1999.

MATSUDA, H.; PONGPIRIYADACHA, Y.; MORIKAWA, T.; KISHI, A.; KATAOCA, S.; YOSHIKAWA, M. **Protective Effects os Steroid Saponins from *Paris polyphylla* var. yunnanensis on Ethanol – or Indometacin-Induced Gastric Mucosal Lesions in Rats: Structural Requirement for Activity and Mode of Action.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; v. 13, p. 1101-1106, 2003.

MCMANUS, T.J. ***Helicobacter Pylori*: An Emerging Infectious Disease.** Nurse Practitioner; v. 25, n. 8, p. 40, 43-44, 47, 50, 53-55, 2000.

MÉGRAUD, F. **Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection.** Gastroenterol. Clin. North Am.; v. 22, p. 73-88, 1993.

MELZIG, M.F.; BORMANN, H. **Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity.** Planta Médica; v. 64, n. 7, p. 655-657, 1998.

MEOTTI, F.C.; LUIZ, A.P.; PIZZOLATTI, M.G.; KASSUYA, C.A.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R. **Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways.** J. Pharmacol. Exp. Ther.; Feb; v. 316, n. 2, p. 789-796, 2003.

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.



MILES, D. H.; KOKOPOL, U. **Tumor inhibitors-2, Constituents and antitumor activity of *Serracenia flava***. Journal Pharmacol. Science; v. 65, p. 284-285, 1976.

MILLER, L.C; TAINTER, M.L. **Graphical method for determination of LD50**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; v. 54, p. 261-271, 1944.

MILLER, T.A.; LI, D.; KUO, Y.; SCHMIDT, K.L.; SHANBOUR, L.L. **Nonprotein sulphhydryl compounds in canine gastric mucosa: Effects of PGE2 and ethanol**. Am. J. Physiol.; v. 249, p. 137, 1985.

MITSCHER, L.A.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S.R.; OKUNTE, K. **A modern look at folkloric use of antiinfective agents**. J. Nat. Prod.; v. 50, p. 1025-1240, 1987.

MIZUI, T.; SATO, H.; HIROSE, F.; DOTEUCHI, M. **Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats**. Life Sci. Aug 10; v. 41, n. 6, p. 755-763, 1987.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. **Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**. Pharmacol. Research; v. 43, p. 109-142, 1991.

MOTILVA, V.; DE LA LASTRA, C.A.; MARTIN, M.J. **Ulcer-protecting effects of naringenin on gastric lesions induced by ethanol in rat: role of endogenous prostaglandins**. J. Pharm. Pharmacol.; v. 46, p. 91-94, 1994.

MOYSÉS, M. **Gastroenterologia e Hepatologia – Diagnóstico e Tratamento**. Lemos – Editorial, 2ª. Ed., 1998.

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

MUZUI, T.; DOTEUCHI, M. **Lipid peroxidation: A possible role in gastric damage induced by ethanol in rats**. Life Sciences; v. 38, p. 2163, 1986.

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.

NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B. **Flavonoids of *Derris araripensis***. Phytochemistry; v. 20, p. 147-152, 1981.

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

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

NIH CONSENSUS CONFERENCE. ***Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease**. *JAMA*; v. 272, n. 1, p. 65-69, 1994.

NOMA, A. **ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle**. *Nature*; v. 305, n. 5930, p. 147-148, 1983.

NPPN – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais. **Flavonóides**. Laboratório de Química Bio-Orgânica Teórica, UFRJ. Disponível em: <<http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://acd.ufrj.br/~tbocl/moleccertas/flavono15.GIF&imgrefurl=http://acd.ufrj.br/~tbocl/tbocl-flavoclassificacao.php&h=464&w=464&sz=15&hl=pt-BR&start=2&tbnid=KeNAXNMvD9-2TM:&tbnh=128&tbnw=128&prev=/images%3Fq%3Dflavonas%26gbv%3D2%26svnum%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dpt-BR>>. Acesso em: 13 de Agosto de 2007.

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

OLIVEIRA, F.A. **Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. E de seus principais constituintes, mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirinas em animais experimentais**. Fortaleza. Tese (Dissertação de Mestrado em Farmacologia). Centro de Ciências. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2005.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; FLORENCIO, M.G.; LIMA-JÚNIOR, 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**. *Pharmacol. Res.*; v. 49, n. 2, p. 105-111, 2004.

PANDIAN, R.S.; ANURADHA, C.V.; VISWANATHAN, P. **Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) on experimental gastric ulcer in rats**. *J. Ethnopharmacology*; v. 81, p. 393-397, 2002.

PARK, J.S.; CHOI, M.A.; KIM, B.S.; HAN, I.S. KURATA, T.; YU, R. **Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats**. *Life Science*; v. 67, n. 25, p. 3087-3093, 2000.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; **Botanical origin of Brazilian propolis and their chemical compositions.** J. Agric. Food Chem.; v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PESKAR, B.M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B.A. **Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat.** J. Pharmacol. Exp. Ther.; v. 301, p. 969-974, 2002.

PESKAR, B.M.; LANGE, K.; HOPPE, U. PESKAR, B.A. **Ethanol stimulates formation of leukotriene C4 in rat gastric mucosa.** Prostaglandins; v. 31, p. 283-293, 1986.

PETERSEN, H.; JOHANNESSEN, T.; KLEVELAND, P.M.; FJOSNE, U.; DYBDAHL, J.H.; WALDUM, H.L. **Do we need to listen to the patient? The predictive value of symptoms.** Scand. J. Gastroenterol. Suppl.; v. 155, p. 30-36, 1988.

PETROVICK, P.R. **New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil.** Journal of Ethnopharmacology; v. 66, p. 51-55, 1999.

PFEILSCHFTER, J.; EBERHARDT, W.; HUWILER, A. **Nitric oxide and mechanisms of redox signaling: matrix and matrix-metabolizing enzymes as prime nitric oxide targets.** European Journal of Pharmacology; v. 429, p. 279-286, 2001.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I.S.; CHAGGWEDERA, T.E.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; BEECHER, C.W.; FONG, H.H.; KINGHORN, A.D.; BROWN, D.M. **Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis.** Natural Medicine; v.1, n. 10, p. 1046-1051, 1995.

PONGPIRIYADACHA, Y.; MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ASAO, Y.; YOSHIKAWA, M. **Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action.** Biol. Pharm. Bull.; v. 26, n. 5, p. 651-657, 2003.

QUEIROZ, L. P. **Distribuição de espécies de Leguminosae na caatinga.** In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (eds.). Vegetação e flora da caatinga. APNE/ CNIP, Recife; p. 141-153, 2002.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas de caatinga, espécies com potencial forrageiro.** Pp 63-75 in: ARAÚJO, F.D.; PRENDERGAST, H.V.D.; MAYO, S.J.; BARBOSA, D.C.A., (eds.) Plantas do Nordeste. Anais do I Workshop Geral. Royal Botanic Gardens, Kew, 1999.

QUEIROZ, L.P. **Flowering plants of the Brazilian semi-arid.** In: QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. (eds.). Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília; p. 49-53, 2006a.

QUEIROZ, L.P. **The Brazilian caatinga: phytogeographical patterns inferred from distribution data of the Leguminosae.** In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. (eds.). Neotropical savannas and dry forests: Plant diversity, biogeography, and conservation. Taylor & Francis CRC Press, Oxford; p. 113-149, 2006b.

QUEIROZ, L. P. **Subfamília Papilionoideae.** In: QUEIROZ, L.P. (coord.). Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Leguminosae. Bol. Bot. Univ. S. Paulo, São Paulo; v. 22, n. 2, p. 242-265, 2004.

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

RAINSFORD, K.D. **An analysis of the gastro-intestinal side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs, with particular reference to comparative studies in man and laboratory species.** Rheumatology International; v. 2, p. 1-10, 1982.

RAJENDRAN, N.N.; THIRUGNANASAMBANDAM, P.; VISWANATHAN, S.; PARVATHAVARTHINI, S.; RAMASWAMY, S. **Antinociceptive pattern of flavone and its mechanism as tested by formalin assay.** Indian J. Exp. Biol.; v. 38, p. 182-185, 2000.

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

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

RAO, V.S.N.; FIGUEIREDO, E.G.; MELO, C.L.; VIANA, G.S.; MENEZES, D.B.; MATOS, M.S.; SILVEIRA, E.R. **Protective effect of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* less., in experimental liver injury.** Pharmacology. Jun; v. 48, n. 6, p. 392-397, 1994.

RAO V.S.N.; PAIVA, L.A.; SOUZA, M.F.; CAMPOS, A.R.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A.; TEIXEIRA, M.J.; SILVEIRA, E.R. **Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages.** Planta Med. Sep; v. 69, n. 9, p. 851-853, 2003.

RAO, V.S.N.; SANTOS, F.A.; SOBREIRA, T.T.; SOUZA, M.F.; MELO, C.L.; SILVEIRA, E.R. **Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa***. *Planta Medica*; v. 63, p. 146-149, 1997.

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

REED, D.J.; FARISS, M.W. **Glutathione depletion and susceptibility**. *Pharmacol. Rev.*; v. 36, p. 25, 1984.

REYES-CHILPA, R.; BAGGIO, C.H.; ALAVEZ-SOLANO, D.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; KAUFFMAN, F.C.; SANCHEZ, R.I.; MESÍA-VELA, S. **Inhibition of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants**. *J. Ethnopharmacol.*; v. 105, p. 167-172, 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia - Biotecnologia**. Ed. Premier, 1997.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.; LANCSATER, C.; HANCHAR, 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.

ROSSAT, J.; MAILLARD, M. NUSSBERGER, J.; BRUNNER, H.R.; BURNIER, M. **Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects**. *Clin. Pharmacol. Ther.*; v. 66, p. 76-84, 1999.

ROWN, J.F.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J.R. **Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach**. *European Journal of Pharmacology*, v. 223, p. 103-104, 1992.

RUSSO, R.O.; SANCHEZ, M.S. **Los flavonoides em la terapia cardiovascular**. *Rev. costarric. Cardiol.*; v.8, n. 1, San José, ene., 2006.

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

SAKAI, H.; KUMANO, E.; IKARI, A.; TAKEGUCHI, N. **A gastric housekeeping Cl channel activated via prostaglandin EP3 receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> nitric oxide/ cGMP pathway**. *J. Biol. Chem.*; v. 270, p. 18781-18785, 1995.

SALEEM, M.; ALAM, A.; ARIFIN, 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, n. 2, p. 128-133, 2001.

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

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. **1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats.** Digestive Diseases and Sciences; v. 46, p. 331-337, 2001.

SCMASSANN, A.; PESKAR, B.M.; STETTLER, C.; NETZER, P.; STROFF, T.; FLOGERZI, B. **Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastrointestinal ulcer models in rats.** Br. J. Pharmacol.; v. 123, p. 795-804, 1998.

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.

SHIRIN, H.; PINTO, J. T.; LIU, L. U.; MERZIANU, M.; SORDILLO, E. M.; MOSS, S. F. ***Helicobacter pylori* decreases gastric mucosal glutathione.** Cancer Letters; v. 164, p. 127-133, 2001.

SIANI, A.C.; PIZARRO, A.P.B.; BITTENCOURT, F.S.N.; RIBEIRO, I.Q.C.; CASARA, J.; GUILHERMINO, J.F.; CALIXTO, J.B.; AUCELIO, J.G.; SILVA, M.S.; ANTONIOLLI, A.R.; BATISTA, J.S.; MOTA, C.N. **Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrintestinal no povoado de Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil.** Acta bot. bras.; v. 20, n. 4, p. 815-829. 2006.

SILVA, R.; MOTA, R.; COSTA, A.M.; CUNHA, S.; FREITAS, S.; GONÇALVES, S. et al. **Prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças.** Rev. Epidemiol.; v. 3, n. 1-2, p. 27-30, 1998.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed., 1102p, 2003.

SMEDIFORS, B.; JOHASEN, C. **Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by misoprostol.** Dig. Dis. Sci.; v. 31, p. 969-1005, 1986.

SOARES J.; CARNEIRO, F.; COLTER, J.; PEREIRA, F.; FONSECA, E.; PINHO, C. **Prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori* e características da mucosa gástrica em doentes sujeitos a endoscopia no Norte de Portugal.** Rev-Gastrenterol.; v. 10, n. 48, p. 119-131, 1993.

SOUZA, M.F.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. **Anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less.** Braz. J. Med. Biol. Res.; v. 25, n. 10, p. 1029-1032, 1992.

SOUZA, M.F.; TOME, A.R.; RAO, V.S.N. **Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver.** J. Pharm. Pharmacol. Feb; v. 51, n. 2, p. 125-129, 1999.

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

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

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.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. ***Helicobacter pylori* Infection.** N. Eng. J. Méd.; v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002.

SZABO, S.; SZELENYI, I. **'Cytoprotection' in gastrointestinal pharmacology.** TIPS; v. 8, p. 149-154, 1987.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J. **Early vascular injury and increase vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in rat.** Gastroenterology; v. 88, p. 228, 1985.

SZOLCSANYI, J.; BARTHO, L. **Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update.** J. Physiol.; v. 95, n. 1-6, p. 181-188, 2001.

TAHA, A.S.; DAHILL, S. NAKASHABENDI, I.; LEE, F.D.; STURROCK, R.D.; RUSSEL, R.I. **Duodenal histology, ulceration, and *Helicobacter pylori* in the presence or absence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** Gut.; v. 34, p. 1162-1166, 1995.

TAKAGI, K.; KASUYA, Y.; WATANABE, K. **Studies on the drugs for peptic ulcer. A reliable method for producing stress ulcer in rats.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin; v. 12, p. 465-472, 1964.

TAKAGI, K.; OKABE, S. **The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer.** Japanese Journal of Pharmacology, v. 18, p. 9-18, 1968.

TAKASE, H.; YAMAMOTO, K.; HIRANO, H.; SAITO, Y.; YAMASHITA, A. **Pharmacological profile of gastric mucosal protection by marmin and nobiletin from a traditional herbal medicine, *Aurantii fructus immaturus*.** Jpn. J. Pharmacol.; v. 66, p. 139-147, 1994.

TAKEUCHI, K.; TANAKA, A.; HAYASHI, Y.; KUBO, Y. **Functional mechanism underlying COX-2 expression following administration of indomethacin in rat stomachs: importance of gastric hypermotility.** Dig. Dis. Sci.; v. 49, n. 2, p. 180-187, 2004.

TAN, P.V.; NYASSE, B.; DIMO, T.; MEZUI, C. **Gastric cytoprotective anti-ulcer effects of the leaf methanol extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae) in rats.** J. Ethnopharmacol.; v. 82, p. 69-74, 2002.

TARNAWSKI, A.; STACHURA, J.; HOLLANDER, D.; SARFEH, I.J.; BOGDAL, J. **Cellular aspects of alcohol-induced injury and prostaglandins protection of the human gastric mucosa. Focus on the mucosal microvessels.** J. Clin. Gastroenterol.; v. 10, p. 35-45, 1988.

TEGEDER, I.; NEUPERT, W.; GUHRING, H.; GEISLINGER, G. **Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs.** J. Pharmacol. Exp. Ther.; v. 292, p. 1161-1168, 2000.

TEORELL, T. **On the permeability of the stomach mucosa for acids and some other substances.** J. Gen. Physiol.; v. 23, p. 263-274, 1939.

THOMOPOULOS, K.C.; VAGENAS, K.A.; VAGIANOS, C.E.; MARGARITIS, V.G.; BLIKAS, A.P.; KATSAKOULIS, E.C.; NIKOLOPOULOU, V.N. **Changes in aetiology and clinical outcome of acute upper gastrointestinal bleeding during the last 15 years.** Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.; v. 16, n. 2, p. 177-182, 2004.

TOMA, W.; GRACIOSO, J.S.; ANDRADE, F.D.P.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. **Antiulcerogenic activity of four extracts from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae).** Biol. Pharm. Bull.; v. 25, n. 9, p. 1151-1155, 2002.



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

VANE, J.R.; BOTTING, R.M.; **Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs**. Am. J. Med.; v. 104, n. 3<sup>a</sup>, p. 2S-8S, 1998.

VERAS, V. **Úlcera Péptica**. Universidade de Cuiabá (UNIC). Faculdade de Medicina. Clínica Médica. Disponível em: <[http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo\\_medstudents\\_20050922\\_05.doc](http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo_medstudents_20050922_05.doc)>. Acesso em: 08 de Agosto de 2007.

VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A.; BANDEIRA, M. A. M.; RAO, V. S. N. **Aroeira do Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). Estudo Botânico-Farmacognóstico-Químico-Farmacológico**. 2. ed. Fortaleza: UFC, v. 1, 160p, 1995.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary Plant Metabolism**. The Macmillan Press Ltd., Hong Kong. 1981.

VIDYA, L.; VARALAKSHMI, P. **Control of urinary risk factors of stones by betulin and lupeol in experimental hyperoxaluria**. Fitoterapia; v. 71, p. 535-543, 2000.

VIEIRA, M.M.; MACEDO, F.Y.; FILHO, J.N.; COSTA, A.C.; CUNHA, A.N.; SILVEIRA, E.R.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. **Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats**. Phytother Res. Feb.; v. 18, n. 2, p. 135-141, 2004.

WAGNER, K.A.; NANDI, J.; KING, R.L.; LEVINE, R.A. **The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on ulcerogenesis and gastric secretion in pylorus-ligated rat**. Dig. Dis. Sci.; v. 40, p. 134-140, 1995.

WALLACE, J. L. **Cooperative modulation of gastrointestinal mucosal defence by prostaglandins and nitric oxide**. Clin. Invest. Med.; v. 19, p. 346-351, 1996.

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

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

WHITTLE, B.J.; OREN-WOLMAN, N.; GUTH, P.H. **Gastric vasoconstrictor actions of leukotriene C4, PGF2 alpha, and thromboxane mimetic U-46619 on rat submucosal microcirculation in vivo** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.; v. 248, p. G580-G586, 1985.

WILSON, D.E.; QUADROS, E.; RAJAPAKSA, T.; ADAMS, A.; NOAR, M. **Effects of misoprostol on gastric acid and muçus secretion in man.** Dig. Dis. Sci.; v.31, p. 1265-1295, 1986.

WINK, M. **Physiology of secondary product formation in plants.** In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (ed). Secondary products from plant tissue culture, Oxford: Clarendon, 1990.

YANO, S.; UMEDA, D.; YAMASHITA, T.; NINOMIYA, Y.; SUMIDA, M.; FUJIMURA, Y.; YAMADA, K.; TACHIBANA, H. **Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVAimmunized BALB/c mice.** Eur. J. Nutr.; [In Press], 2007.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Quim. Nova; v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAYACHKIVSKA, O.S.; KONTUREK, S.J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M.R. **Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts.** J. Physiol. Pharmacol.; v. 56, n. 1, p. 219-231, 2005.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. **Flavonóides.** In: SIMÕES, C.M.O. (Org.) et al. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5ª ed. ver. ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, cap. 23, p. 577-614, 2003.

## **ANEXOS**

**Anexo 1. Documento de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA).**

**Anexo 2. Artigo publicado referente à Dissertação de Mestrado.**



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n<sup>o</sup> 101/07, sobre o projeto intitulado: **“ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *LONCHOCARPUS ARARIPENSIS BENTHAM EM CAMUNDONGOS*”** de responsabilidade de Deive de Andrade Campos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 19 de setembro de 2007.

Fortaleza, 26 de setembro 2007.

  
Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

JPP 2008, 60: 391–397  
© 2008 The Authors  
Received June 26, 2007  
Accepted November 26, 2007  
DOI 10.1211/jpp.60.3.0016  
ISSN 0022-3573

## Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism

Deive A. Campos, Almi F. de Lima, Saulo Rodrigo L. Ribeiro,  
Edilberto R. Silveira, Otilia Deusdênia L. Pessoa, Vietla S. Rao  
and Flávia A. Santos

### Abstract

The gastroprotective effect of DDF (3,6-dimethoxy-6'',6''-dimethyl-[2'',3'' : 7,8]-chromenflavone) from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) on gastric damage induced by absolute ethanol (96%, 0.2 mL/mouse) and indometacin (30 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) in mice was investigated. Intraperitoneally administered DDF at dose levels of 50, 100 and 200 mg kg<sup>-1</sup> markedly reduced the gastric lesions in the ethanol model by 62, 72 and 96%, and in the indometacin model by 34, 70 and 75%, respectively, as compared with misoprostol (50 µg kg<sup>-1</sup>, p.o.), the reference compound that caused lesion suppression by 67% in ethanol model and by 72% against indometacin-induced ulceration. The ED50 of DDF in reducing gastric lesions induced by ethanol and indometacin (dose of the DDF that reduced the gastric lesion area by 50% in relation to the control value) was 50.87 and 61.56 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. Mechanistic studies were carried out at 100 mg kg<sup>-1</sup> DDF using the ethanol model. Compared with *N*-acetylcysteine (750 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.), a donor of sulfhydryls, DDF only partially replenished the ethanol-induced depletion of gastric mucosal NP-SH. Pretreatment with TRPV1 antagonist capsazepine (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) or the non-selective cyclooxygenase inhibitor indometacin (10 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) effectively blocked the gastroprotective effect of DDF (100 mg kg<sup>-1</sup>) against ethanol damage. Furthermore, the effect of DDF was significantly reduced in mice pretreated with L-NAME, or glibenclamide, the respective inhibitors of nitric oxide synthase and K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channel activation. These data provide evidence to show that DDF affords gastroprotection against gastric damage induced by ethanol and indometacin by different and complementary mechanisms, which include involvement of endogenous prostaglandins, nitric oxide release, the activation of TRPV1 receptor or K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels, besides a sparing effect on NP-SH reserve.

Departamento de Fisiologia e  
Farmacologia, Faculdade de  
Medicina, Universidade Federal  
do Ceará, Caixa Postal 3157,  
60430-270, Fortaleza, Ceará,  
Brasil

Deive A. Campos,  
Saulo R. L. Ribeiro, Vietla S. Rao,  
Flávia A. Santos

Departamento de Química  
Orgânica e Inorgânica,  
Universidade Federal do Ceará,  
Caixa Postal 12200, 60451-970,  
Fortaleza, Ceará, Brasil

Almi F. de Lima,  
Edilberto R. Silveira, Otilia  
Deusdênia L. Pessoa

**Correspondence:** F. A. Santos,  
Departamento de Fisiologia e  
Farmacologia, Faculdade de  
Medicina, Universidade Federal  
do Ceará, Rua Cel Nunes de  
Melo, 1127, Campus do  
Porangabussu, Caixa Postal 3157,  
60430-270, Fortaleza, Ceará,  
Brasil. E-mail: flavia@ufc.br

**Acknowledgements and  
funding:** This study was  
supported by grants from CNPq  
and CAPES, Brazil. The technical  
assistance of Antônia Dannyella  
Marques Ferreira is gratefully  
acknowledged.

### Introduction

*Lonchocarpus araripensis* Benth. (syn. *Derris araripensis*) (Leguminosae), popularly known as angelim or sucupira branca, is a tree that largely grows in the North East of Brazil. Although *L. araripensis* has no folk medicinal usage, there are reports showing the anti-inflammatory activity (Alencar et al 2005; Napimoga et al 2007) and the inhibitory effect on gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Reyes-Chilpa et al 2006) of a few *Lonchocarpus*-related species. Chemical studies carried out on *L. araripensis* demonstrated the presence of flavonoids (Nascimento & Mors 1981), including 3,6-dimethoxy-6'',6''-dimethyl-[2'',3'' : 7,8]-chromenflavone (DDF). Some flavones have been reported to possess clinically relevant properties, such as anti-allergic (Yano et al 2007), anti-inflammatory (Kim et al 2004; Lee et al 2007), antinociceptive (Rajendran et al 2000), antioxidant (Benedek et al 2006), anti-ulcerogenic (Takase et al 1994; La Casa et al 2000), antispasmodic (Gilani et al 2006), antiviral (Brinkworth et al 1992) and anti-tumoral (Cabrera et al 2007) actions.

However, to date no pharmacological study has been carried out on this flavone, DDF. Since flavonoid substances of plant origin in general are considered highly gastroprotective

against damage caused by necrotizants or NSAIDs, probably due to an improvement of gastric microcirculation (Zayachkivska et al 2005), this study examined whether DDF affords protection against gastric damage induced by ethanol and indometacin in mice, and further attempted to establish the possible mechanism.

## Materials and Methods

### Drugs

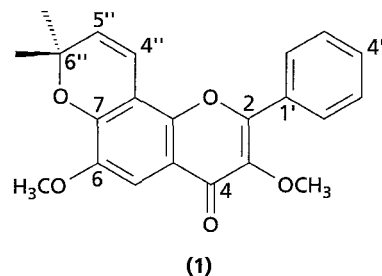
Capsaicin, indometacin, glibenclamide, diazoxide, L-arginine and *N*<sup>w</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Tween 80 was from Merck AG (Darmstadt, Germany). Absolute ethanol was obtained from Synth (Brazil) and prostaglandin analogue 16,16-dimethyl PGE2 (misoprostol) was from Continental Pharma (Cytotec, Italy). All solvents used were of analytical grade. The 3,6-dimethoxy-6'', 6''-dimethyl-[2'', 3'':7, 8]-chromene flavone (DDF) from *L. araripenses* was dissolved in 2% Tween 80 and diluted just before use in 0.9% saline.

### Plant material

*Lonchocarpus araripensis* Benth. (syn. *Derris araripensis*) was collected from the plantation in Acarape County (Ceará State, Brazil), during February 2005 after its authentication by Prof. Edson P. Nunes. A voucher specimen (No. 11074) was deposited at the Herbário Prisco Bezerra (EAC) of the Department of Biology, Universidade Federal do Ceará.

### Extraction and isolation

The air-dried and ground root bark material of *L. araripensis* (1.9 kg) was extracted three times with hexane (9 L each) followed by ethanol (9 L each) at room temperature. The solvents were evaporated under reduced pressure to give 51.9 and 78.3 g of the crude hexanic and ethanolic extracts, respectively. The hexane extract was coarsely fractioned on silica gel by elution with *n*-hexane, *n*-hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and EtOH to obtain the respective fractions. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (3.6 g), a crystalline material, was subjected to recrystallization using *n*-hexane-EtOAc 9:1 to yield the pure compound **1** (1.02 g). The structure of **1**, which was established as 3,6-dimethoxy-6'', 6''-dimethyl-[2'', 3'':7, 8]-chromene flavone (Figure 1), was determined by spectroscopic methods, including IV, EM and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and comparison with published data (Nascimento & Mors 1981; Arriaga et al 2000). The spectral details are as follows: 3,6-dimethoxy-6'', 6''-dimethyl-[2'', 3'':7, 8]-chromene flavone (**1**): white crystals; mp 202–204°C; IR ν<sub>max</sub> 3012, 1663, 1500, 1483, 1130, 1069; EIMS *m/z* 364 [M]<sup>+</sup> (80), 349 (100), 331 (10), 217 (30), 105 (25), 77 (28); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 8.07 (dd, *J* = 8.4 and 1.8 Hz, H-2'/H-8'), 7.50 (m, H-5, H-3', H-4', H-5'), 6.88 (d, *J* = 10 Hz, H-4''), 5.74 (d, *J* = 10 Hz, H-5''), 3.96 (s, MeO-3), 3.88 (s, MeO-6), 1.55 (s, CH<sub>3</sub>-6'''/CH<sub>3</sub>-6'''); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 174.4 (C-4), 154.6 (C-2), 147.5 (C-9), 147.2 (C-6), 146.6 (C-7), 141.2 (C-3), 131.6 (C-5''), 131.5 (C-1'), 130.5 (C-4'),



**Figure 1** Chemical structure of 3,6-dimethoxy-6'', 6''-dimethyl-[2'', 3'':7, 8]-chromene flavone (**1**).

128.7 (C-5'/C-3'), 128.4 (C-6'/C-2'), 117.5 (C-10), 115.5 (C-4''), 104.6 (C-5), 78.4 (C-6''), 60.3 (MeO-3), 56.5 (MeO-6), 28.1 (C-6'''/C-6''').

### Animals

Male Swiss mice, 20–25 g obtained from the Central Animal House of this University were used. Experimental groups consisted of 8 mice per group. They were housed at 24 ± 2°C under a 12-h light–dark cycle and had free access to standard pellet diet (Purina chow) and tap water. The mice were deprived of food for 15 h before experimentation, but had free access to drinking water. The institutional Ethics Committee on the Care and Use of Animals for experimentation approved the experimental protocols, and all experiments were performed in accordance with the guidelines of the National Institutes of Health, Bethesda, USA.

### Gastric damage induced by ethanol

Groups of mice (*n* = 8) were treated with 3,6-dimethoxy-6'', 6''-dimethyl-[2'', 3'':7, 8]-chromene flavone (DDF) (25, 50, 100 and 200 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), misoprostol (50 μg kg<sup>-1</sup>, p.o.), or vehicle (2% Tween 80 in saline in a volume of 10 mL kg<sup>-1</sup>). Forty-five minutes after treatment, each mouse was given orally 0.2 mL of ethanol (96%) and they were sacrificed 30 min later (Robert 1979). The stomachs were excised, opened along the greater curvature, rinsed with saline (0.9%) and the mucosal lesion area (mm<sup>2</sup>) was measured by planimetry using a transparent grid (area: 1 mm<sup>2</sup>) placed on the glandular mucosal surface and expressed in percentage (%) in relation to total area of corpus.

### Gastric damage induced by indometacin

Mice in groups (*n* = 8) were treated with DDF (25, 50, 100 and 200 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), misoprostol (50 μg kg<sup>-1</sup>, p.o.) or vehicle. Forty-five minutes after treatment, each mouse received an oral dose of 30 mg kg<sup>-1</sup> indometacin and they were sacrificed 6 h later (Rainsford 1982). The stomachs were removed, immersed in 5% formalin for 30 min, and then opened along the greater curvature to register the incidence and extent of ulceration according to the following scale: 0 = no petichial haemorrhage or erosion; 1 = up to 5 petichial; 2 = up to 5 petichial with erosions of depth 1 mm; 3 = up to 10

petichial; 4 = up to 10 petichial with erosions of depth above 1 mm. The mean ulcer score for each mouse was calculated and compared between groups.

### Effect of DDF on ethanol-induced depletion of non-protein sulfhydryls

To study the role of gastric mucosal non-protein sulfhydryls (NP-SH) in the gastroprotective effect of DDF, groups of mice ( $n = 8$ ) were pretreated with vehicle, DDF ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC;  $750 \text{ mg kg}^{-1}$ , p.o.) alone, or in their combinations before the oral administration of 0.2 mL of ethanol (96%). DDF and NAC were administered 45 min and 60 min before ethanol, respectively. Thirty minutes after ethanol, the mice were sacrificed, stomachs excised and the glandular part of the stomach was homogenized in 5 mL ice-cold ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 0.02 M; pH 8.9). Gastric mucosal NP-SH were measured according to a previously described method (Sedlak & Lindsay 1968). Volumes of 4 mL of the homogenates were mixed in 15 mL test tubes with 3.2 mL of distilled water and 0.8 mL of 50% trichloroacetic acid (TCA). The tubes were shaken intermittently for 10 min and centrifuged at  $3000 \text{ rev min}^{-1}$  for 15 min. Two millilitres of supernatant was mixed with 4 mL of 0.4 M Tris buffer at pH 8.9, 0.1 mL of 5, 5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0.01 M) was added and the sample was shaken. The absorbance was measured within 5 min after addition of DTNB at 412 nm against a reagent blank with no homogenate. The absorbance values were extrapolated from a glutathione standard curve and expressed as  $\mu\text{g per g}$  of stomach tissue ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

### Effects of capsazepine and indometacin pretreatments on DDF gastroprotection

Groups of mice ( $n = 8$ ) were pretreated with vehicle, DDF ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.), capsaicin ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ , p.o.) and misoprostol ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , p.o.), alone or in their combinations with capsazepine ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) or indometacin ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , p.o.) before the oral administration of 0.2 mL of ethanol (96%). When given alone, DDF, capsaicin and misoprostol were administered 1 h before ethanol. Indometacin and capsazepine were administered 2 h and 30 min, respectively, before ethanol.

### Role of nitric oxide (NO) on the gastroprotective effect of DDF

To investigate the influence of endogenous NO in the gastroprotective effect (Arrieta et al 2003), mice ( $n = 8$  per group) were pretreated with vehicle, DDF ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) or L-arginine ( $600 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) alone or in their combinations with L-NAME ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) before induction of gastric damage with ethanol (0.2 mL of ethanol, 96%); DDF was administered 45 min before and L-NAME and L-arginine were given 30 min before ethanol.

### Role of $K_{\text{ATP}}$ channels on the gastroprotective effect of DDF

To verify a likely activation of ATP-sensitive potassium channels in the gastroprotective effect (Peskar et al 2002), groups of mice ( $n = 8$ ) were pretreated with vehicle, DDF ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) or diazoxide ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) alone or in their combinations with glibenclamide ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) before the oral administration of 0.2 mL of ethanol (96%). DDF was given 45 min before, whereas diazoxide was administered 30 min before ethanol or glibenclamide. Glibenclamide was administered 30 min before DDF.

### Statistical analysis

The results are presented as the mean  $\pm$  s.e.m. of 8 mice per group. Statistical analysis was carried out using one-way analysis of variance followed by Tukey's test for parametric data and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for nonparametric data. The ED50 (dose of the DDF that reduces the gastric lesion area by 50% in relation to the control value) was calculated by sigmoidal curve-fitting analysis by using GraphPAD software and expressed along with its 95% confidence limits.  $P < 0.05$  was considered as indicative of statistical significance.

## Results

DDF at the tested doses of 50, 100 and  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  exhibited a dose-related protective effect against ethanol-induced gastric lesions (Table 1) and when compared to vehicle group, the extent of inhibition for the respective doses employed were 62, 72 and 96%. Against indometacin ulceration, the protection was significant only at higher doses (100 and  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of DDF, with 70 and 75% decrease of gastric lesion scores, respectively. The respective ED50 values and the confidence limits (CL) for DDF gastroprotection against gastric damage induced by ethanol and indometacin were in the order of 50.87 (38.36–67.46) and  $61.56 \text{ mg kg}^{-1}$  (42.29–89.60). Misoprostol, the positive control included for the study, also offered significant protection of a similar magnitude (Table 1), against both ethanol (67% inhibition)- and indometacin (72% inhibition)-induced gastric lesions.

The level of NP-SH in the gastric mucosa of normal control rats ( $393.8 \pm 26.7 \mu\text{g g}^{-1}$ ) significantly decreased to  $189.8 \pm 14.1 \mu\text{g g}^{-1}$  following the administration of ethanol (Table 2). While pretreatment with NAC ( $750 \text{ mg kg}^{-1}$ ) almost completely replenished the ethanol-induced depletion of NP-SH ( $318.1 \pm 18.9 \mu\text{g g}^{-1}$ ), DDF caused only a weak replenishment of NP-SH ( $273.9 \pm 10.6 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

In mice pretreated with the vanilloid antagonist capsazepine, the gastroprotective effect of DDF ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) on ethanol damage was only weakly blocked, unlike that of capsaicin ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ , p.o.), which was completely prevented (Figure 2A). Indometacin ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , p.o.) pretreatment completely abolished the protective effect of DDF as well as that of  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  misoprostol (Figure 2B). These data indicate that the gastroprotective effect of DDF is possibly mediated by activation of capsaicin-sensitive

**Table 1** Inhibition by 3,6-dimethoxy-6'',6''-dimethyl-[2'',3'' : 7,8]-chromeneflavone (DDF) from *L. araripensis* on gastric damage induced by absolute ethanol and indometacin in mice

Treatment	Dose and route	Ethanol	Indometacin
		Lesion area (mm <sup>2</sup> )	Lesion score
Control (vehicle)	—	21.42 ± 2.22	31.56 ± 3.45
DDF	25 mg kg <sup>-1</sup> , i.p.	21.20 ± 3.70	25.17 ± 1.78
	50 mg kg <sup>-1</sup> , i.p.	8.21 ± 2.19***	20.67 ± 2.15
	100 mg kg <sup>-1</sup> , i.p.	5.88 ± 1.06***	9.43 ± 2.19**
	200 mg kg <sup>-1</sup> , i.p.	0.83 ± 0.54***	7.80 ± 3.90**
Misoprostol	50 µg kg <sup>-1</sup> , p.o.	7.02 ± 2.61***	8.69 ± 0.84**

Data represent means ± s.e.m., n = 8. Mice were treated with DDF or misoprostol, 45 min and 60 min, respectively, before ethanol or indometacin administration. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 compared with control group (analysis of variance followed by Tukey test (ethanol model) or Kruskal–Wallis test followed by Dunn test (indometacin model))

**Table 2** Effect of 3,6-dimethoxy-6'',6''-dimethyl-[2'',3'' : 7,8]-chromeneflavone (DDF) from *L. araripensis* on the levels of non-protein sulfhydryls (NP-SH) in glandular stomach of mice treated with 96% ethanol

Treatment	Dose and route	NP-SH (µg g <sup>-1</sup> )
Control (vehicle)	—	393.8 ± 26.7
Control (ethanol)	—	189.8 ± 14.1*
DDF	100 mg kg <sup>-1</sup> , i.p.	273.9 ± 10.6*†
NAC	750 mg kg <sup>-1</sup> , p.o.	318.1 ± 18.9*†

Data represent means ± s.e.m., n = 8. Mice were treated with DDF or *N*-acetylcysteine (NAC), 45 min and 60 min, respectively, before ethanol. \**P* < 0.05 compared with control vehicle; †*P* < 0.01 compared with control ethanol (analysis of variance followed by Tukey test).

primary afferents and endogenous prostaglandins. L-NAME (20 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) significantly blocked the gastroprotection produced by DDF and L-arginine (600 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), suggesting the likely participation of NO (Figure 3A). The K<sub>ATP</sub><sup>+</sup> channel blocker glibenclamide (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) was more efficient in abrogating the gastroprotective effect of DDF and also of diazoxide (3 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), indicating a potential role for K<sub>ATP</sub><sup>+</sup> channels in the gastroprotection (Figure 3B).

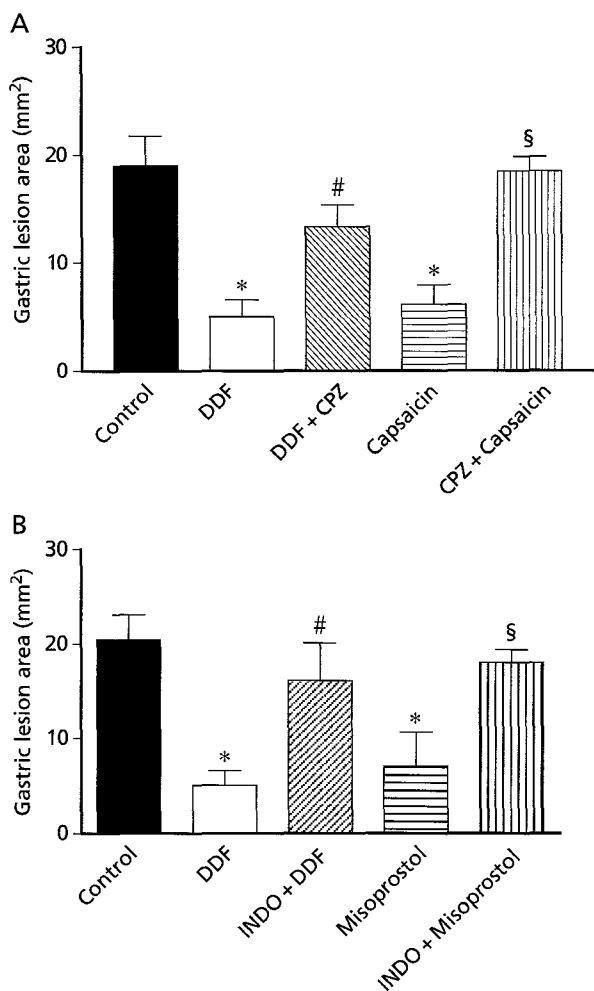
## Discussion

This study for the first time demonstrated the gastroprotective property of 3,6-dimethoxy-6'',6''-dimethyl-[2'',3'' : 7,8]-chromeneflavone (DDF), a novel flavone isolated from *Lonchocarpus araripensis*. DDF pretreatment at doses of 50, 100 and 200 mg kg<sup>-1</sup> markedly reduced the gastric damage induced in mice by both ethanol and indometacin in a dose-related manner and the ED50 values obtained

indicate a slightly higher potency of DDF against ethanol damage (50.87 mg kg<sup>-1</sup>) than against indometacin damage (61.56 mg kg<sup>-1</sup>). This finding is consistent with earlier reports on other flavones and flavonoids in general that show gastroprotective activity at doses in the range 5–500 mg orally or 3–100 mg kg<sup>-1</sup> intraperitoneally (Goel et al 1988; Rao et al 1997; La Casa et al 2000; Zayachkivska et al 2005; Olaley & Farombi 2006). Flavonoids in general possess a cytoprotective property (Robert 1979) and DDF simulated it. Cytoprotection in the stomach, consisting of mucus secretion, mucus circulation intensification and bicarbonate secretion to the gastric lumen, is highly dependent on the products of the arachidonic acid pathway and peroxidative–antioxidative balance. It has been firmly established that oxidative stress and impaired prostaglandin synthesis contribute to gastric mucosal damage in experimental models of gastric lesions induced by both ethanol and indometacin (Kwiecien et al 2002; Chattopadhyay et al 2006; Robertson et al 2007). However, antioxidants and prostaglandin analogues could attenuate gastric mucosal lesions in either of these models (Brzozowski et al 2005; Valcheva-Kuzmanova et al 2007). Accordingly, we tested the gastroprotective efficacy of DDF in comparison with misoprostol in both models of gastric injury. The results obtained clearly show that the natural flavone DDF and prostaglandin analogue misoprostol are equally effective in affording gastroprotection, possibly implicating a common cytoprotective mechanism.

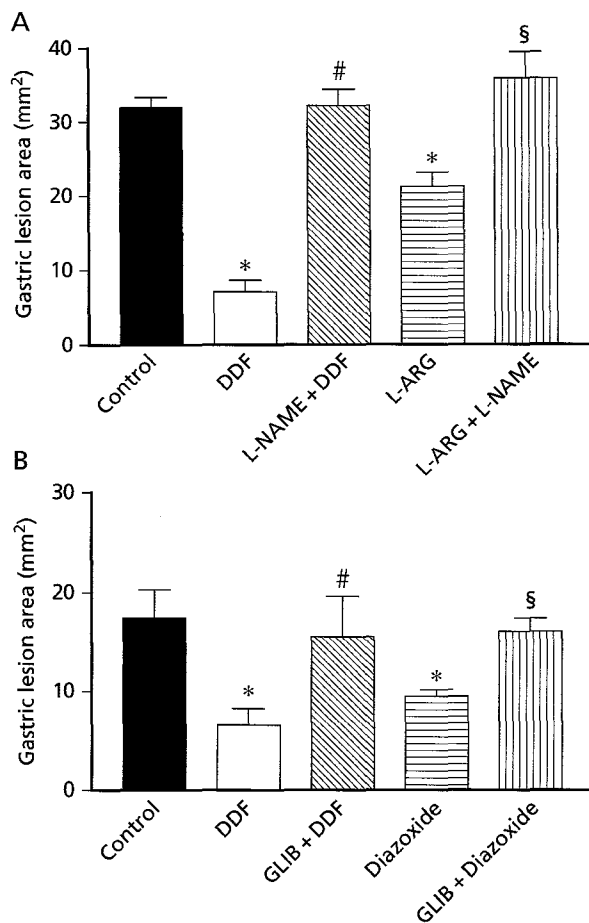
Flavonoids may have powerful antioxidant effects when tested in-vitro but their poor oral bioavailability is a major limitation. However, they may be able to help protect the gastrointestinal tract against reactive species present in foods or generated within the stomach and intestines (Halliwell 2007). In this study, intraperitoneally administered DDF showed a significant effect, but it was much less sparing than that of *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), a replenisher of sulfhydryls on gastric NP-SH content depleted by ethanol, suggesting that it has only a weak antioxidant action and possibly other mechanisms also participate in its gastroprotection.





**Figure 2** Role of capsaicin-sensitive sensory afferents (A) and prostaglandins (B) in the gastroprotective effect of DDF against ethanol-induced gastric damage in mice. A. Mice were pretreated with vehicle (control), DDF alone (100 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.), capsazepine (CPZ, 3 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) + DDF, capsaicin alone (0.3 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) or capsazepine + capsaicin. B. Mice were pretreated with vehicle (control), DDF alone (100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), indometacin (INDO, 10 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) + DDF, misoprostol alone (50 µg kg<sup>-1</sup>, p.o.) or indometacin (INDO) + misoprostol. Data are presented as mean ± s.e.m. from 8 mice. \**P* < 0.05 compared with vehicle (control) group; #*P* < 0.05 compared with DDF group; §*P* < 0.05 compared with corresponding control (analysis of variance followed by Tukey test).

Some plant-derived substances have been shown to attenuate ethanol- and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, NO and sensory nerve pathways and thus improve the microcirculation (Zayachkivska et al 2004; Brzozowski et al 2005). In the experiments aimed to establish the possible mechanism of DDF gastroprotection, various agonists and antagonists were examined on an ethanol model of gastric damage. These agonists (capsaicin, misoprostol, L-arginine and diazoxide) and antagonists (capsazepine, indometacin, L-NAME and glibenclamide), employed in this study when tested alone may manifest some per-se reductions or enhancements on ethanol-induced gastric injury. We



**Figure 3** Role of nitric oxide (A) and K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels (B) in the gastroprotective effect of DDF against ethanol-induced gastric damage in mice. A. Mice were pretreated with vehicle (control), DDF alone (100 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.), L-NAME (20 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) + DDF, L-arginine alone (L-ARG, 600 mg kg<sup>-1</sup>) or L-arginine + L-NAME. B. Mice were pretreated with vehicle (control), DDF alone (100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), glibenclamide (GLIB, 5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) + DDF, diazoxide alone (3 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) or diazoxide + glibenclamide. Data are presented as mean ± s.e.m. from 8 mice. \**P* < 0.05 compared with vehicle (control) group; #*P* < 0.05 compared with DDF group; §*P* < 0.05 compared with corresponding control (analysis of variance followed by Tukey test).

have chosen the smallest doses possible to minimize these per-se effects and at the same time not losing their agonistic or blocking effects. To verify the role of prostaglandins and TRPV1 in the gastroprotection afforded by DDF, mice were pretreated with indometacin, a non-selective cyclooxygenase inhibitor, and capsazepine, an antagonist of TRPV1. The results reveal that the gastroprotection by DDF against ethanol-induced mucosal injury was more vulnerable to indometacin than to capsazepine, suggesting a limited role for the capsaicin-sensitive afferents rather than endogenous prostaglandins in its gastroprotection. NO also appears to be a key mediator of gastrointestinal mucosal defence. 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). NO-releasing drugs protect against ethanol-induced gastric lesions and, conversely, inhibition of NO synthesis increases the susceptibility of the stomach to ethanol injury (Kawano & Tsuji 2000). In this study, L-arginine (600 mg kg<sup>-1</sup>)- and DDF (100 mg kg<sup>-1</sup>)-induced gastroprotection was reversed by L-NAME, a non-selective NOS inhibitor, suggesting that the gastroprotective effect of DDF is mediated, in part, by NO. It has been shown that prostaglandins mediated gastroprotection involving, at least in part, the activation of K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels (Peskar et al 2002). In our study, glibenclamide, a blocker of K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels, very potently antagonized the gastroprotective effect of DDF and diazoxide. Since the protection afforded by DDF is additionally indometacin-sensitive, we assume that endogenous prostaglandins act as activators of K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels and thus might contribute to enhanced gastric microcirculation.

### Conclusion

The results of this study indicate a cytoprotective role for 3,6-dimethoxy-6'',6''-dimethyl-[2'',3'':7,8]-chromenèflavone from *L. araripensis*, affording gastroprotection against gastric mucosal damage induced by ethanol and indometacin. DDF gastroprotection is possibly mediated by plurimechanisms that include an antioxidant effect preventing the depletion of gastric NP-SH, stimulation of endogenous prostaglandins and nitric oxide release, activation of capsaicin-sensitive gastric afferents and K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels opening, and these effects are likely to be accompanied by an increase in gastric microcirculation. Because of such an interesting wide spectrum of activity, future studies should address the likely synergistic effect of DDF with other gastroprotective agents like omeprazole or misoprostol. Such synergism may have an advantage in combating the undesirable side effects of these specific agents. From the clinical point of view, DDF may well be more suitable for adjunctive therapy to combat chemotherapy or NSAID-associated gastropathies.

### References

- Alencar, N. M., Cavalcante, C. F., Vasconcelos, M. P., Leite, K. B., Aragão, K. S., Assreuy, A. M., Nogueira, N. A., Cavada, B. S., Vale, M. R. (2005) Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**: 919–922
- Arriaga, A. M. C., Gomes, G. A., Braz-Filho, R. (2000) Constituents of *Bowdichia virgilioides*. *Fitoterapia* **71**: 211–212
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., Navarete, A. (2003) Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* **69**: 905–909
- Benedek, B., Weniger, B., Parejo, I., Bastida, J., Arango, G. J., Lobstein, A., Codina, C. (2006) Antioxidant activity of isoflavones and biflavones isolated from *Godoya antioquiensis*. *Arzneimittelforschung* **56**: 661–644
- Brinkworth, R. I., Stoermer, M. J., Fairlie, D. P. (1992) Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**: 631–637
- Brzozowski, T., Konturek, P. C., Drozdowicz, D., Konturek, S. J., Zayachivska, O., Pajdo, R., Kwiecien, S., Pawlik, W. W., Hahn, E. G. (2005) Grapefruit-seed extract attenuates ethanol- and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. *World J. Gastroenterol.* **11**: 6450–6458
- Cabrera, M., Simoens, M., Falchi, G., Lavaggi, M. L., Piro, O. E., Castellano, E. E., Vidal, A., Azqueta, A., Monge, A., de Cerain, A. L., Sagrera, G., Seoane, G., Cerecetto, H., Gonzalez, M. (2007) Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 3356–3367
- Chattopadhyay, I., Bandyopadhyay, U., Biswas, K., Maity, P., Banerjee, R. K. (2006) Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **40**: 1397–1408
- Gilani, A. H., Khan, A. U., Ghayur, M. N., Ali, S. F., Herzog, J. W. (2006) Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K<sup>+</sup>-channel activation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **99**: 365–373
- Goel, R. K., Pandey, V. B., Dwivedi, S. P., Rao, Y. V. (1988) Antiinflammatory and antiulcer effects of kaempferol, a flavone, isolated from *Rhannus procumbens*. *Indian J. Exp. Biol.* **26**: 121–124
- Halliwel, B. (2007) Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc. Res.* **73**: 341–347
- Kawano, S., Tsuji, S. (2000) Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastrointestinal injury and protection. *J. Gastrointest. Hepatol.* **15** (Suppl.): D1–D6
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* **96**: 229–245
- Kwiecien, S., Brzozowski, T., Konturek, S. J. (2002) Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J. Physiol. Pharmacol.* **53**: 39–50
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcon de la Lastra, C., Motilva, V., Martin Calero, M. J. (2000) Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 45–53
- Lee, J. S., Kim, H. S., Hahm, K. B., Sohn, M. W., Yoo, M., Johnson, J. A., Surh, Y. J. (2007) Inhibitory effects of 7-carboxymethoxy-3',4',5-trimethoxyflavone (DA-6034) on *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and iNOS expression in AGS cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **1095**: 527–535
- Napimoga, M. H., Cavada, B. S., Alencar, N. M., Mota, M. L., Bittencourt, F. S., Alves-Filho, J. C., Grespan, R., Goncalves, R. B., Clemente-Napimoga, J. T., de Freitas, A., Parada, C. A., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q. (2007) *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. *Int. Immunopharmacol.* **7**: 824–835
- Nascimento, M. C., Mors, W. B. (1981) Flavonoids of *Derris araripensis*. *Phytochemistry* **20**: 147–152
- Olaleye, S. B., Farombi, E. O. (2006) Attenuation of indomethacin- and HCl/ethanol-induced oxidative gastric mucosa damage in rats by kolaviron, a natural biflavonoid of *Garcinia kola* seed. *Phytother. Res.* **20**: 14–20
- Peskar, B. M., Ehrlich, K., Peskar, B. A. (2002) Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**: 969–974
- Rainsford, K. D. (1982) An analysis of the gastro-intestinal side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs, with particular reference to comparative studies in man and laboratory species. *Rheumatol. Int.* **2**: 1–10

- Rajendran, N. N., Thirugnanasambandam, P., Viswanathan, S., Parvathavarthini, S., Ramaswamy, S. (2000) Antinociceptive pattern of flavone and its mechanism as tested by formalin assay. *Indian J. Exp. Biol.* **38**: 182–185
- Rao, V. S., Santos, F. A., Sobreira, T. T., Souza, M. F., Melo, C. L., Silveira, E. R. (1997) Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med.* **63**: 146–149
- Reyes-Chilpa, R., Baggio, C. H., Alavez-Solano, D., Estrada-Muniz, E., Kauffman, F. C., Sanchez, R. I., Mesia-Vela, S. (2006) Inhibition of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **105**: 167–172
- Robert, A. (1979) Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* **77**: 761–767
- Robertson, D. J., Larsson, H., Friis, S., Pedersen, L., Baron, J. A., Sorensen, H. T. (2007) Proton pump inhibitor use and risk of colorectal cancer: a population-based, case-control study. *Gastroenterology* **133**: 755–760
- Sedlak, J., Lindsay, R. H. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **25**: 192–205
- Takase, H., Yamamoto, K., Hirano, H., Saito, Y., Yamashita, A. (1994) Pharmacological profile of gastric mucosal protection by marmarin and nobiletin from a traditional herbal medicine, *Aurantii fructus immaturus*. *Jpn. J. Pharmacol.* **66**: 139–147
- Valcheva-Kuzmanova, S., Krasnaliev, I., Galunska, B., Belcheva, A. (2007) Influence of DL-alpha-tocopherol acetate on indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* **27**: 131–136
- Wallace, J. L. (2006) Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric protection. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **5**: 133–137
- Yano, S., Umeda, D., Yamashita, T., Ninomiya, Y., Sumida, M., Fujimura, Y., Yamada, K., Tachibana, H. (2007) Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur. J. Nutr.* **46**: 257–263
- Zayachkivska, O. S., Konturek, S. J., Drozdowicz, D., Brzozowski, T., Gzhegotsky, M. R. (2004) Influence of plant-originated gastroprotective and antiulcer substances on gastric mucosal repair. *Fiziol. Zh.* **50**: 118–127
- Zayachkivska, O. S., Konturek, S. J., Drozdowicz, D., Konturek, P. C., Brzozowski, T., Ghegotsky, M. R. (2005) Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *J. Physiol. Pharmacol.* **56**: 219–231