

JULIANO DE SOUZA GRACIOSO

*ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E ANALGÉSICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE NEUROLAENA
LOBATA (L.) R. BR.*



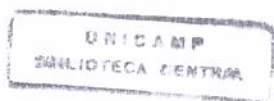
Campinas

1999

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico Juliano de Souza Gracioso.

Campinas, 21 de maio de 1999.

*Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito
- Orientadora -*



JULIANO DE SOUZA GRACIOSO

***ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E ANALGÉSICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE NEUROLAENA
LOBATA (L.) R. BR.***

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Ciências, na área de Farmacologia.*

Orientadora: Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas

1999

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

G753a

Gracioso, Juliano de Souza

Atividades antiulcerogênica e analgésica do extrato hidroalcoólico e frações das folhas de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. / Juliano de Souza Gracioso. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Úlcera péptica. 2. Analgesia. 3. Inflamação. 4. Plantas medicinais. I. Alba Regina Monteiro Souza Brito. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:

1. Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

2. Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero

3. Profa. Dra. Luciane Cruz Lopez

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/05/99

DEDICATÓRIA

A meus pais,

João Dalberto e Jocelina;

Irmãos,

Luciana e Ana Maria in memoriam;

familiares e antepassados.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito, pela orientação.

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima, pelo apoio técnico e incentivo.

Ao Prof. Marçal, pelos trabalhos fitoquímicos prestados.

Ao Dr. Lionel Germonsén-Robineau, pelas informações etnobotânicas fornecidas.

Ao Dr. Henri Joseph, pela coleta e envio da planta.

À Dra. Mirtes Costa, pelos ensaios preliminares realizados.

À Profa. Dra. Luciane C. L. Araújo, pela orientação na iniciação científica.

À Profa. Dra. Mary Lucy, pela confiança.

Ao Prof. Ricardo H. dos Santos Cota, pela ajuda inicial.

Ao Prof. João Dalberto Gracioso, pela correção ortográfica.

Aos colegas de laboratório, Janaína, Ana Beatriz, Walber, Elizabete, Ana Claudia e Camila.

Ao Jairo, pela amizade.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia da Unicamp.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Farmacologia da Unicamp, em especial ao Wanderlei e a Gislaine.

À Sônia, Alexandra, e ao Ivo pelo auxílio burocrático prestado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e comentários pertinentes.

E à Hellen, em especial, pela paciência e apoio durante todos estes dias.

*Há quem passe pelo bosque
e só veja lenha para fogueira. (Tolstoi)*

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A úlcera péptica.....	2
1.1.1. Farmacoepidemiologia da úlcera gástrica.....	2
1.1.2. Anatomia funcional do estômago.....	3
1.1.3. Fatores que contribuem para o desenvolvimento de úlcera gástrica.....	5
1.1.4. Secreção do suco gástrico.....	7
1.1.5. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica.....	9
1.1.6. Terapêutica da úlcera péptica.....	11
1.2. A dor.....	13
1.2.1. A dor e os nociceptores.....	13
1.2.2. A dor e o processo inflamatório.....	16
1.3. Plantas medicinais.....	18
1.3.1. Plantas medicinais como fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas.....	18
1.3.2. Descrição botânica, nomes populares e distribuição geográfica da espécie em estudo.....	19
1.3.3. Etnofarmacologia e usos populares da espécie em estudo.....	21
1.3.4. Descrição química da espécie em estudo.....	22
2. OBJETIVOS	23

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Drogas.....	26
3.2. Animais.....	26
3.3. Preparação do extrato e das frações.....	26
3.4. Procedimentos experimentais.....	28
3.4.1. Toxicidade aguda e DL_{50}	29
3.4.2. Úlcera gástrica induzida por etanol.....	29
3.4.3. Úlcera gástrica induzida por indometacina.....	29
3.4.4. Teste de contorções abdominais.....	30
3.4.5. Teste da placa quente.....	30
3.4.6. Úlcera gástrica induzida por imobilização e frio (estresse).....	31
3.4.7. Úlcera gástrica induzida por HCl-Etanol.....	31
3.4.8. Úlcera gástrica induzida por DAINÉ associada a um agente parassimpatomimético.....	32
3.4.9. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura do piloro.....	32
3.5. Estudo dos mecanismos de ação analgésico e antiulcerogênico das frações ativas de <i>N. Lobata</i>	33
3.5.1. Antagonismo aos receptores opióides.....	33
3.5.2. Edema de pata induzido por carragenina.....	34
3.5.3. Determinação da síntese de PG's na mucosa gástrica.....	34
3.5.4. Determinação de muco livre no conteúdo gástrico.....	35
3.6. Análise estatística.....	35

4. RESULTADOS	36
4.1. Toxicidade aguda e DL ₅₀	37
4.2. Indução de úlcera gástrica por etanol	37
4.3. Indução de úlcera gástrica por indometacina	38
4.4. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	39
4.5. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	40
4.6. Teste da placa quente	41
4.7. Úlcera gástrica induzida por estresse	42
4.8. Úlcera gástrica induzida por HCL/Etanol	43
4.9. Úlcera gástrica induzida por DAINÉ associada a um agente parassimpatomimético	44
4.10. Análise dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico de camundongos submetidos à ligadura do piloro	45
4.11. Mecanismo de ação analgésico e antiulcerogênico das frações ativas de <i>N. Lobata</i>	47
4.11.1. Antagonismo aos receptores opióides	47
4.11.2. Determinação da atividade antiedematogênica	48
4.11.3. Determinação de pg's na mucosa gástrica	49
4.11.4. Determinação de muco livre no conteúdo gástrico	50
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	53
6. CONCLUSÃO	63
7. SUMMARY	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	ácido acetil salicílico
AMPc	monofosfato de adenosina cíclica
ATP	trifosfato de adenosina
CCK	colecistocinina
CCK-B	receptores B de colecistocinina
DL ₅₀	Dose Letal 50 %
ECL	células enterocromafins “like”
EH	extrato hidroalcoólico
FAc	fração acetato de etila
FAq	fração aquosa
FCI	fração clorofórmica
FHx	fração hexânica
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
ILU	índice de lesões ulcerativas
NO	óxido nítrico
PAN	neurônio aferente primário
PG's	prostaglandinas
TGI	trato gastrointestinal

DAINE	drogas antiinflamatórias não esteroidais
v.o.	via oral
v.id.	via intraduodenal
SNC	sistema nervoso central
5-HT	5 hidroxitriptamina
PAF	fator agregante de plaquetas
d.p.	desvio-padrão
e.p.	erro-padrão
LSD	“least statistical differences”

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Evolução temporal da latência (segundos), no teste da placa quente, em camundongos pré-tratados com morfina, EH 90 %, FHx e FCl de <i>N. lobata</i>	41
Tabela 2: Porcentagens de muco livre e alterações no pH e volume do conteúdo gástrico de camundongos tratados com FHx e FCl de <i>N. lobata</i> , por via intraduodenal, após ligadura do piloro.....	51

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Índice de lesões ulcerativas induzidas por etanol em ratos, após tratamento com EH 70 % de <i>N. lobata</i>	37
Figura 2: Índice de lesões ulcerativas induzidas por indometacina em ratos, após tratamento com EH 70 %, FAq e FAc de <i>N. lobata</i>	38
Figura 3: Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, após tratamento com EH 70 %, FAc e FAq de <i>N. lobata</i>	39
Figura 4: Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, após tratamento com EH 90 %, FHx e FCl de <i>N. lobata</i>	40
Figura 5: Índice de lesões ulcerativas induzidas por estresse (imobilização e frio) em camundongos pré-tratados com EH 90 %, FHx e FCl de <i>N. lobata</i> ..	42
Figura 6: Índice de lesões ulcerativas induzidas por HCl/etanol em camundongos pré-tratados com EH 90 %, FHx e FCl de <i>N. lobata</i>	43
Figura 7: Índice de Lesões Ulcerativas induzidas por indometacina e betanecol em camundongos pré-tratados com EH 90 %, FHx e FCl de <i>N. lobata</i> ..	44
Figura 8: Variação de pH do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EH 90 %, FCl e FHx de <i>N. lobata</i> , por via intraduodenal.....	45
Figura 9: Variação da concentração de íons H ⁺ no conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EH 90 %, FCl e FHx de <i>N. lobata</i> , por via intraduodenal.....	46
Figura 10: Variação do conteúdo gástrico (g) de camundongos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EH 90 %, FCl e FHx de <i>N. lobata</i> , por via intraduodenal.....	46

Figura 11: Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos pré-tratados com antagonista opióide (naloxana), após tratamento com EH 90 %, FHx e FCl de <i>N. lobata</i>	48
Figura 12: Edema de pata induzido por carragenina em camundongos pré-tratados com FHx e FCl de <i>N. lobata</i>	49
Figura 13: Síntese e(ou) liberação de PG's pela mucosa gástrica de ratos pré-tratados com FHx e FCl de <i>N. lobata</i>	50
Figura 14: Quantidade de muco livre no conteúdo gástrico de camundongos tratados com FHx e FCl de <i>N. lobata</i> , por via intraduodenal, após ligadura do piloro.....	52

LISTA DE ESQUEMAS

	PÁG.
Esquema 1: Fracionamento das folhas de <i>N. lobata</i> para obtenção do EH 70 % e das frações aquosa e acetato de etila.....	27
Esquema 2: Fracionamento das folhas de <i>N. lobata</i> para obtenção do EH 90 % e das frações hexânica e clorofórmica.....	28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	PÁG.
Ilustração 1: Estruturas da mucosa gástrica.....	4
Ilustração 2: Células do epitélio gástrico.....	5
Ilustração 3: <i>Neurolaena lobata</i>	20



RESUMO

Neurolaena lobata é uma planta herbácea pertencente à família *Compositae-Asteraceae* e é encontrada em países de clima tropical e subtropical, inclusive no Norte do Brasil. Utiliza-se esta planta na medicina popular do Caribe para o tratamento de úlceras gástricas e dor. Os efeitos toxicológicos agudos do EH 70 e 90 % das folhas de *N. lobata* foram analisados e nenhuma morte ou sinal de toxicidade foi observada em doses até 5000 mg/kg, administradas por via oral, em camundongos. O EH 70 % foi submetido a fracionamento e duas frações foram obtidas, uma aquosa (FAq) e outra em partição com acetato de etila (FAc). O EH 70 % produziu inibição de 64 %, no índice de lesões ulcerativas (ILU), nos experimentos de lesões induzidas por etanol em ratos. Na úlcera induzida por indometacina em ratos, o EH 70 %, FAc e FAq inibiram as lesões em 60, 70 e 27 %, respectivamente. No teste algésico, as amostras inibiram as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos em 45, 67 e 4 %, respectivamente. A partir do EH 90 % duas novas frações foram obtidas, uma em partição com hexano (FHx) e uma em partição com clorofórmio (FCI). O EH 90 %, FHx e FCI inibiram, respectivamente, em 77, 86 e 83 % as lesões induzidas por HCl/ etanol; em 48, 70 e 52 % aquelas por estresse e em 40, 57 e 51 %, as ocasionadas por indometacina e betanecol, todas em camundongos. O EH 90 %, FHx e FCI aumentaram, respectivamente, o pH do conteúdo gástrico de 3.8 (controle) para 6.0, 5.5 e 5.0; o conteúdo gástrico de 370 (controle) para 380, 400 e 410 mg e, finalmente, diminuíram a quantidade de íons H^+ ionizáveis no conteúdo gástrico de 9.9 (controle) para 4.8, 4.6 e 6.1 mEq/ml. FHx e FCI aumentaram, respectivamente, a síntese de PG's na mucosa gástrica de ratos em 104 e 38 %, e o muco livre, no conteúdo gástrico de camundongos, em 54 e 4 %. Assim, o mecanismo de ação antiulcerativo parece estar envolvido com o aumento dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica, como prostaglandinas e muco. A atividade antinociceptiva do EH 90 %, FHx e FCI foi avaliada em experimentos de indução química e térmica da dor. As amostras EH 90 %, FHx e FCI inibiram as contorções abdominais induzidas por ácido acético em 62, 47 e 60 %, respectivamente. No teste da placa quente somente FHx e FCI foram eficazes em aumentar os tempos de latência dos animais. Os efeitos analgésicos do EH 90 %, FHx e FCI não foram abolidos pelo antagonista opióide (naloxana), descartando o envolvimento das amostras com estes receptores. Por outro lado, FHx e FCI inibiram o edema de pata, induzido pela carragenina, em 43 e 58 %, respectivamente. Estes resultados demonstraram

que FHx e, principalmente, FCI possuem atividade antinociceptiva relacionada à dor de origem inflamatória. A baixa toxicidade observada em experimentos *in vivo* e os resultados obtidos, analisados em conjunto, confirmam as indicações populares da espécie para o tratamento de úlcera gástrica e dor.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ÚLCERA PÉPTICA

1.1.1. Farmacoepidemiologia da úlcera gástrica

Os distúrbios do trato gastrointestinal são uma espécie de companheiro do homem moderno. Atualmente, são tão comuns nos países em fase de desenvolvimento quanto em países industrializados, que passaram a representar, virtualmente, ‘estigmas da civilização moderna’. A úlcera péptica, que inclui tanto a úlcera gástrica quanto a duodenal, foi uma doença rara até o final do século XVIII e, após este período, passou a ser uma patologia que acomete populações do mundo inteiro (DAYAL & DELELLIS, 1991).

Dentre os pesquisadores, a busca para esclarecer a etiologia da úlcera péptica tem sido incessante, sempre visando relacioná-la com o sexo, idade, migração, nível socioeconômico, variação geográfica e temporal (SONNENBERG, 1985). No entanto, a natureza heterogênea da úlcera dificulta, em muito, o conhecimento de sua etiologia (KURATA, 1989).

Apesar das dificuldades apontadas, cinco fatores ambientais são relacionados ao desenvolvimento da úlcera péptica na raça humana: (a) a utilização de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSAID); (b) a presença, na mucosa do TGI, de *Helicobacter pylori*; (c) o hábito de fumar; (d) o estresse ambiental e (e) os hábitos alimentares das populações (LAM, 1994). Hoje em dia, somam-se a estes fatores o fenômeno das migrações populacionais e o estresse a elas associado, (SONNENBERG, 1985) e o aumento crescente da participação da mulher no mercado de trabalho (PETERSEN, KRISTENSEN, JOHANNESSEN, KLEVELAND, DYBDAHL, MYRVOLD, 1995).

As úlceras pépticas são tão comuns que, cerca de 10% da população, carregam, ao longo de suas vidas, esta patologia ou as seqüelas deixadas por ela (LEWIS & HANSON, 1991). Nos países ocidentais, acredita-se que 10 a 15 % dos homens, foram portadores dessa doença pelo menos uma vez em suas vidas sendo, para muitos, uma doença crônica.

Além disso, sabe-se que a consequência social e econômica da úlcera péptica pode ser bastante grave, tendo-se em vista que, na maioria das vezes, as pessoas a adquirem durante os anos mais produtivos de suas vidas (JENSEN, 1984). Nos Estados Unidos, por exemplo, foram gastos no ano de 1992 US\$ 4 bilhões em drogas para o tratamento desta patologia (ALPER, 1993).

No Brasil, os casos relacionados a esta patologia não são rigorosamente notificados o que torna praticamente impossível obter dados epidemiológicos confiáveis da incidência desta patologia.

No entanto, é sabido que um aspecto importante a ser analisado, quando se decide pelo trabalho aplicado a uma classe terapêutica, em particular, é a incidência da morbidade na população. Além disso, o mercado (local e mundial) apontam na direção de se estudar substâncias potencialmente úteis contra esta patologia (MCINTOSH, BYTH, PIPER, 1991; ALPER, 1993; PETERSEN *et al.*, 1995).

1.1.2. Anatomia funcional do estômago

O trato gastrointestinal é constituído pelo tubo digestivo e suas glândulas secretoras anexas, sendo responsável pela digestão e absorção dos nutrientes encontrados na dieta, funcionando ao mesmo tempo, como barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o interno (SANIOTO, 1991).

De acordo com Kutchai (1996), o estômago pode ser anatômica e funcionalmente dividido em quatro regiões revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo e antro. A mucosa gástrica, por sua vez, é constituída de uma série de depressões e glândulas (WOLFE & SOLL, 1988). Nas depressões estão as células epiteliais superficiais, enquanto que a porção glandular contém as células mucosas cervicais, células parietais, pépticas ou principais e algumas células endócrinas (DOCKRAY, VARRO, DIMALINE, 1996).

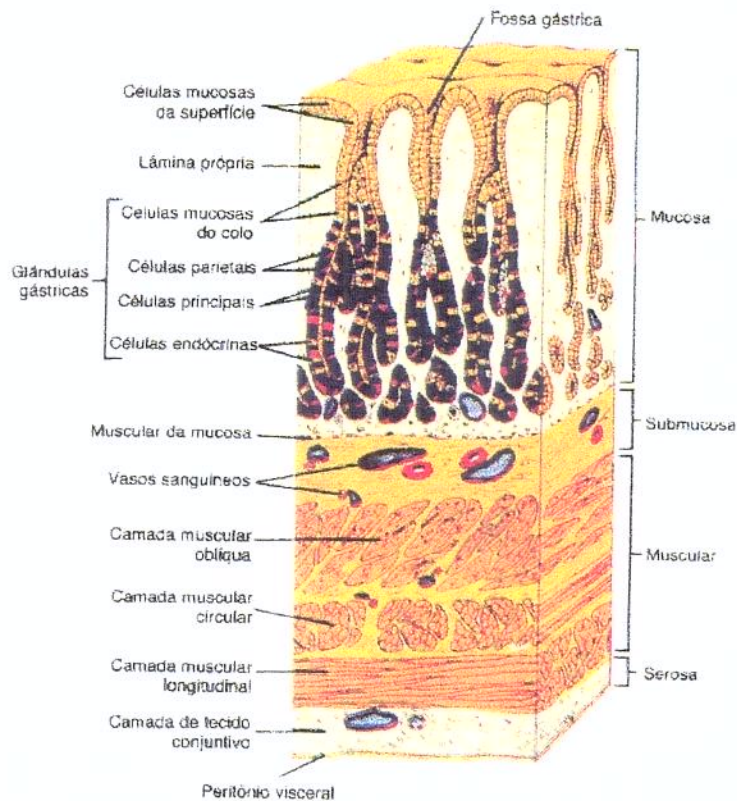


Ilustração 1: Estruturas da mucosa gástrica (Schauf, 1993).

As células parietais, secretoras de ácido clorídrico e as células principais, secretoras de pepsinogênio, estão localizadas, primariamente, no fundo e no corpo, enquanto que as células de gastrina estão no antro (WOLFE & SOLL, 1986). O estômago de um ser humano normal contém, aproximadamente, um bilhão de células parietais ou oxínticas (SACHS, PRINZ, LOO, BAMBERG, BESANCON, SHIN, 1994; WOLFE & SOLL, 1986).

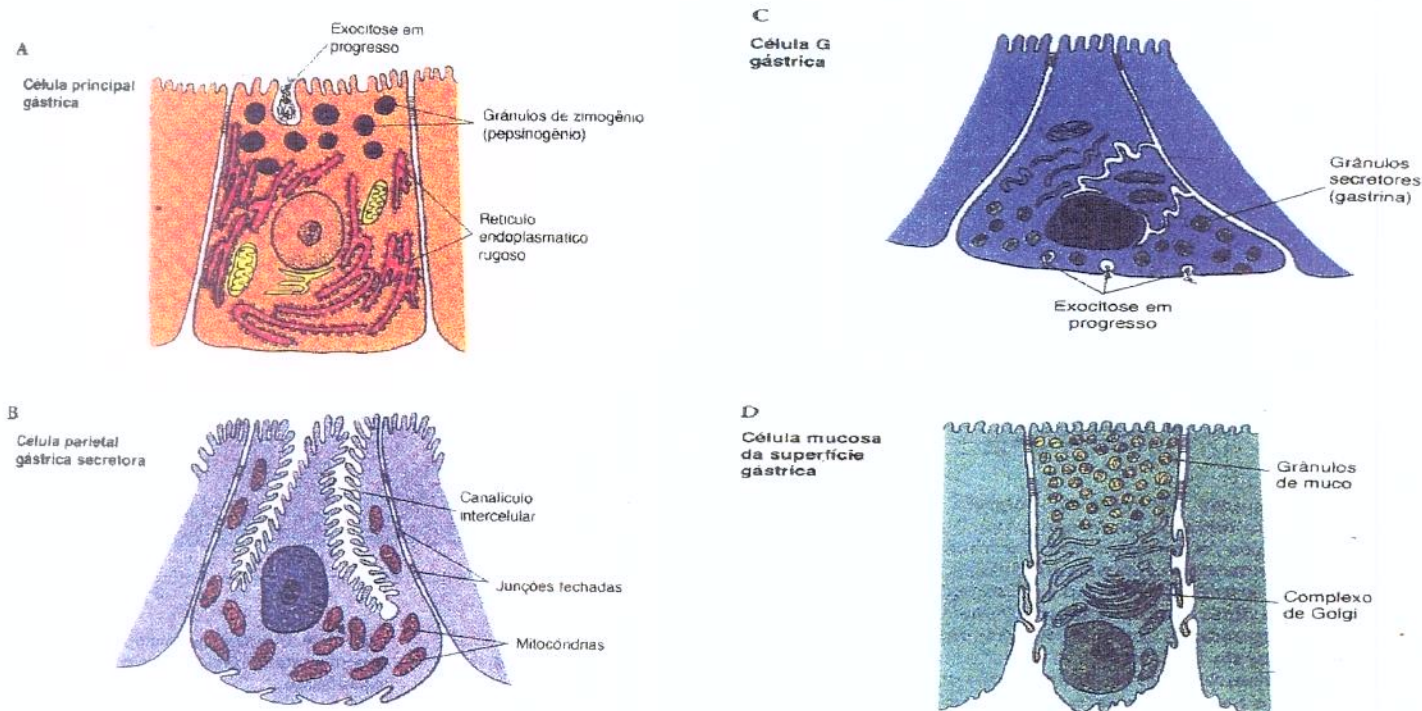


Ilustração 2: Células do epitélio gástrico: Estão representadas as células encontradas nas glândulas da mucosa gástrica: célula péptica (A) responsável pela secreção de pepsina e fator intrínseco, célula parietal (B) responsável pela secreção de HCl, célula G (C) responsável pela síntese e secreção de gastrina e célula mucosa cervical (D) responsável pela síntese e secreção de muco e bicarbonato. (Schauf, 1993).

1.1.3. Fatores que contribuem para o desenvolvimento de úlcera gástrica

Muitos trabalhos foram propostos para elucidar a etiologia das úlceras. Atualmente, acredita-se que a úlcera gástrica dependa não só da acidez, mas também da presença de fatores predisponentes, os quais, coletivamente, atuam reduzindo a defesa da mucosa gástrica (HIRSCHOWITZ, KEELING, LEWIN, OKABE, PARSONS, SEWING, WALLMARK, SACHS, 1995).

Para Katsura, Mishimo, Takasugi (1991) e Szabo, Kusstatscher, Sakoulas, Sandor, Jadus, (1995) as úlceras pépticas são resultantes de um desequilíbrio entre os fatores defensivos da mucosa que representam forças de resistência ao suco gástrico como as secreções de muco e bicarbonato e aqueles agressivos, como por exemplo, a secreção de ácido, de pepsina e de fator intrínseco, que levam à sua lesão.

Desde que a secreção ácida foi descrita, tornou-se evidente que, de alguma forma, a presença de ácido no estômago é nociva, além de principal responsável pela maioria das desordens que afetam este órgão e também seus adjacentes, principalmente esôfago e duodeno (WOLFE & SOLL, 1988; SACHS *et al.*, 1994). Entretanto, sabe-se que a secreção ácida e sua regulação não podem ser considerados como os únicos fatores responsáveis pela úlcera péptica. O processo ulcerativo é complexo e exhibe múltiplas facetas, as quais devem ser, uma a uma, analisadas.

Vários são os mecanismos envolvidos com a etiologia da úlcera péptica, dentre eles, citam-se alguns:

- refluxo do conteúdo duodenal pode causar úlcera gástrica porque, apesar de resistir a um $\text{pH} \approx 2$, as células epiteliais da mucosa gástrica não são resistentes aos ácidos biliares que rapidamente rompem a barreira gástrica mucoprotetora (SANIOTO, 1991; WALLACE & GRANGER, 1996; KUTCHAI, 1996);
- o esvaziamento gástrico acelerado pode levar a úlceras duodenais porque, apesar de bastante resistente aos ácidos biliares, a mucosa duodenal não apresenta resistência ao ácido gástrico, o qual não teve tempo de ser adequadamente neutralizado (DAYAL & DELELLIS, 1991; SANIOTO, 1991; KUTCHAI, 1996);
- se a secreção de muco ou HCO_3^- for suprimida, a barreira citoprotetora da mucosa gástrica fica comprometida e os efeitos do ácido clorídrico e da pepsina sobre a superfície do estômago podem produzir úlceras (BARON, BARR, BATTEN, SIDEBOTHAM, SPENSER, 1986; CURTIS, MACNAUGHTON, GALL, WALLACE, 1995; TARNAWSKI, SANTOS, SARFEH, 1995;

- agonistas α -adrenérgicos como a noradrenalina, além de produzirem vasoconstrição, impedindo a retirada do ácido coletado, contraem os esfíncteres, (o que retém o ácido no estômago) e diminuem a secreção de HCO_3^- . Esta redução de HCO_3^- pode levar à diminuição da citoproteção e, portanto ao aumento da incidência de úlceras (SANIOTO, 1991; KUTCHAI, 1996).

1.1.4. Secreção do suco gástrico

O suco gástrico normal é uma mistura da secreção parietal, ácido clorídrico e fator intrínseco, e de secreções não parietais como muco, bicarbonato, Na^+ , K^+ e pepsinogênio (KUTCHAI, 1996). Os mecanismos moleculares da secreção de ácido clorídrico pela célula parietal iniciam-se através do estímulo de proteínas específicas de membrana por seus respectivos agonistas (acoplamento agonista-receptor), os quais são responsáveis por desencadear uma cascata de alterações bioquímicas intracelulares que irão, subsequente, promover a secreção da célula parietal (SACHS *et al.*, 1994; HIRSCHOWITZ *et al.*, 1995).

Três substâncias químicas endógenas constituem os agonistas responsáveis por estimular a célula parietal a secretar ácido clorídrico:

- acetilcolina - atuando em receptores muscarínicos, provavelmente M_3 , é liberada por neurônios eferentes vagais e estimula a secreção ácida da célula parietal por elevar os níveis intracelulares de Ca^{+2} . Sua liberação está associada a estímulos provenientes do olfato, visão, paladar ou mastigação e ainda, aqueles provenientes do estímulo de neurônios locais da parede gástrica mediante distensão das paredes do estômago com a chegada do alimento (HIRSCHOWITZ *et al.*, 1995; KUTCHAI, 1996);

- gastrina - estimulando receptores CCK-B da célula parietal, induz o aumento da secreção ácida valendo-se do aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} , assim como a acetilcolina. Acredita-se que a gastrina seja secretada, quando existam nos alimentos, proteínas, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , além da estimulação vagal e da alcalinização do antro (DOCKRAY *et al.*, 1996; KUTCHAI, 1996).
- histamina - atuando em receptores H_2 , a histamina é liberada por meio de um mecanismo parácrino pelas ECL existentes na lâmina própria do estômago e dispostas em íntimo contato com as células parietais; sua liberação promove o aumento da secreção ácida por elevar os níveis intracelulares de AMPc (DOCKRAY *et al.*, 1996; SANDOR, KIDD, LAWTON, MIU, TANG, MODLIN, 1996).

Os mecanismos celulares envolvidos com a secreção ácida iniciam-se com os estímulos proporcionados pelos agonistas citados acima, que atuam sinergicamente, conferindo uma elevada eficiência a este processo fisiológico. Inicialmente, na célula parietal há efluxo do íon cloreto (Cl^-) e, com o intuito de assegurar a neutralidade no lúmen gástrico, o íon K^+ acompanha-o por difusão. Esta etapa de fornecimento de K^+ à superfície extracelular é imprescindível para a secreção ácida pela célula parietal.

Várias H^+/K^+ ATPases localizadas em túbulos ou vesículas citoplasmáticas, após o estímulo, fundem-se com a membrana plasmática na superfície luminal das células parietais. Esta fusão aumenta a área de superfície canalicular pela formação de microvilosidades. As H^+/K^+ ATPases atuam como bombas de prótons na etapa final da secreção de íons H^+ em troca dos íons K^+ . Assim sendo, os íons H^+ e Cl^- formam uma solução ácida extremamente importante às funções do estômago (LIND, CEDERBERG, EKENVED, HAGLAND, OLBE, 1983; HIRSCHOWITZ *et al.*, 1995).

1.1.5. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica

Vários mecanismos são considerados importantes na proteção da mucosa gástrica e duodenal contra a agressão causada por ácido clorídrico, pepsina, bile, enzimas pancreáticas e outros fatores agressivos. Dentre os fatores protetores são considerados como os mais importantes:

- *muco* - gel formador de um fino revestimento protetor sobre as células superficiais da mucosa com múltiplas funções. Na realidade, o muco é constituído de diversas glicoproteínas que recebem, em conjunto, o nome de mucinas, possuindo um aspecto viscoso. A atividade citoprotetora do muco resume-se em proteger a mucosa contra as forças mecânicas da digestão, retendo água e diminuindo a difusão de íons H^+ da luz para a membrana apical das células parietais, além de lubrificar a superfície gástrica (FORTE, 1986).
- *bicarbonato* - a proteção da mucosa estomacal não depende somente do controle da secreção ácida gástrica; há necessidade também de uma secreção adequada de muco e de bicarbonato pelas células mucosas cervicais e superficiais do epitélio (WALLACE & GRANGER, 1996). Tanto a secreção de muco quanto a de bicarbonato são estimuladas por diversos fatores e formam a chamada 'barreira mucoprotetora' (SANIOTO, 1991; KUTCHAI, 1996), que é de extrema importância na proteção da mucosa contra injúrias induzidas por ácido, pepsina e etanol (WALLACE & GRANGER, 1996). O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago e pelas glândulas de Brünner do duodeno, permanecendo em grande parte, abaixo ou na camada mucosa. Deste modo, a superfície mucosa fica em contato com o líquido que contém pH elevado em relação à luz do estômago que, em condições normais, irá neutralizar os íons H^+ , enquanto difunde-se através da camada de muco, estabelecendo-se um gradiente de pH entre a luz e as células epiteliais (WALLACE & GRANGER, 1996; KUTCHAI, 1996). O HCO_3^- , em altas concentrações, alcaliniza o muco que neutraliza o ácido luminal (WALLACE & GRANGER, 1996).

- **fluxo sanguíneo** - as mucosas gástrica e intestinal são supridas por capilares ramificados que atravessam a área glandular do estômago e do duodeno. Localizado na camada submucosa, um extenso plexo de artérias e veias regula o suprimento sanguíneo para as células epiteliais superficiais, o que é muito importante na manutenção da integridade da mucosa (TABATA, TOMOMASA, ITOH, MORIKAWA, 1996; WALLACE & GRANGER, 1996).
- **somatostatina** - armazenada nas células D localizadas na mucosa do fundo e do antro gástrico e, principalmente no pâncreas, é responsável por inibir a função secretória das células ECL e células G de gastrina (SACHS *et al.*, 1994). Desta forma, sugere-se que a regulação da secreção ácida pelas células endócrinas gástricas envolve um controle de retroalimentação positiva e negativa, relacionada à tríade das células G, ECL e D (HIRSCHOWITZ *et al.*, 1995; SACHS *et al.*, 1994).
- **prostanóides** - muitos investigadores demonstraram a presença de PG's no estômago e a sua importância na regulação fisiológica do estômago. As PGE₁, PGE₂, PGA₁, bem como os análogos das PGE₂, são responsáveis pela inibição da secreção gástrica, enquanto que, em especial, as PG's dos tipos E, F e as prostaciclina encontradas na mucosa gástrica e intestinal são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato e pelo aumento do fluxo sanguíneo da mucosa. Em conjunto, estes prostanóides atuam na prevenção da formação de úlceras gastrointestinais e auxiliam no processo de cicatrização das lesões já existentes (EBERHART & DUBOIS, 1995; TABATA *et al.*, 1996).

Dentre os muitos fatores que podem contribuir para a atividade citoprotetora das PG's estão: a) estimulação da secreção de muco e bicarbonato (EBERHART & DUBOIS, 1995); b) manutenção do fluxo sanguíneo gástrico adequado, durante exposição a algum tipo de irritante (GUTH, PAULSEN, NAGATA, 1984; EBERHART & DUBOIS, 1995); e c) inibição da liberação de mediadores armazenados nos mastócitos, durante a

resposta inflamatória (HOGABOAM, BISSONNETTE, CHIN, BEFUS, ALLACE, 1993; EBERHART & DUBOIS, 1995).

As funções vasodilatadoras e protetoras da mucosa gástrica das PG's têm sido extensivamente documentadas e estudadas (GISLASON, SORBYE, ABDI-DEZFULI, WALDUM, SVANES, 1995; WHITTLE & VANE, 1987). Segundo Soll (1986) e Curtis, Macnaughton, Gall, Wallace, (1995), as PG's, além de exercerem um importante papel na manutenção da integridade da mucosa gástrica, podem também ser capazes de modular a secreção ácida gástrica.

1.1.6. Terapêutica da úlcera péptica

Até 1970, a única solução terapêutica para a úlcera péptica era a cirurgia. Este procedimento envolvia gastos elevados, com possíveis complicações, além do desconforto imposto ao paciente (SACHS *et al.*, 1994). No caso da opção pela cirurgia, além do custo direto (consulta médica, hospitalização, enfermagem e medicamentos), havia um custo indireto como consequência da ausência no trabalho, durante o período de hospitalização (JENSEN, 1984).

Dentre os primeiros fármacos utilizados na terapêutica da úlcera gástrica estão as drogas que neutralizam o ácido clorídrico, os antiácidos. O hidróxido de alumínio e de magnésio são os agentes mais empregados. No entanto, ambos com o inconveniente de alcalinizarem o pH gástrico e, portanto, deixarem o estômago suscetível a infecções, como aquelas causadas por *Helicobacter pylori* (CASPARY, 1982).

No início da década de 70, uma grande revolução modificou a prática terapêutica no tratamento das úlceras pépticas. Black, Duncan, Durant, Ganellin, Parsons, (1972) relataram os resultados obtidos, utilizando drogas que antagonizavam seletivamente os receptores H₂ da histamina. Estas drogas inibem tanto a secreção ácida gástrica estimulada pela histamina como aquela induzida pela gastrina e, em menor grau, pelos agonistas muscarínicos (POWELL & DONN, 1984). Os principais representantes deste grupo de drogas são a cimetidina e a ranitidina.

Algum tempo depois, devido ao papel fisiológico desempenhado por alguns prostanóides na manutenção da integridade da mucosa gástrica, principalmente a prostaglandina E₂ e as prostaciclina, desenvolveram-se drogas citoprotetoras como o misoprostol que, além de inibirem a secreção ácida gástrica, estimulam aquelas de muco e bicarbonato (MONK & CLISSOLD, 1987).

Na década de 80, surgiram os inibidores da bomba protônica ou H⁺/K⁺ ATPase. A substância padrão deste grupo de fármacos foi o omeprazol que é capaz de inibir a secreção ácida por inativação da bomba, por meio de ligações de dissulfeto das moléculas reagentes do omeprazol com a enzima (SACHS *et al.*, 1994; HIRSCHOWITZ *et al.*, 1995).

Concomitantemente ao desenvolvimento do omeprazol, surgiu a pirenzepina, um antagonista seletivo do receptor muscarínico M₁, que também contribuiu para o tratamento da úlcera péptica, com efeitos colaterais pouco pronunciados. Contudo, a redução da secreção basal de ácido clorídrico, utilizando-se esta classe de fármacos, pode chegar a valores entre 40 a 50 % da secreção normal (TEXTER & REYLLY, 1982). No entanto, o receptor muscarínico que parece estar diretamente relacionado à secreção gástrica e ao desenvolvimento de lesões, é o receptor do tipo M₃ (EHLERT, GRIFFIN, SAWYER, BAILON, 1999).

Outros agentes antiulcerogênicos incluem os colóides, utilizados nos distúrbios gastrointestinais (compostos bismúticos), os quais causam o deslocamento do *Hellicobacter pylori* do epitélio gástrico, com conseqüente lise da bactéria (BIANCHI PORRO, PARENTE, LAZZARONI, PACE, ELDER, 1986). Outra droga é a carbenoxolona que altera a composição do muco e aumenta sua secreção, reforçando a proteção da mucosa contra a difusão ácida. Esta droga é proveniente do extrato de *Glycyrrhiza glabra* ou alcaçuz e atua aumentando a síntese de glicoproteínas, além de inibir as enzimas que inativam as PG's e suprimem a ativação de pepsinogênio (BARROWMAN & PFEIFFER, 1982).

Atualmente, para o tratamento das lesões ulcerativas causadas pelo *H. pylori* e, visando também sua erradicação, são associadas às drogas anti-secretoras e citoprotetoras, drogas como a amoxicilina e o metronidazol (MAKINO, KOGA, ITO, KAWADA, TABATA, 1998).

Mesmo com a diversidade de fármacos conhecidos para o tratamento das úlceras pépticas, o índice de recidivas quando a terapia medicamentosa cessa é ainda muito elevado.

Assim, como não há ainda uma droga que produza 100% de remissão nas úlceras pépticas (ALPER, 1993) e por existir, só no Brasil, centenas de milhares de casos envolvendo este tipo de morbidade, o que significa um problema de saúde pública enorme, estudar substâncias com potencial de atividade antiulcerogênica é, não só importante, como vital.

1.2. A DOR

1.2.1. A dor e os nociceptores

A dor, como outras sensações, pode ser modulada por uma vasta extensão de experiências comportamentais. A variabilidade da dor humana sugere que existem mecanismos neurais que modulam a transmissão nas vias da dor e modificam as reações emocionais do organismo. Esta atividade modulatória ocorreria no SNC.

No entanto, qualquer discussão sobre dor pressupõe algumas distinções a respeito de 'dor' propriamente dita e 'nocicepção'. A nocicepção refere-se à recepção de sinais no SNC evocada pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), dos quais provêm informações sobre o tecido lesado ou danificado. No entanto, nem todos os estímulos nocivos que ativam os nociceptores são necessariamente experiências de dor e isto resulta em uma grande dificuldade de se estudar a dor, já que a mesma tem natureza subjetiva, o que impossibilita conhecer sua origem, ter uma definição, um diagnóstico e um tratamento adequado (JESSEL & KELLY, 1991).

A dor é mediada por algumas classes de fibras aferentes nociceptoras. Receptores nociceptivos ou nociceptores são terminações de nervos livres, distribuídas por todo o corpo, incluindo pele, vísceras, vasos sanguíneos, músculos e junções. Quando ativados por um estímulo nocivo estes terminais geram impulsos que são conduzidos, ao longo do nervo aferente, para o SNC (MARKENSON, 1996).

Nociceptores térmicos ou mecânicos têm um diâmetro pequeno e são constituídos de fibras A-delta mielinizadas, cuja condutância é de cerca de 5 a 30 m/seg (JESSEL & KELLY, 1991); a ativação destes nociceptores está associada às sensações de dor pronunciada e forte (MARKENSON, 1996).

A fibra nociceptora não mielinizada (condutância da ordem de 0.5 a 2 m/seg) de pequeno diâmetro, chamada de fibra C, é também ativada por estímulos de alta intensidade, sejam eles mecânicos, químicos ou térmicos (JESSEL & KELLY, 1991).

Ambas as fibras (A-delta e C) estão amplamente distribuídas na pele bem como nos tecidos mais profundos. Fibras A-delta produzem primeiro sensação de dor bem localizada; em contraste, as fibras C transportam difusamente os estímulos, podendo ter uma transmissão vagarosa e de difícil localização.

Em adição à transmissão dos sinais aferentes, os nociceptores também têm funções neuroefetoras. Quando ativados por estímulos nocivos eles liberam neuropeptídeos de seus corpos celulares que atuam sobre as células periféricas, por exemplo a substância P. A maioria destes neuropeptídeos modulam, isto é, amplificam ou diminuem as respostas aferentes. Os PAN's podem ser ativados, tanto direta quanto indiretamente, por mediadores inflamatórios, neuropeptídeos ou outras substâncias que causem dor; estas substâncias podem alterar a sensibilidade ou o limiar destes nociceptores, tanto de forma positiva como negativa (MARKENSON, 1996).

Diante da enorme quantidade de substâncias algésicas, a analgesia pode ser obtida através de vários fármacos, os quais podem agir em nível central ou periférico.

A classe de fármacos mais conhecida e utilizada, que age diretamente no SNC, promovendo analgesia são os opióides, estes atuam principalmente em receptores específicos e seus subtipos designados Mu (μ), Kapa (κ) e Sigma (δ). A morfina e outros opióides atuam no SNC e nas vísceras principalmente através dos receptores μ , embora possam agir em doses elevadas em outros receptores (REISINE & PASTERNAK, 1996).

Dentre os fármacos conhecidos por promoverem analgesia periférica estão os antiinflamatórios esteroidais (ou corticosteróides) e os não esteroidais (como o ácido acetilsalicílico, a indometacina, o diclofenaco e o piroxicam entre outros). Em alguns tipos de dor, os efeitos analgésicos dessas drogas podem ser superiores aos efeitos dos analgésicos opióides. Em geral, estes fármacos apresentam efeitos analgésicos devido à inibição da síntese de PG's e consequente inibição de outros mediadores endógenos responsáveis pela inflamação; já os antiinflamatórios esteroidais, além de inibir a síntese de PG's, inibem também a síntese de leucotrienos (HALUSHKA & CAMPBELL, 1996). Ambas as classes de antiinflamatórios têm como principal efeito colateral, induzir a formação de lesões ulcerativas.

Nos últimos 20 anos, o avanço no entendimento dos mecanismos da dor tem tido um impacto muito grande no seu manejo e as modificações na opinião de que dor era simplesmente um processo de estímulo-resposta demonstram agora uma nova face.

Um número muito grande de pesquisadores trabalham há algum tempo para desenvolver métodos que possibilitem o estudo da dor. A sensibilização inflamatória no homem e em animais tem sido utilizada para estudo da dor e analgesia, desde muito tempo atrás.

Modelos como o "Tail-Flick test" (D'AMOUR & SMITH, 1941) e o "Hot Plate test" (WOOLFE & MCDONALS, 1944) tiveram grande importância no estudo de narcóticos semelhantes à morfina.

Contudo, foi na década de 50 que começaram a desenvolver novos métodos para estudo de analgésicos e antiinflamatórios. Randall, Sellito, Valdes (1957) apresentaram um método para a determinação de condições algésimétricas na inflamação, utilizando como parâmetro de análise o limiar da dor. Várias modificações deste método tem sido utilizadas por diversos pesquisadores, de acordo com as condições individuais e laboratoriais.

Siegmund, Cadmus, Lu (1957) introduziram o teste das contorções abdominais em camundongos, induzidas pela injeção intraperitoneal de fenil-bezoquinona e Collier, Dinnen, Johnson, Schneider, (1968) com ácido acético. Tanto os analgésicos narcóticos como os não narcóticos bloqueiam as contorções em camundongos (SIEGMUND *et al.*, 1957).

1.2.2. A dor e o processo inflamatório

O processo inflamatório é essencialmente constituído de *rubor et tumor, cum calore et dolore*. O 'rubor' representa a dilatação de pequenos vasos com aumento da permeabilidade vascular. O 'tumor' é devido ao extravasamento de líquidos que leva ao aumento da temperatura local, 'calor'. O edema formado, exerce compressão dos terminais nervosos na área lesada ocasionando 'dor'. Alguns séculos após, acrescentou-se a esta descrição a 'perda da função tecidual'. Todos estes eventos são conhecidos como 'Sinais Cardinais da Inflamação' (BRANDÃO, 1993). Estes eventos, por sua vez, podem ser desencadeados pela formação ou liberação de diferentes mediadores endógenos.

A bradicinina é um mediador inflamatório liberado imediatamente após lesão tecidual, podendo ativar diretamente os PAN's para causar dor e ainda sensibilizar o local para outros estímulos nocivos. Além disso, a bradicinina exerce efeito sinérgico sobre as PG's e sobre a 5-HT ou serotonina, por atuar no neurônio simpático pós-ganglionar, causando liberação de ácido aracdônico, proveniente da membrana fosfolipídica e sua conversão em PG's. Subsequentemente, as PG's, principalmente a PGE₂, estimulariam diretamente os PAN's ou sensibilizariam os mesmos para outros estímulos (MARKENSON, 1996).

Em relação à 5-HT sabe-se que ela é liberada logo após a lesão tecidual, através de uma degranulação dos mastócitos e da consequente liberação de histamina e PAF. A ativação dos PAN's pela 5-HT ocorre por diferentes mecanismos, dependendo de qual receptor é afetado. Além disso, a 5-HT potencializa a dor induzida por outros mediadores, atuando em receptores 5-HT₂ (TAIWO & LEVINE, 1992).

Um outro mediador inflamatório muito estudado é a histamina, cujo papel na sensação de dor ainda não é bem claro; sabe-se que esta substância aparece para intermediar o efeito de outros mediadores. Quando estimulados pela substância P, os mastócitos degranulam e liberam histamina, que produziria a sensação de dor e ardência local (MARKENSON, 1996). A interleucina 1 também promove a liberação de histamina, podendo potencializar seu efeito estimulatório para liberação de PG's e outros eucosanóides das células endoteliais (FALUS & MERETÉY, 1992).

Outros mediadores, como as PG's, são os que mais sensibilizam os PAN's submetidos a estímulo nocivo, seja ele químico, térmico ou mecânico. As PG's podem ativar diretamente os nociceptores durante condições inflamatórias. Os leucotrienos também apresentam um papel importante na hiperalgesia, relacionada, em especial, à inflamação (MARKENSON, 1996).

Outros mediadores importantes são a substância P e o óxido nítrico (NO). A primeira exerce um papel muito importante na hiperalgesia e, após ter sido liberada, atua na periferia, promovendo ativação dos PAN's, além de intensificar a dor por mecanismos que envolvem inflamação, incluindo a liberação de PG's (SARIA, 1984). O NO, que é liberado nas células vasculares endoteliais por ação da substância P e bradicinina, apresenta poucas evidências de ativar diretamente os PAN's, mas pode alterar sua sensibilidade para outros estímulos (MONCADQ, PALMER, HIGGS, 1991).

Finalmente, o papel dos neutrófilos, que são as primeiras células efetoras a aparecerem em sítios de inflamação, deve ser considerado na dor. Além disso, neutrófilos acumulados por causa de outros fatores, podem causar dor. Algumas classes de leucotrienos, células bacterianas ou fragmentos destas, atraem e ativam neutrófilos que liberam 8R, 15S- diHETE que, por sua vez, sensibilizam diretamente os PAN's (MARKENSON, 1996).

Em virtude da complexidade que envolve o processo de dor, em particular a dor de origem inflamatória e, por não haver analgésicos totalmente eficazes sem os efeitos colaterais sobre a mucosa gástrica, a importância de se estudar novas substâncias com esta propriedade farmacológica é relevante.

1.3. PLANTAS MEDICINAIS

1.3.1. Plantas medicinais como fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas

O tratamento de doenças com plantas medicinais tem sido praticado desde o despoitar da História. Os autores gregos, especialmente aqueles da escola Hipocrática, as escrituras de Galeno e muitos físicos da Arábia, já descreviam a existência de numerosos remédios obtidos por meio da utilização de matéria vegetal, a partir de indicação popular. Atualmente, mesmo com o advento das inovações tecnológicas na síntese de novos fármacos, as plantas ainda constituem excelentes ferramentas para a descoberta de novas moléculas farmacologicamente ativas. Uma outra finalidade da pesquisa com plantas, é produzir protótipos de origem vegetal, que possam contribuir para a síntese de drogas mais seguras e acessíveis do ponto de vista financeiro, à população, de forma geral.

Entretanto, a pesquisa envolvendo plantas medicinais, é complexa, cara e apresenta um caráter multidisciplinar. Estes aspectos são importantes quando o objetivo da pesquisa é o de encontrar substâncias terapeuticamente úteis para que, em última análise, seja restaurada a fisiologia do sistema implicado (SOUZA BRITO, 1996).

O Reino Vegetal constitui uma valiosa fonte de substâncias, com atividades biológicas potenciais de grande importância, para a humanidade, à espera de seus descobridores. Nele pode ser encontrada uma fonte inesgotável de constituintes químicos, já isolados anteriormente ou não, que podem ser usados diretamente como fármacos ou como material de partida para a síntese de novos medicamentos (KAPLAN & GOTTLIEB, 1990).

Como ponto de partida para o estudo de algumas espécies vegetais no tratamento de determinadas patologias, o conhecimento envolvido e utilizado na medicina tradicional é de grande valor e beneficia muitos programas de pesquisas em muitas partes do mundo (ELIZABETSKY & COSTA-CAMPOS, 1996).

Nos últimos anos, estudos com plantas medicinais têm sido responsáveis por importantes descobertas; o desenvolvimento desta área de pesquisa deve-se a vários fatores dentre os quais se destaca a participação de um número cada vez maior de profissionais (DI STASI, 1996).

Dentro dessa abordagem, o Brasil e os países tropicais, de modo geral, são privilegiados, apresentando uma flora rica com grande diversidade de espécies, muitas delas com propriedades farmacológicas importantes e que vem sendo amplamente utilizadas na medicina popular.

A cultura do uso de plantas medicinais no tratamento das mais diversas enfermidades ainda é feita e mantida nas populações do interior de algumas regiões do país mediante conhecimentos adquiridos por antepassados (BACCHI, 1996). O conhecimento 'indígena' do uso de produtos naturais tem beneficiado muitos programas e projetos de pesquisas em muitas partes do mundo, sendo que novas descobertas, baseadas em produtos naturais incentivaram o cultivo de importantes espécies de plantas (ELIZABETSKY & COSTA-CAMPOS, 1996).

É neste contexto, portanto, que surgiu o interesse de se estudar as atividades antiulcerogênica e analgésica de *N. lobata*.

1.3.2. Descrição botânica, nomes populares e distribuição geográfica da espécie em estudo

Esta planta foi, no passado, chamada incorretamente de *Pluchea symphytifolia* (Miller) Gillis, mas hoje já não existem dúvidas sobre sua nomenclatura (KHAN & JARVIS, 1989). *Neurolaena lobata* é um vegetal herbáceo, com cerca de 1 a 4 metros de altura, pertencente à família *Compositae-Asteraceae* que consiste em aproximadamente 920 gêneros e mais de 19.000 espécies. Possui folhas alternadas, pinatinervadas, aovadas a oblongo-lanceoladas de 5 a 25 cm de comprimento, podendo ser denteadas, inteiras, trilobuladas ou pentalobuladas. Panículas de até 10 cm de diâmetro, capítulos amarelos de 6 mm de diâmetro, brácteas involúcras e aqueninos de 2 mm.



Ilustração 3: *Neurolaena lobata*

N. lobata é identificada por diversos nomes populares em toda região caribenha. Nas Antilhas e Barbados é conhecida como “catle tongue”, na Costa Rica como “jacks bitters e gaviñana”. Na Dominica, como “tabac zonbí”, na Guatemala e Honduras como “mano de lagarto” e no Haiti como “la choy”. Em Cuba, República Dominicana e Venezuela é denominada “salvia”, sendo este, o nome popular mais utilizado para esta espécie. No Brasil não foi encontrada sinonímia popular descrita.

Nativa do Caribe e da América Central, esta espécie é encontrada em toda América Tropical incluindo regiões da América do Sul, (BORGES-DEL-CASTILHO, MANRESA-FERRERO, RODRÍGUEZ-LUIS, VÁSQUEZ-BUENO, 1972; KERR, MABRY & YOSER, 1981; PASRREITER, 1995) e o Norte do Brasil.

1.3.3. Etnofarmacologia e usos populares da espécie em estudo

Na Guatemala, *N. lobata* é utilizada como remédio para tratamento de diversas doenças, incluindo malária (FRANÇOIS , CLAUS, HERMAN, MARLEEN, 1995), dor de estômago, diabetes, doenças da pele (PASRREITER, 1995) e em outros estados patológicos acompanhados de dor (GERMONSÉN-ROBINEAU, 1995). Esta planta também é utilizada por alguns grupos étnicos nas Antilhas para o tratamento de câncer e a dor a ele relacionada (FRANÇOIS *et al.*, 1995; PASRREITER, 1995).

A população utiliza as folhas da planta na forma de decocção, mas outras preparações também são possíveis. As doses e a frequência das administrações diferem de um grupo étnico para outro (FRANÇOIS *et al.*, 1995). A seguir, são descritos os países e as principais formas de preparação utilizadas pela população local (GERMONSÉN-ROBINEAU, 1995).

Antilhas e Barbados	- dor de cabeça; utiliza-se a folha <i>in natura</i> sobre a cabeça.
Costa Rica e Honduras	- diabetes; utiliza-se a folha, por via oral, na forma de decocção.
Guatemala	- dores em geral, dor de estômago; utiliza-se a folha, por via oral, na forma de decocção
República Dominicana	- febre; utiliza-se a folha, por via oral, na forma de decocção.
Belize e Jamaica	- dores no estômago e úlceras em geral, utilizam-se diversas formas de preparação.

1.3.4. Descrição química da espécie em estudo

Vários autores já estudaram a composição química da planta e algumas substâncias foram identificadas e isoladas, dentre elas destacam-se derivados do timol (BOHLMANN, NATU, KERR, 1979), doze flavonóides incluindo um novo sulfato, cinco destes flavonóides derivados da quercetagenina (KERR *et al.*, 1981), classe de substâncias com atividade antiulcerogênica já comprovada; vários derivados quaternários (JAKUPOVIC, MISRA, CHAU THI, BOHLMANN, CASTRO, 1985) e germacranólideos (BORGES-DEL-CASTILHO *et al.*, 1972).

Das folhas foram isolados terpenos semelhantes a α -amirina e grande quantidade de taninos (GERMONSÉN-ROBINEAU, 1995). Onze sesquiterpenolactonas foram identificadas e isoladas, das quais duas foram denominadas, respectivamente, neurolenina A e neurolenina B (MANCHAND & BLOUNT, 1978). Ainda, das folhas desta espécie, foi isolado um novo alcalóide com características e atividades desconhecidas (GERMONSÉN-ROBINEAU, 1995).

2. OBJETIVOS

Considerando-se: a) as indicações e usos populares de *N. lobata* (L.) R.Br; b) os critérios etnofarmacológicos utilizados na seleção da espécie; c) a importância farmacológica de se estudar substâncias potencialmente ativas em úlceras gastrointestinais e dor; d) a variedade de estudos químicos em relação à planta, juntamente com a abundante quantidade de substâncias químicas isoladas e descritas, foram objetivos deste projeto:

- 1) avaliar as atividades analgésica e antiulcerogênica, utilizando, inicialmente, o extrato hidroalcoólico (EH 70 %) das folhas de *N. lobata* (L.) R.Br e suas frações orgânicas acetato de etila (FAc) e aquosa (FAq), por via oral, na dose de 1000 mg/kg e, posteriormente, o extrato hidroalcoólico (EH 90 %) das folhas de *N. lobata* (L.) R.Br e suas frações orgânicas hexânica (FHx) e clorofórmica (FCI), por via oral, na dose de 1000 e 100 mg/kg, respectivamente.
- 2) estudar os possíveis mecanismos de ação envolvidos com estas atividades, a partir das frações mais ativas.
- 3) determinar a DL₅₀ dos extratos hidroalcoólicos e desenvolver estudos de toxicidade aguda *in vivo*, no intuito de dar respaldo científico à sua utilização popular e ampliar o conhecimento de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas;
- 4) tentar isolar os princípios farmacologicamente ativos a partir das frações ativas, pelo menos no que diz respeito à classe química.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DROGAS

Para a determinação da atividade e mecanismo de ação analgésico foram utilizadas: dipirona sódica (Hoechst Marion Roussel), ácido acético, morfina hidrocloreídica e naloxona hidrocloreídica (Sigma Chemical CO, U.S.A). Para a determinação da atividade e mecanismo de ação antiulcerogênico foram utilizadas: cimetidina (Tagamet® SmithKline), omeprazol (Losec®, Merrell Lepetit), betanecol hidrocloreídico, indometacina, etanol absoluto e ácido clorídrico P.A. (Sigma Chemical Co, U.S.A.). Os extratos hidroalcoólicos e todas as frações foram dissolvidas em Tween 80® solução à 12 % (Synth, Brazil). Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso.

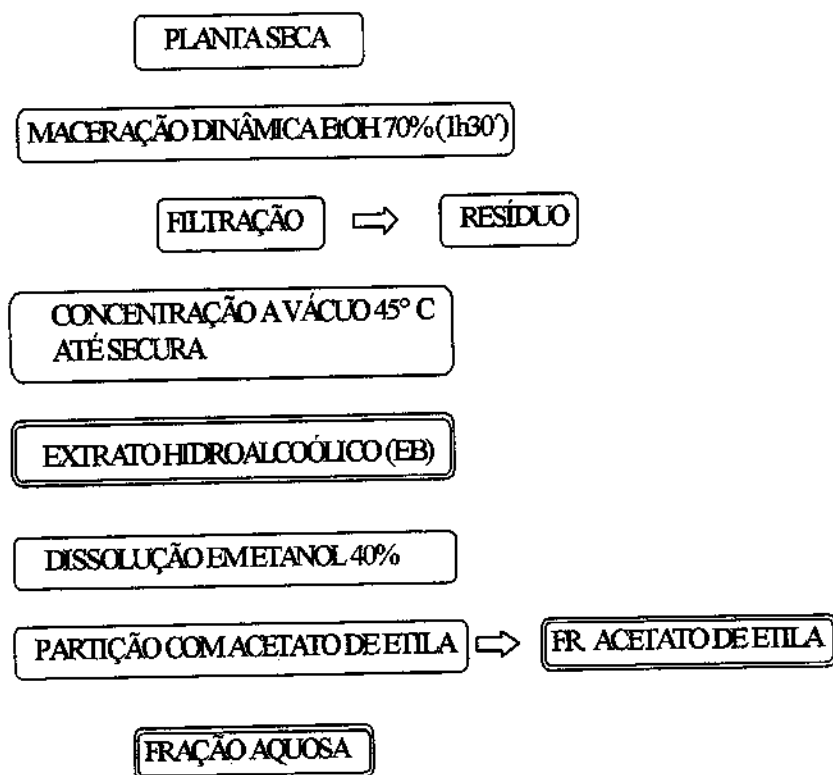
3.2. ANIMAIS

Todos os animais utilizados, ratos ou camundongos, foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da Unicamp. Sendo os camundongos Swiss albinos, machos e os ratos Wistar, machos com peso adequado a cada metodologia. Todos foram aclimatados às condições do laboratório por pelo menos 7 dias antes da manipulação experimental, com temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$ e ciclos claro-escuro controlados de 12 h, alimentados com ração nuvital (Nuvilab®) e água à vontade. Os animais foram distribuídos ao acaso, nos diferentes grupos experimentais e submetidos a jejum de acordo com cada metodologia. A utilização dos animais nos testes de analgesia estão de acordo com as normas descritas por Zimmermann (1983).

3.3. PREPARAÇÃO DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES

Inicialmente, as folhas de *N. lobata* foram coletadas pela equipe de botânicos do Enda-Caribe, em São Domingos, República Dominicana coordenada pelo Dr. Germonsen Robineu e, depois de secas, as mesmas foram encaminhadas para o nosso laboratório, onde foi feita a primeira extração no intuito de se obter as frações que pudessem concentrar o(s) princípio(s) ativo(s). Foi obtido então o extrato hidroalcoólico 70

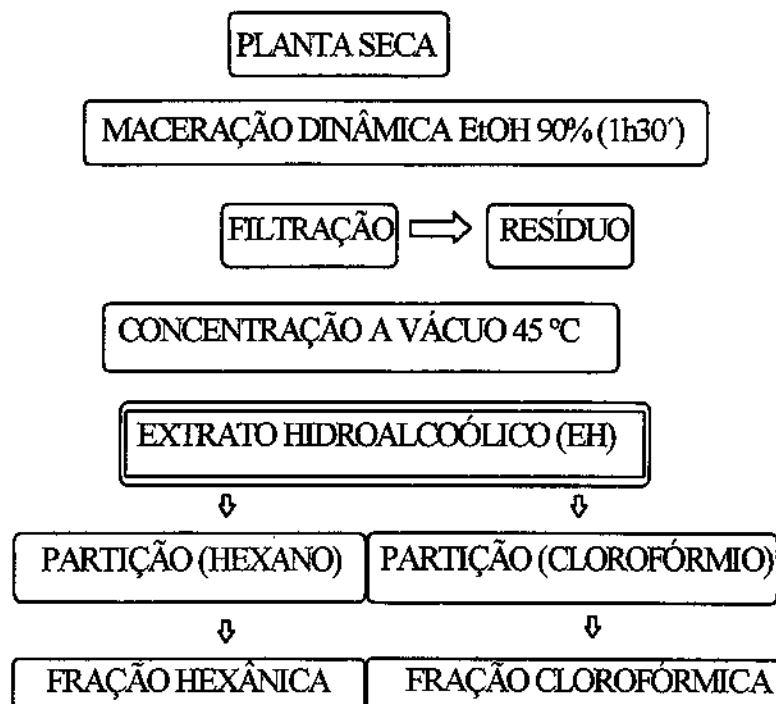
% (EH 70 %) e as frações acetato de etila (FAc) e aquosa (FAq). O processo de extração é ilustrado a seguir:



Esquema 1: Fracionamento das folhas de *N. lobata* para obtenção do EH 70 % e das frações aquosa e acetato de etila.

A partir de uma nova coleta das folhas de *N. lobata* efetuada pela mesma equipe de botânicos realizou-se o segundo processo de extração no intuito de se obter frações que concentrassem o(s) princípio(s) com as atividades desejadas.

As folhas secas foram trituradas e misturadas com etanol-água na proporção de (9:1), utilizando-se o aparelho de Soxhlet. O material obtido foi então evaporado, sob vácuo, a uma temperatura de 50 °C, resultando no extrato hidroalcoólico 90 % (EH); este, por sua vez, foi logo em seguida submetido à extração com hexano e, sucessivamente, com clorofórmio onde, após evaporação dos solventes, obtivemos as frações FHx e FCl, respectivamente. O processo de extração é ilustrado a seguir:



Esquema 2: Fracionamento das folhas de *N. lobata* para obtenção do EH 90 % e das frações hexânica e clorofórmica.

3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para os testes de determinação da atividade antiulcerogênica e analgésica, utilizaram-se ratos ou camundongos tratados com o EH 70 %, FAc e FAq (1000 mg/kg) ou EH 90 % (1000 mg/kg), FHx e FCl (100 mg/kg) de *N. lobata*, solubilizados em Tween 80 à 12 %, administrados em volume final de 10 ml/kg, por via oral ou intraduodenal. Um grupo controle negativo foi sempre utilizado. Este recebeu o mesmo volume do veículo de dissolução das amostras vegetais, Tween 80 a 12 %. Utilizou-se também, um grupo controle positivo, tratado com droga-padrão, indicada em cada metodologia.

Os animais foram sempre mantidos em gaiola especial, sem maravalha e submetidos a jejum mínimo de 24 horas antes dos tratamentos. As lesões ulcerativas foram contadas e classificadas, de acordo com a severidade (SZELENYI & THIEMER, 1978) em:

Lesões em nível 1 (< 1 mm), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas > 3 mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesões ulcerativas (ILU) de acordo com a seguinte equação:

$$ILU = (\sum \text{lesões nível 1}) + (\sum \text{lesões nível 2}) \times 2 + (\sum \text{lesões nível 3}) \times 3$$

3.4.1. Toxicidade aguda e DL_{50} (SOUZA BRITO, 1994)

Grupos de camundongos pesando entre 25 e 35 g foram tratados, em dose única até 5000 mg/kg de EH 70 % e EH 90 % de *N. lobata*. Procedeu-se à observação diária durante 14 dias, para avaliar alterações de peso corporal, de pelos e mucosas, presença de estereotipia, diarreia, convulsões e estados de depressão ou excitação nervosa.

3.4.2. Úlcera gástrica induzida por etanol (MORIMOTO, SHIMOHARA, OSHIMA, SUKAMOTO, 1991)

Grupos de ratos foram tratados com 1000 mg/kg de EH 70 %, 20 mg/kg de omeprazol (controle positivo) ou 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo), uma hora antes da indução de lesão gástrica pela administração, via oral, de 1 ml de etanol absoluto. Trinta min após a administração do agente lesivo, os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados e abertos no sentido da maior curvatura para contagem das lesões.

3.4.3. Úlcera gástrica induzida por indometacina (HAYDEN, THOMAS, WEST, 1978)

Grupos de ratos foram tratados com 1000 mg/kg de EH 70 %, FAc e FAq, 100 mg/kg de cimetidina (controle positivo), ou 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo), uma hora antes da administração do agente lesivo, indometacina 30 mg/kg, dissolvida em bicarbonato de sódio 5 %, por via subcutânea. Após 4 horas da indução, os animais foram sacrificados e tiveram os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura para contagem das lesões.

3.4.4. Teste de contorções abdominais (KOSTER, ANDERSON, DEBEER, 1959)

Grupos de camundongos pesando entre 25 e 30 g foram tratados com 1000 mg/kg de EH 70 %, FAc ou FAq de *N. lobata*; 200 mg/kg de dipirona magnesiana (controle positivo) ou 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo). Este experimento foi também realizado, utilizando-se o EH 90 % (1000 mg/kg) das folhas de *N. lobata* e suas frações hexânica e clorofórmica (100 mg/kg), os controles positivo e negativo foram os mesmo, em ambos experimentos.

O tratamento em dose-volume foi feito 30 min antes da administração de 0,2 ml (i.p.) de ácido acético, à 0,6% em cada animal. A contagem individual do número de contorções foi realizada entre o 6° e o 21° min após a administração do ácido acético.

3.4.5. Teste da placa quente

O teste da placa quente foi utilizado para determinar a latência da resposta de camundongos ao estímulo nociceptivo de acordo com a metodologia descrita por Eddy e Leimback (1953). Neste experimento foi utilizado o aparelho Hot Plate (Ugo Basile, Model-DS 37), mantido à uma temperatura constante de $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais foram colocados em um cilindro de vidro de 24 cm de diâmetro com calor na sua superfície. O tempo decorrente entre o primeiro contato do animal com a placa quente até o momento em que o mesmo lambeu suas patas dianteiras ou então efetuou um salto repentino, foi determinado como latência.

Grupos de camundongos pesando entre 25 e 30 g foram pré-tratados com 10 mg/kg de morfina s.c. (controle positivo), 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo), 1000 mg/kg de EH 90 % e 100 mg/kg de FHx e FCl de *N. lobata*, por via oral. Todas as substâncias foram administradas 30 min antes do início do experimento. Os animais que participaram do experimento foram selecionados 24h antes, com base em sua reatividade para o teste; somente aqueles que demonstraram um tempo de reação na faixa de 3.9-6.9 s foram selecionados. Todos os animais foram observados no tempo 0, 30, 60 e 90 min após administração das drogas. O período de latência, de 30 s, foi estabelecido como completa analgesia.

3.4.6. Úlcera gástrica induzida por imobilização e frio (estresse)

A metodologia utilizada foi descrita por Levine (1971); no entanto, foram realizadas algumas modificações durante sua padronização em nosso laboratório. Após 36 h de jejum, camundongos, com peso entre 40 ± 2 g, foram tratados com 1000 mg/kg de EH 90 % e 100 mg/kg de FHx e FCl de *N. lobata*. Cimetidina 100 mg/kg foi utilizada como controle positivo e Tween 80, 10 ml/kg, como controle negativo, todos administrados por via oral, 30 min antes da indução da lesão gástrica por estresse.

Promoveu-se o estresse por meio da imobilização das patas dianteiras e traseiras do animal seguido da permanência individual dos animais em contêntores de PVC com tamanho de 9 cm de comprimento por 3,5 cm de diâmetro. Estes foram então acondicionados à temperatura de (4 °C), por um período de 3 h, sendo sacrificados por deslocamento cervical, após este período. Os estômagos foram retirados e abertos no sentido da maior curvatura, para contagem das lesões gástricas.

3.4.7. Úlcera gástrica induzida por HCl-Etanol

Este método foi baseado na metodologia descrita por Mizui e Doteuchi (1983). Após 24h de jejum, grupos de camundongos foram tratados com 20 mg/kg de omeprazol (controle positivo), 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo), 1000 mg/kg de EH 90 % e 100 mg/kg de FHx e FCl de *N. lobata*, 50 min antes da indução da lesão gástrica. Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose-volume final de 10 ml/kg.

A lesão gástrica foi induzida pela administração, via oral, de 0,2 ml de uma solução de HCl 0,3 M / etanol 60 %. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 1, hora após a administração do agente lesivo; os estômagos foram retirados e inflados com 2,0 ml de solução fisiológica NaCl 0,9 % e abertos ao longo da grande curvatura. Após este procedimento, os estômagos permaneceram em formalina 5 %, durante um período adicional de 30 min para fixação e posterior contagem das lesões.

3.4.8. Úlcera gástrica induzida por DAINÉ associada a um agente parassimpatomimético

Realizou-se o experimento segundo a metodologia descrita por Rainsford (1978). Utilizaram-se grupos de camundongos Swiss, machos, pesando entre 30 e 35 g, deixados em jejum por um período de 24h. A estimulação parassimpática foi realizada pela administração i.p. de betanecol, na dose de 5mg/kg, preparado em solução de NaCl 0,15 M, estéril, imediatamente antes do uso. A indometacina foi administrada concomitante ao betanecol, na dose de 30 mg/kg, por via subcutânea, preparada em solução de 5 % de NaHCO₃, estéril, imediatamente antes da utilização.

Os tratamentos com 1000 mg/kg de EH 90 % e 100 mg/kg de FHx e FCl 100 de *N. lobata* ou 100 mg/kg de cimetidina (como controle positivo) e 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo), foram realizados 30 min antes da administração dos agentes indutores, por via oral. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, 4 h após ao estímulo lesivo. Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da maior curvatura, para contagem das lesões.

3.4.9. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura do piloro

Realizaram-se algumas modificações no método de ligadura de piloro descrito por Shay (1945) para ratos, no intuito de padronizar o método para camundongos. Após 36 h de jejum, grupos de camundongos pesando entre 35 e 38 g, sob anestesia de éter, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para ligadura do piloro. A administração das amostras, 1000 mg/kg de EH 90 %, 100 mg/kg de FHx e FCl de *N. lobata*, 100 mg/kg de cimetidina (controle positivo) e 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo), foram realizadas, por via intraduodenal, logo após a ligadura do piloro (MORIMOTO *et al.*, 1991).

Os animais tiveram as incisões suturadas, logo após as administrações. Três horas após a cirurgia os camundongos foram sacrificados, as incisões reabertas e, após ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico), os estômagos foram retirados.

O conteúdo estomacal de cada animal foi coletado e, em seguida, foram determinados; volume, pH e concentração de íons hidrogênio do suco gástrico. Para tal, adicionou-se água destilada ao conteúdo do estômago até completar volume final de 10 ml; esta solução foi então centrifugada por 10 min a 3000 rpm e o sobrenadante foi titulado com NaOH 0.01 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração total de ácido foi expressa em mEq/ml.

3.5. ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANALGÉSICO E ANTIULCEROGÊNICO DAS FRAÇÕES ATIVAS DE *N. LOBATA*

Realizaram-se dois experimentos de analgesia, buscando-se elucidar o mecanismo pelo qual as frações orgânicas de EH 90 % de *N. lobata* poderiam exercer esta atividade: contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos pré-tratados com naloxona e edema de pata induzido por carragenina. Para determinação dos possíveis mecanismos envolvidos na ação antiulcerogênica apresentada pelas mesmas frações, foram avaliados o aumento na síntese de PG's pela mucosa gástrica e a quantidade de muco livre no conteúdo gástrico.

3.5.1. Antagonismo aos receptores opióides

Para analisar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do EH 90 %, FCl e FHx das folhas de *N. lobata* foi utilizado o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos (KOSTER *et al.*, 1959). Os animais foram pré-tratados com 5 mg/kg, i.p. de naloxona, 15 min antes da administração oral de 1000 mg/kg de EH 90 %, 100 mg/kg de FCl e FHx, 10 mg/kg de morfina (controle positivo), via subcutânea e 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo). As contorções foram observadas entre 6° e 21° min após a administração do ácido acético.

3.5.2. Edema de pata induzido por carragenina

O experimento realizado foi similar ao descrito por Henriques, Silva, Martins, Flores, Cunha, Assreuy-Filho, Cordeiro, (1987), em que grupos de camundongos, pesando entre 30 e 32 g foram utilizados para determinar a atividade antiedematogênica das amostras vegetais. Os animais foram pré-tratados com 100 mg/kg de FHx e FCl de *N. lobata*, por via oral, 20 mg/kg de indometacina (controle positivo), por via subcutânea e 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo). Trinta min após os tratamentos, administrou-se a injeção de 250 µg de carragenina (1% em suspensão salina 0,9 %, estéril) em uma das patas posteriores do animal; a pata contralateral recebeu volume similar de salina 0,9 %, estéril. Três horas após a administração da carragenina, os animais foram sacrificados, as patas foram amputadas na altura da articulação tibiotársica e pesadas. O aumento de peso da pata, causado pela administração do agente irritante foi determinado pela diferença de peso entre as duas patas.

3.5.3. Determinação da síntese de PG's na mucosa gástrica

Realizou-se o experimento segundo a metodologia descrita por Curtis *et al* (1995). Os animais, ratos Wistar machos, pesando entre 150 e 160 g, foram sacrificados por deslocamento cervical, trinta min após o tratamento com 100 mg/kg de FHx e FCl, 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo do veículo), 10 ml/kg de NaCl 0,9% (grupo "SHAM"), por via oral e 20 mg/kg de indometacina (inibidor da síntese de PG's), por via subcutânea. O estômago foi retirado e aberto, a mucosa foi raspada até sua total remoção. O conteúdo foi pesado e extensivamente picotado, sendo logo após suspenso em uma solução de 1 ml de tampão sódio fosfato (10 mM; pH 7.4), esta solução permaneceu incubada a 37°C, por um período de 20 min. A prostaglandina presente no tampão foi determinada por "kit" de enzima-imunoensaio (RPN222-Armersham), em espectrofotômetro a 450 nm.

3.5.4. Determinação de muco livre no conteúdo gástrico

Este experimento foi descrito inicialmente por Bolton, Palmer, Cohen, (1978) com algumas modificações realizadas por Sun, Matsumoto, Yamada, (1991). Grupos de camundongos, pesando entre 35 e 38 g, permaneceram em jejum por um período de 24 h sob anestesia de éter, o abdome foi aberto para ligadura do piloro. Cada grupo teste recebeu 10 ml/kg de Tween 80 (controle negativo), 100 mg/kg de cimetidina (controle positivo) e 100 mg/kg de FHx e FCl de *N. lobata*, todos administrados por via intraduodenal, logo após a ligadura do piloro. Três horas após, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a incisão foi reaberta, o estômago retirado e seu conteúdo imediatamente coletado e imergido em 10 ml de uma solução contendo 0,02 % de “alcian blue” dissolvido em tampão sucrose 0.16 M / acetato de sódio 0.05 M (pH 5.8). Esta mistura foi incubada por 24 h, a uma temperatura de 20 °C e logo após centrifugada por 10 min a 3000 rpm. A quantidade de muco livre no conteúdo gástrico foi determinada pela quantidade de muco ligado ao “alcian blue”, em espectrofotômetro a 615 nm.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados estão expressos na forma da média $\pm$ desvio-padrão (dp) ou erro-padrão (ep) da média, dependendo do experimento. Os resultados com distribuição normal, foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelos testes a posteriori de LSD ou Dunnett, com nível de significância mínimo de $p < 0,05$ para todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1. TOXICIDADE AGUDA E DL₅₀

O EH 70 % e 90 % de *N. lobata*, administrado em dose única, até 5000 mg/kg por via oral, não provocaram sinais de toxicidade em camundongos, observados por um período de 14 dias. Nenhuma morte foi observada pela administração destas doses, indicando que a DL₅₀ do EH 70 % e 90 % desta espécie, por via oral, é superior a 5000 mg/kg. Nenhuma alteração morfológica foi detectada após a retirada e pesagem dos órgãos dos animais.

4.2. INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA POR ETANOL

Os resultados do ILU obtidos no experimento de úlcera gástrica induzida por etanol, na ausência (Tween 80) e na presença do EH 70 % de *N. lobata* (1000 mg/kg) e da droga padrão omeprazol (20 mg/kg), estão apresentados na figura 1, na forma da média $\pm$ d.p. da média, em relação aos resultados obtidos pelo grupo controle.

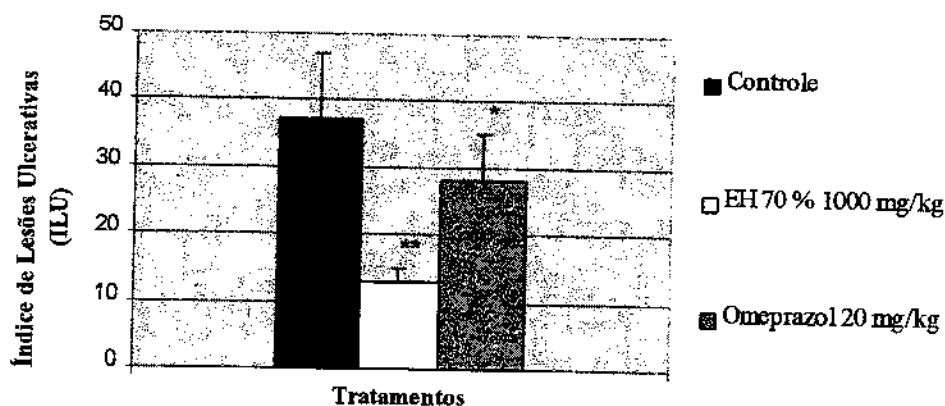


Figura 1: Índice de lesões ulcerativas induzidas por etanol em ratos após tratamento com o EH 70 % de *N. lobata*. (N = 9). ANOVA: $F_{(2,24)} = 8,196$ $p < 0,05$. LSD Test: * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que o EH 70 % de *N. lobata* inibiu significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas por etanol com valor do ILU 3 (três) vezes menor do que aquele obtido para o grupo controle, o que corresponde a 64 % de inibição das lesões gástricas. O resultado obtido pelo omeprazol corresponde a 23 % de inibição das lesões induzidas por este mesmo agente.

4.3. INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA POR INDOMETACINA

Os resultados do ILU obtidos no experimento de úlcera gástrica induzida por indometacina (20 mg/kg s.c.), na ausência (Tween 80) e na presença do EH 70 %, FAq e FAc (1000 mg/kg) de *N. lobata* e da droga padrão cimetidina (100 mg/kg), estão apresentados na figura 2, na forma da média $\pm$ d. p. da média, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

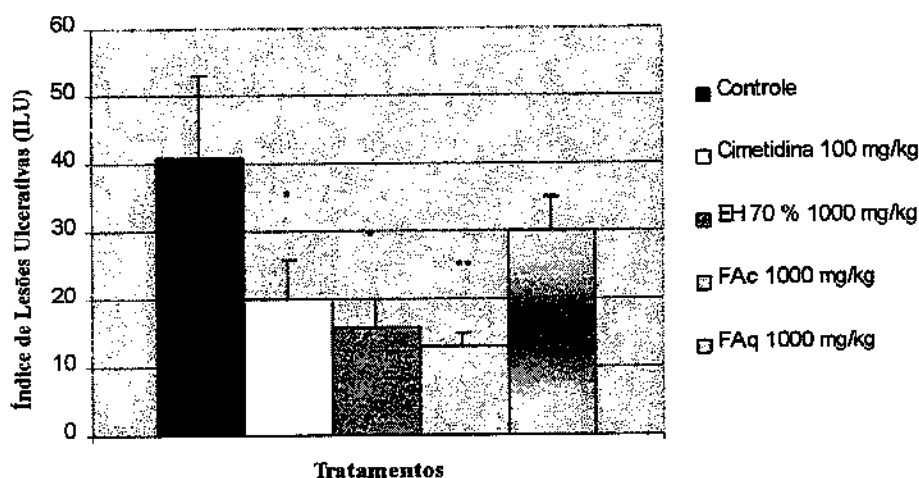


Figura 2: Índice de lesões ulcerativas induzidas por indometacina em ratos após tratamento com o EH 70 % FAq e FAc de *N. lobata* (N = 6 - 14). ANOVA: $F_{(4,43)}=1,11$ $p>0,05$; LSD Test: * $p<0,05$ ** $p<0,001$

Os resultados obtidos demonstraram que o EH 70 % e FAc de *N. lobata* inibiram significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas pela indometacina. FAc, EH 70 % e cimetidina apresentaram inibição do ILU de 70, 60 e 57 %, respectivamente, enquanto que a FAq apresentou inibição de 27 %.

4.4. TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

Os resultados obtidos no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, na ausência (Tween 80) e na presença de substância analgésica (dipirona 200 mg/kg), e das substâncias teste EH 70 %, FAq e FAc de *N. lobata* (1000 mg/kg), estão apresentados na figura 3. Os resultados estão expressos na forma da média $\pm$ d.p. da média em relação aos resultados obtidos para o grupo controle, do número de contorções abdominais observadas entre o 5° e o 21° min, após a administração do ácido.

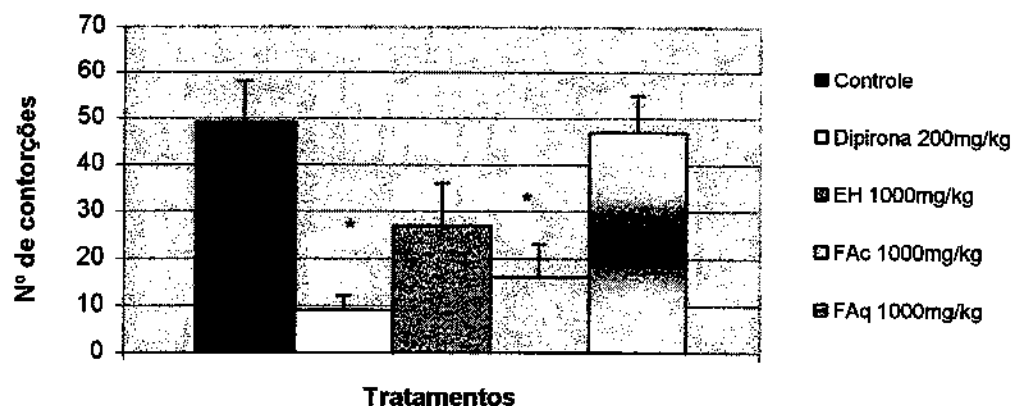


Figura 3: Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos após tratamento com o EH 70 %, FAc e FAq de *N. lobata*. (n = 10). ANOVA: $F_{(4,28)} = 5,59$ $p < 0,05$; LSD Test: $*p < 0,01$.

Os resultados obtidos pelas amostras de *N. lobata* no teste de contorções abdominais indicou que FAc, mas não FAq, inibiu significativamente, em 67 %, as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O resultado de 45 % de inibição obtido para o EH 70 % foi muito próximo da significância. A droga padrão inibiu as contorções em 82 %.

4.5. TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

A inibição das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético na ausência (Tween 80) e na presença de substâncias analgésicas (dipirona 200 mg/kg e morfina 10 mg/kg), e para as substâncias teste EH 90 % (1000 mg/kg), FHx e FCl (100 mg/kg), está apresentada na figura 4. Os resultados estão expressos na forma da média $\pm$ d.p. da média em relação aos resultados obtidos para grupo controle, do número de contorções abdominais obtidas entre o 5° e o 21° min, após a administração do ácido.

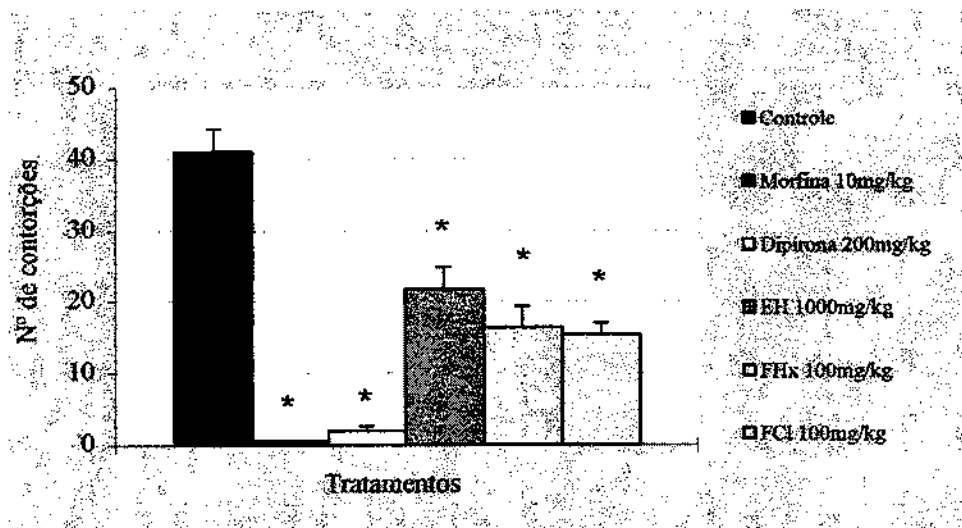


Figura 4: Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos após tratamento com EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata*. (n = 7). ANOVA: $F_{(4,30)}=229.47$ $p<0,05$; Teste de Dunnett: * $p<0,001$.

Os grupos tratados com morfina, dipirona sódica, EH 90 %, FHx e FCI, apresentaram inibição significativa do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. As porcentagens de inibição alcançadas por FHx (60%) e FCI (62%) foram obtidas com a metade da dose usada para dipirona (95%) demonstrando, assim, um alto efeito antinociceptivo destas amostras.

4.6. TESTE DA PLACA QUENTE

No teste da placa quente não houve diferença significativa entre o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico dos animais testados 24 h antes do início do experimento, e aquela obtida no momento de se iniciar o experimento (dados não apresentados). A tabela 1 apresenta a evolução temporal da resposta antinociceptiva da morfina (10 mg/kg), EH 90 % (1000 mg/kg), FHx e FCI (100 mg/kg) de *N. lobata*, em camundongos, nos respectivos tempos de observação 0, 30, 60 e 90 min . Os resultados obtidos estão expressos como a média $\pm$ d.p. da média das latências (segundos) de cada grupo testado, calculadas em relação ao tempo zero (0) de observação do mesmo grupo.

Tabela1: Evolução temporal da latência (segundos), no teste da placa quente, em camundongos pré-tratados com morfina, EH 90 %, FHx e FCI de *N. lobata*.

Observação (min)	Latência (s)				
	controle	morfina	EH 90 %	FHx	FCI
0	6.6 $\pm$ 0.92	6.7 $\pm$ 1.04	5.9 $\pm$ 0.99	6.2 $\pm$ 1.28	6.1 $\pm$ 0.99
30	7.2 $\pm$ 1.16	15.3 $\pm$ 2.9**	7.5 $\pm$ 1.3	9.5 $\pm$ 1.07*	9.7 $\pm$ 1.04*
60	6.2 $\pm$ 1.28	16.5 $\pm$ 3.59**	9.0 $\pm$ 2.3	11.1 $\pm$ 1.81*	13.9 $\pm$ 1.89**
90	7.1 $\pm$ 0.83	13.8 $\pm$ 3.49**	7.5 $\pm$ 1.07	10.8 $\pm$ 1.6*	13.6 $\pm$ 2.07**

Diferenças estatísticas estabelecidas em comparação ao tempo 0 de observação para cada grupo (n = 8). ANOVA: $p < 0.05$; $F_{(4,35)}$ 30 min = 24.65; 60 min = 22.42; 90 min = 17.86 ($p < 0.05$); Teste de Dunnett. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Os resultados demonstraram que a administração oral de FHx e FCI, mas não aquela do EH 90 %, aumentaram significativamente o tempo de latência da resposta dos animais ao estímulo térmico nos tempos de observação de 30, 60 e 90 min. A morfina, utilizada como droga padrão, produziu significativo efeito antinociceptivo durante estes mesmos tempos de observação. Foi possível observar ainda, que a atividade antinociceptiva das amostras vegetais concentrou-se, notadamente, no tempo de observação de 60 s, mantendo-se constante até o tempo de 90 s.

4.7. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ESTRESSE

Foi avaliada a atividade antiulcerogênica das amostras vegetais, EH 90 % (1000 mg/kg), FHx e FCI (100 mg/kg) de *N. lobata*, utilizando o método de estresse induzido por imobilização e frio. Os resultados obtidos estão expressos na figura 5, na forma da média $\pm$ d.p. da média, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

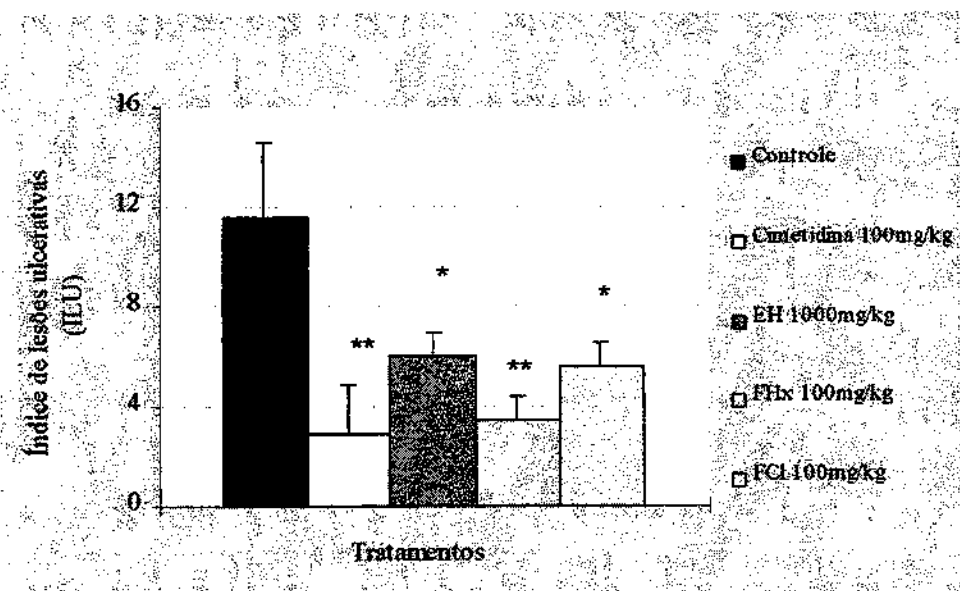


Figura 5: Índice de lesões ulcerativas induzidas por estresse (imobilização e frio) em camundongos pré-tratados com EH 90 %, FHx e FCI de *N. lobata*. (n = 7). ANOVA: $F_{(4,30)}=14.47$ $p<0,05$; Teste de Dunnett: * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

Os resultados obtidos demonstraram que EH 90 %, FCl e, principalmente, FHx de *N. lobata* inibiram, significativamente, a formação das lesões ulcerativas induzidas por estresse. A cimetidina apresentou inibição do ILU de 75 %, em que FHx apresentou praticamente o mesmo resultado. A inibição produzida pelo EH 90 % e pela FCl ficou em torno de 50 %.

4.8. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR HCL/ETANOL

Avaliou-se a atividade antiulcerogênica das amostras vegetais, EH 90 % (1000 mg/kg), FHx e FCl (100 mg/kg) de *N. lobata*, utilizando-se um agente irritante da mucosa gástrica como indutor das lesões (solução 0,3M HCl / 60% etanol absoluto). Os resultados obtidos para cada amostra estão expressos na figura 6, na forma de média $\pm$ d. p. da média, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

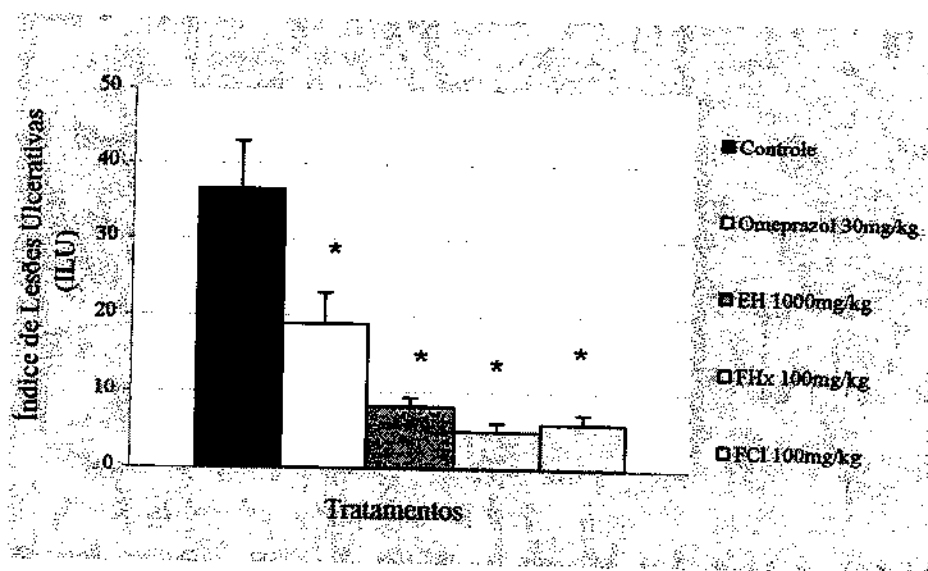


Figura 6: Índice de lesões ulcerativas induzidas por HCl/etanol em camundongos pré-tratados com EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata*. (n = 7). ANOVA: $F_{(4,30)}=101.91$ $p<0,05$; Teste de Dunnett: * $p<0,001$.

As amostras vegetais EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata* inibiram, significativamente, a formação das lesões ulcerativas induzidas por este tipo de agente lesivo com valores de inibição igual a 77, 86 e 83 %, respectivamente. Estes resultados correspondem a praticamente o dobro da inibição alcançada pelo omeprazol (48 %).

4.9. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR DAINE ASSOCIADA A UM AGENTE PARASSIMPATOMIMÉTICO

Neste experimento foi avaliada a atividade antiulcerogênica das amostras vegetais, EH 90 % (1000 mg/kg), FHx e FCl (100 mg/kg) de *N. lobata*, em prevenir a formação das lesões ulcerativas pela associação de um agente parassimpatomimético (betanecol) a uma DAINE (indometacina). Os resultados obtidos para cada amostra estão expressos na figura 7, na forma da média $\pm$ d.p. da média para cada grupo, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

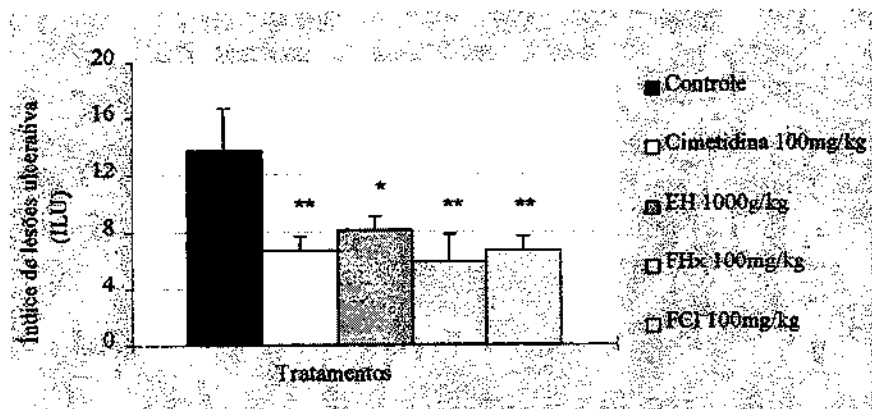


Figura 7: Índice de lesões ulcerativas induzidas por indometacina e betanecol em camundongos pré-tratados com EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata*. (n = 7). ANOVA: $F_{(4,30)}=11,75$ $p<0,05$; Teste de Dunnett: * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

Os resultados obtidos demonstraram que o EH 90 %, FCl e, principalmente, FHx de *N. lobata* inibiram significativamente a formação das lesões ulcerativas induzidas pela associação dos agentes lesivos em 40, 57 e 51 %, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos apresentados pela cimetidina (51%) utilizada na mesma dose das frações.

4.10. ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SUCO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LIGADURA DO PILORO

Neste experimento foi avaliada a atividade do EH 90 % (1000 mg/kg), FHx e FCl (100 mg/kg) de *N. lobata*, em alterar os parâmetros bioquímicos do suco gástrico de camundongos após administração intraduodenal das amostras vegetais. Os resultados obtidos neste experimento estão expressos na figura 8 (pH), figura 9 (concentração de íons H^+) e figura 10 (conteúdo gástrico), como a média $\pm$ d.p. da média, calculados sempre em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

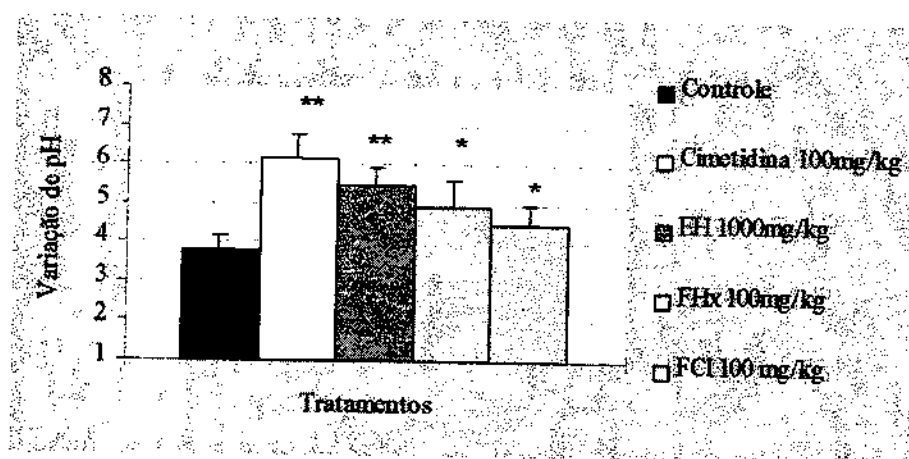


Figura 8: Variação de pH do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EH 90 %, FCl e FHx de *N. lobata*, por via intraduodenal. (n = 7). ANOVA $F_{(4,30)} = 18.31$, $p < 0.05$; Teste de Dunnett * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

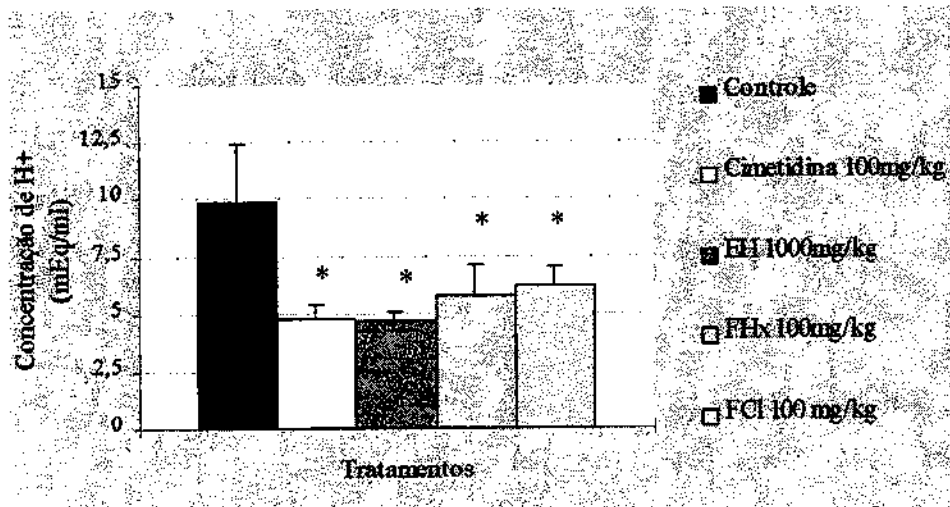


Figura 9: Concentração de íons H⁺ no conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EH 90 %, FCl e FHx de *N. lobata*, por via intraduodenal. (n = 7). ANOVA $F_{(4,30)} = 15.98$, $p < 0.05$; Teste de Dunnett * $p < 0.001$.

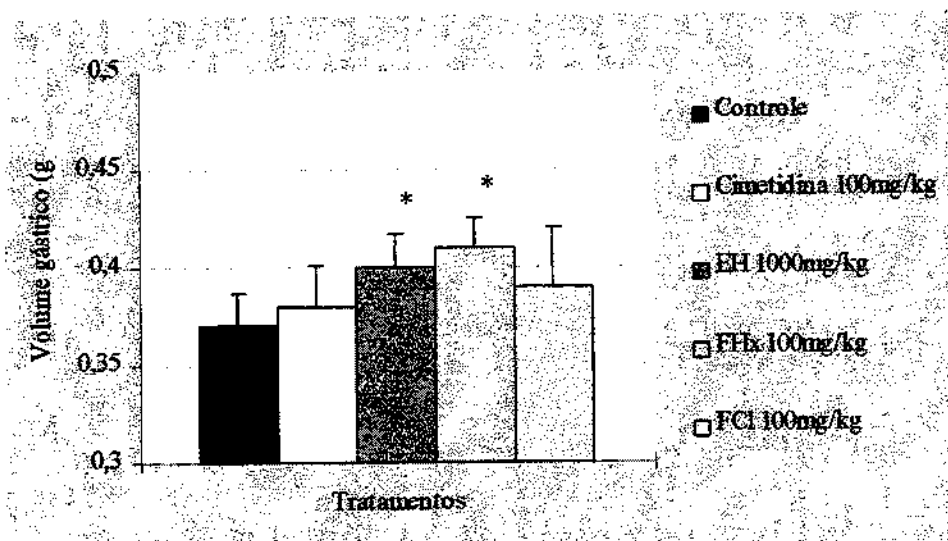


Figura 10: Conteúdo gástrico (g) de camundongos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EH 90 %, FCl e FHx de *N. lobata*, por via intraduodenal. (n = 7). ANOVA $F_{(4,30)} = 3.92$, $p < 0.05$; Teste de Dunnett * $p < 0.05$.

A análise dos resultados revelaram que cimetidina, EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata* aumentaram significativamente o pH do conteúdo gástrico. O EH 90 % foi a amostra que apresentou alteração de pH mais próxima daquela alcançada pela cimetidina. Em relação à secreção do ácido gástrico, todas as amostras mostraram-se eficazes em reduzir significativamente a concentração de íons H^+ ionizáveis, apresentando praticamente os mesmos resultados obtidos pela cimetidina. Finalmente, o EH 90 % e, principalmente, FHx foram eficazes em aumentar significativamente a quantidade do conteúdo gástrico. FCl e cimetidina não produziram efeito significativo sobre este último parâmetro analisado.

4.11. MECANISMO DE AÇÃO ANALGÉSICO E ANTIULCEROGÊNICO DAS FRAÇÕES ATIVAS DE *N. LOBATA*.

4.11.1. Antagonismo aos receptores opióides

Os resultados obtidos pelo EH 90 % (1000 mg/kg), FHx e FCl (100 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético após o pré-tratamento dos animais com o antagonista opióide naloxona (5 mg/kg), na ausência (Tween 80) e na presença de substâncias analgésica, (morfina 10 mg/kg), estão expressos na figura 11. Os resultados são a média $\pm$ d. p. da média do número de contorções obtidos para cada amostra, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle, entre o 6° e o 21° min de observação, após a administração do ácido.

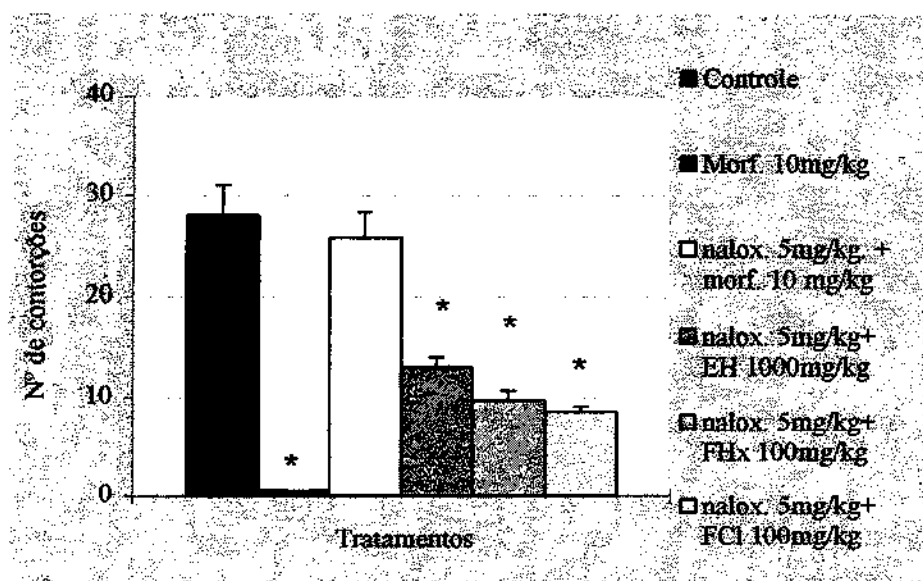


Figura 11: Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos pré-tratados com naloxona, após tratamento com EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata*. (n = 10). ANOVA: $F_{(5,42)} = 225.16$ ($p < 0,05$); Teste de Dunnett $*p < 0.001$.

Somente o grupo tratado com morfina foi antagonizado pela naloxona. A analgesia produzida pelo tratamento dos animais com EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata* não foi significativamente abolida pelo pré-tratamento com naloxona. As porcentagens de inibição alcançadas por FHx (65 %) ou FCl (70 %), foram praticamente as mesmas obtidas no experimento realizado anteriormente, sem o pré-tratamento com o antagonista opióide.

4.11.2. Determinação da atividade antiedematogênica

Os resultados obtidos após o pré-tratamento dos animais com FHx e FCl (100 mg/kg) de *N. lobata* no teste de edema de pata induzido pela carragenina 1% estão expressos na figura 12, na forma da média $\pm$ d.p. da média, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle. Os resultados apresentados são as diferenças dos pesos das patas com edema e aquelas que receberam salina 0,9 % estéril.

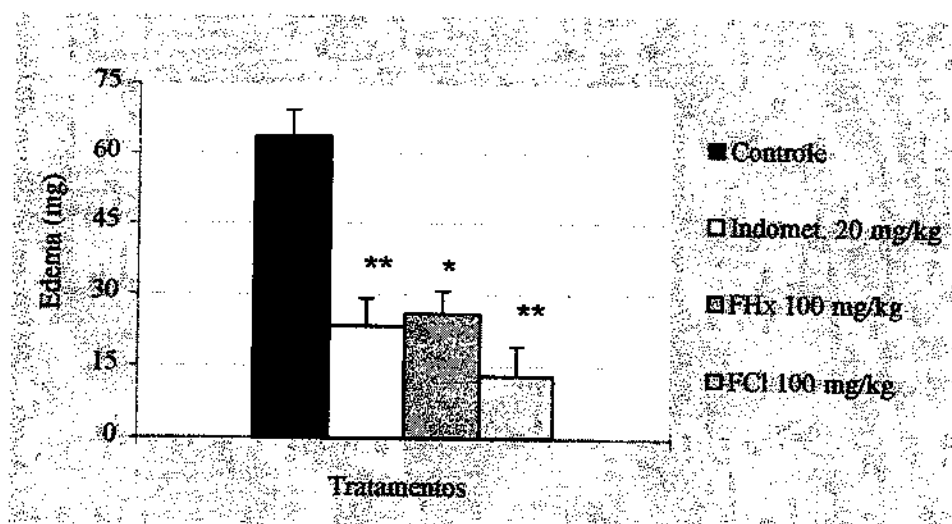


Figura 12: Edema de pata induzido por carragenina em camundongos pré-tratados com FHx e FCI de *N. lobata*. (n = 7). ANOVA $F_{(3,24)} = 12.61$ ($p < 0,05$);

Teste de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

A atividade antiedematogênica mostrou-se pronunciada sobretudo na fração FCI que apresentou inibição de 68 % sobre o edema; resultado semelhante foi obtido pela indometacina (63 %). FHx demonstrou também, significativa atividade, porém, com porcentagem de inibição em torno de 40 %. O(s) princípio(s) ativo(s) responsável(veis) por esta atividade concentrou(ram)-se mais em FCI do que em FHx.

4.11.3. Determinação de pg's na mucosa gástrica

Foram utilizados neste experimento grupos de ratos tratados com indometacina, salina 0,9 %, Tween 80 (controle negativo do veículo), FHx e FCI (100 mg/kg) de *N. lobata*. Os resultados estão expressos na figura 13 na forma da média $\pm$ e.p. da média, da quantidade de PG's liberadas e/ou sintetizadas por grama de tecido pesado, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

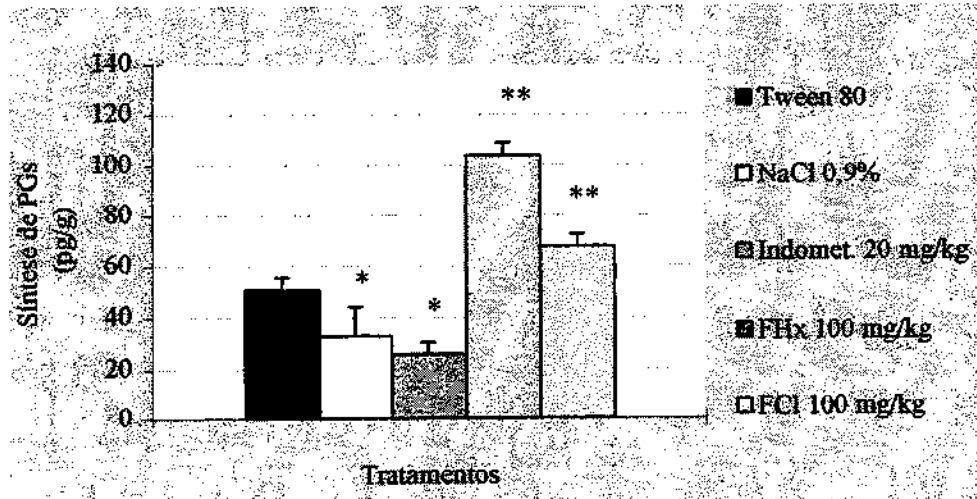


Figura 13: Síntese e/ou liberação de PG's na mucosa gástrica de ratos pré-tratados com FHx e FCl de *N. lobata*. (n = 8-10). ANOVA: $F_{(4,39)} = 6,94$ ($p < 0,05$); Teste de Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Foi possível observar que FHx e FCl de *N. lobata* aumentaram significativamente a síntese e/ou liberação de PG's na mucosa gástrica de ratos. FHx proporcionou um aumento de 103 %, enquanto que FCl obteve, apenas, aumento de 33 %. Os grupos tratados com salina e indometacina apresentaram quantidades significativamente menores de PG's na mucosa gástrica, 35 e 50 %, respectivamente, em relação ao controle negativo. O(s) princípio(s) ativo(s) responsável(veis) pelo aumento na síntese e/ou liberação de PG's está(ão) mais concentrado(s) na FHx de *N. lobata*.

4.11.4. Determinação de muco livre no conteúdo gástrico

Utilizaram-se neste experimento grupos de camundongos tratados com indometacina, cimetidina, Tween 80 (controle negativo do veículo), FHx e FCl (100 mg/kg) de *N. lobata*. Os resultados obtidos estão expressos na figura 14 na forma da média $\pm$ e.p. da média da quantidade de muco ligado ao "alcian blue" por grama de tecido pesado, em relação aos resultados obtidos para o grupo controle. A tabela 2 apresenta, além das

porcentagens de aumento ou inibição do muco livre, as alterações bioquímicas determinadas para cada uma das amostras sobre os parâmetros do conteúdo gástrico.

Tabela 2: Porcentagens de muco livre ligado ao “alcian blue” e alterações no pH e volume do conteúdo gástrico de camundongos tratados com FHx e FCI de *N. lobata* por via intraduodenal, após ligadura do piloro.

Tratamento	Dose (mg/kg)	N	pH	Volume (mg)	% de Muco Ligado
Tween 80	10	14	$3,1 \pm 0,74$	496 ± 122	-
Indometacina	20	12	$2,25 \pm 0,73$	417 ± 41	- 8,0
Cimetidina	100	6	$4,66 \pm 0,52^{**}$	399 ± 103	21,5
FHx	100	6	$4,58 \pm 0,92^{**}$	$810 \pm 81^{**}$	53,8
FCI	100	6	$4,17 \pm 0,41^{*}$	447 ± 43	3,7

ANOVA: $p < 0,05$; pH $F_{(4,39)} = 16,91$; conteúdo gástrico $F_{(4,39)} = 20,61$; Teste de Dunnett:
 $*p < 0,05$; $**p < 0,001$

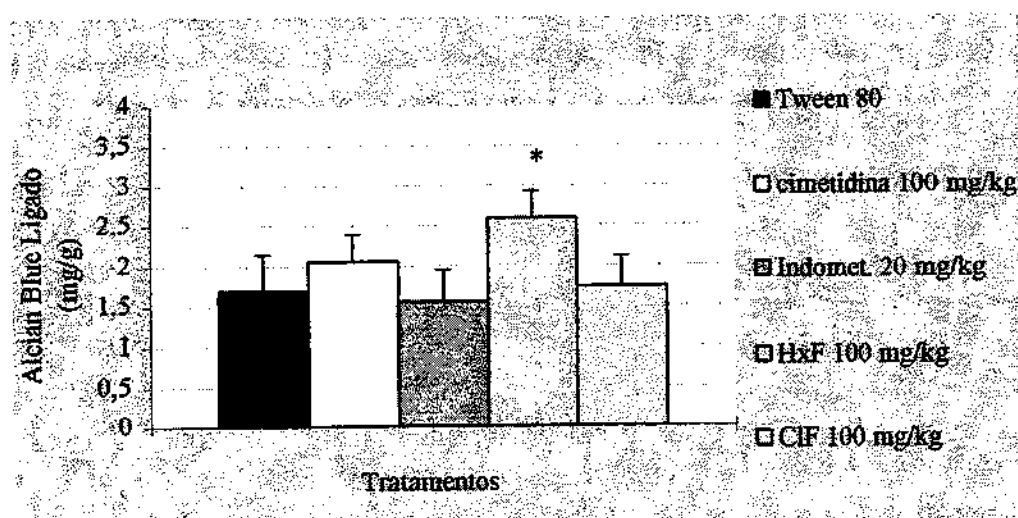


Figura 14: Quantidade de muco livre no conteúdo gástrico de camundongos tratados com FHx e FCI de *N. lobata*, por via intraduodenal, após ligadura do piloro (n = 6-14). ANOVA: $p < 0,05$; $F_{(4,39)} = 6,94$. Teste de Dunnett: $*p < 0,01$.

Foi possível observar que, em especial, FHx de *N. lobata* aumentou significativamente a quantidade de muco livre no conteúdo gástrico, aumento este, superior a 50 %. A cimetidina obteve resultado inferior à metade daquele obtido por FHx. A FCI não foi efetiva em alterar significativamente este parâmetro. Vale ressaltar ainda que FHx aumentou significativamente o pH e a quantidade do conteúdo gástrico como já havia acontecido no experimento de ligadura de piloro, anteriormente descrito.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A extração e o fracionamento das folhas de *N. lobata*, bem como os experimentos realizados inicialmente tiveram como objetivo confirmar a indicação popular da espécie para o tratamento de úlceras em geral e dor, possibilitando direcionar o futuro processo de extração e fracionamento para um melhor rendimento e concentração dos princípios ativos presentes no vegetal. Nesta primeira etapa, foram administrados aos animais o EH 70 % e as frações FAc e FAq, sempre na dose de 1000 mg/kg, por via oral.

No modelo de úlcera induzida por indometacina, tanto EH 70 % quanto FAc inibiram, de modo significativo, o aparecimento das lesões, com índice de inibição semelhante aos alcançados pela droga padrão cimetidina. O mesmo não aconteceu quando as lesões ulcerativas foram induzidas por etanol, em que somente o EH 70 % apresentou significativa inibição do ILU, sendo estes superiores àqueles obtidos pela droga padrão omeprazol.

No experimento de algesia induzida por ácido acético em camundongos, foi possível observar uma redução do número de contorções abdominais nos animais tratados com EH 70 %, FAc e dipirona; porém, somente as inibições obtidas pela FAc e dipirona foram estatisticamente significativas. Os resultados obtidos nestes experimentos sugeriram, inicialmente, que o EH 70% e a FAc de *N. lobata* apresentam atividade analgésica e antiulcerogênica. Os efeitos, analgésico e antiulcerogênico (apesar de inespecíficos) demonstrados inicialmente, confirmaram previamente a indicação popular de *N. lobata* no tratamento de problemas estomacais e dor, justificando a continuidade dos estudos relacionados às atividades indicadas popularmente para esta espécie.

Apesar da partição com acetato de etila levar o(s) princípio(s) ativo(s), esta não foi eficiente em aumentar os efeitos obtidos pelo EH 70 %, ambos utilizados na dose de 1000 mg/kg. A fração aquosa (FAq), não demonstrou nenhuma atividade nos experimentos realizados, descartando a possibilidade de o(s) princípio(s) ativo(s) relacionados a estas atividades possuírem caráter polar.

Assim, foi realizado um segundo fracionamento, obtendo-se o EH 90 % e duas outras frações orgânicas apolares, uma em partição com hexano (FHx) e outra em partição com clorofórmio (FCl). O EH 90% foi sempre utilizado na dose de 1000 mg/kg e as frações na dose de 100 mg/kg, administradas sempre por via oral, com exceção do experimento de

ligadura de piloro, em que as mesmas foram administradas por via intraduodenal. A atividade analgésica das amostras obtidas a partir das folhas de *N. lobata* foi investigada novamente, utilizando-se métodos de indução química (contorções abdominais induzidas por ácido acético) e térmica (teste da placa quente ou “hot-plate”), para indução de dor, segundo postulado por Trentin, Santos, Miguel, Pizzolatti, Yunes, Calixto (1996).

As contorções abdominais induzidas pelo ácido acético têm sido utilizadas para acessar o potencial analgésico inespecífico de drogas. Collier *et al.* (1968) descreveram que o ácido acético atua indiretamente, pela liberação de mediadores endógenos, os quais estimulariam neurônios nociceptivos que, por sua vez, apresentam sensibilidade para antiinflamatórios não esteroidais, para narcóticos e outras drogas que atuariam centralmente (MIGUEL, CALIXTO, SANTOS, MESSANA, FERRARI, CECHINEL FILHO, PIZZOLATTI, YUNES, 1996; VAZ, CECHINEL, YUNES, 1996).

O EH 90 %, FHx e FCI de *N. lobata* produziram inibição significativa no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Estes resultados confirmaram a atividade antinociceptiva das amostras vegetais de *N. lobata*, embora seja ainda inespecífica. Vale ressaltar que as porcentagens de inibição apresentadas pela FCI (62%) e FHx (60%) foram obtidas com a metade da dose (100 mg/kg) usada para a dipirona (200 mg/kg) que, neste modelo, produziu uma inibição de 95%.

Embora o teste da placa quente seja utilizado comumente para determinação de analgésicos do tipo narcótico, outras drogas de ação central incluindo sedativos, relaxantes musculares ou psicomiméticos, tem demonstrado atividade neste teste (EDDY & LEIMBACK, 1953; VAZ *et al.*, 1996). Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que a administração de FHx e FCI, mas não o EH 90 % de *N. lobata*, aumentaram significativamente a latência para a sensação dolorosa ao estímulo térmico em camundongos.

Estes resultados demonstraram clara atividade antinociceptiva das frações, no modelo de indução térmica da dor. Devemos considerar também que, apesar das novas frações utilizadas serem ainda semipurificadas, estas foram administradas em dose 10 vezes menores (100 mg/kg) do que aquelas utilizadas para as frações obtidas inicialmente (1000 mg/kg).

Para dar continuidade aos estudos relacionados à atividade analgésica da espécie, levou-se em consideração a utilização da planta, por algumas populações, para o tratamento da dor relacionada ao câncer (FRANÇOIS *et al.*, 1995; PASRREITER 1995) e os resultados obtidos no teste da placa quente. Estes dois fatos, analisados em conjunto, sugeriram uma possível atividade dos constituintes da planta no S.N.C, a qual poderia estar relacionada com atividade em receptores opióides. Foi investigado então um possível envolvimento das substâncias presentes no EH 90 % e suas frações, FHx e FCl, com esta classe de receptores.

Para a realização do experimento, os animais foram pré-tratados com o antagonista opióide não seletivo (naloxona) que, em alguns modelos experimentais, atua antagonizando a ação de substâncias opióides endógenas que modulam a sensação de dor (FADEN, 1988).

Os resultados obtidos indicaram que a naloxona não foi capaz de reverter a ação analgésica das amostras vegetais no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético; no entanto, o efeito analgésico da droga-padrão (morfina) foi significativamente revertido pelo antagonista utilizado. Assim, as frações orgânicas e o EH 90 % obtidos das folhas de *N. lobata* não exerceriam efeito analgésico por causa de uma interação com receptores opióides.

Em virtude destes resultados, sugeriu-se, então, que a atividade analgésica apresentada pelas frações do EH 90 % de *N. lobata* pudesse estar relacionada, de alguma forma, à inibição da dor de origem inflamatória ou ao menos de algum dos sinais cardinais que acompanham este processo, e que podem resultar em dor.

Dentre os métodos que permitem detectar modificações nos sinais cardinais da inflamação estão os modelos de edema de pata de rato (WINTER, RISLEY, NUSS, 1962) ou camundongo (HENRIQUES *et al.*, 1987) induzidos por diversos agentes como a dextrana, formalina ou caulim; entretanto, o agente edematogênico mais utilizado é a carragenina (DI ROSA, 1972). Tanto o edema induzido pela carragenina, quanto aquele induzido pela dextrana, podem detectar atividade farmacológica antiinflamatória do tipo não esteroideal, além de agentes anti-histamínicos e anti-serotoninérgicos.

O pré-tratamento de camundongos com FHx, mas principalmente com FCI, reduziu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina. Estes resultados confirmaram que o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) pela atividade analgésica está(ão) relacionado(s) à inibição de um dos principais sinais cardinais da inflamação, o edema e, conseqüentemente à dor a ele associada. O fracionamento empregado, apesar de não ter separado o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) por esta atividade, parece concentrar o(s) mesmo(s) na FCI de *N. lobata*.

Este resultado, contudo, poderia estar relacionado à inibição da síntese de PG's endógenas e(ou) outros mediadores responsáveis pela inflamação como por exemplo a histamina, bradicinina ou 5-HT (POPPER & WATNICK, 1974).

O exato mecanismo de ação analgésico apresentado pelo EH 90 %, FHx e FCI de *N. lobata* não pode ainda ser determinado mediante estes resultados, em razão da complexidade dos processos que causam dor. No entanto, o resultado obtido no experimento de edema de pata induzido pela carragenina sugere que o efeito analgésico mencionado pela população, estaria relacionado à diminuição do edema no local de lesões, com conseqüente diminuição na dor. O uso popular da espécie, na dor relacionada ao câncer, não foi, à luz dos nossos resultados e nas nossas condições experimentais, justificado até o momento.

O estudo da atividade antiulcerogênica da planta foi baseado na utilização das amostras em diferentes modelos de indução de úlcera gástrica em animais, os quais atuam por diferentes mecanismos.

As úlceras causadas por um agente irritante como o etanol aparecem devido à sua ação necrotizante na mucosa gástrica, com menor participação da secreção gástrica (LEWIS & HANSON, 1991; EVANS, 1996). A ligadura do piloro altera o perfil fisiológico da liberação de alguns mediadores da secreção gástrica como a acetilcolina, gastrina e pepsina os quais, por sua vez, induzem a formação de lesões ulcerativas pelo estímulo da secreção do ácido clorídrico que fica acumulado no lúmen do estômago (SHAY, KOMAROV, FELS, MERANZE, GRUENSTEIN, SIPLET, 1945; LEWIS &

HANSON, 1991). Já a indometacina, bem como a maioria das DAINES, atuam, inibindo a síntese de PG's e, conseqüentemente, diminuindo os mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica, mediados por estas substâncias (LEWIS & HANSON, 1991; MORIMOTO *et al.*, 1994; EVANS, 1996). Agentes parassimpatomiméticos atuam, sensibilizando a mucosa gástrica mediante o estímulo da secreção ácida e pepsina, facilitando assim, a irritação gástrica causada pela DAINES (RAINSFORD, 1978). No modelo de úlcera induzida por estresse, as alterações circulatórias na mucosa gástrica desencadeadas pela atividade de neurotransmissores adrenérgicos e o estímulo à secreção ácida pela ação do sistema nervoso autônomo parassimpático têm sido apontados como os principais fatores responsáveis pelo aparecimento das lesões (YANO, AKAHAME, HARADA, 1978; RAFFATULLAH, TARIQ, AL-YAHYA, MOSSA, AGEEL, 1990; EVANS, 1996).

As amostras vegetais EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata* protegeram a mucosa gástrica contra a ação lesiva da solução de um agente irritante moderado da mucosa gástrica (HCl/etanol 60%). Drogas antagonistas de receptores H₂ não inibem as lesões formadas por este tipo de agente; no entanto, substâncias que aumentam as defesas da mucosa gástrica inibem seu desenvolvimento (SOUZA BRITO, RODRIGUEZ, HIRUMA-LIMA, NUNES, 1998). Neste experimento, tanto o EH 90 % quanto FHx e FCl de *N. lobata*, inibiram, significativamente o aparecimento de lesões ulcerativas induzidas pela solução de HCl/etanol.

No modelo de estresse, as amostras vegetais EH 90 % e, principalmente, FHx e FCl de *N. lobata*, inibiram significativamente o aparecimento das lesões ulcerativas. Neste caso, uma atividade anti-secretora importante poderia estar envolvida com o mecanismo pelo qual as amostras inibiram o aparecimento deste tipo de lesão.

Quando um potente inibidor da síntese de PG's (indometacina) foi associado a um agente parassimpatomimético (betanecol) para indução das lesões ulcerativas, ficou claro que os animais pré-tratados com EH 90 %, FHx e FCl de *N. lobata* mantiveram a integridade da mucosa gástrica, visto que as amostras vegetais inibiram, significativamente, o aparecimento das lesões ulcerativas induzidas por esta associação de agentes lesivos.

O método de ligadura de piloro com administração intraduodenal das amostras vegetais foi estabelecido no intuito de verificar a atividade sistêmica das amostras. Esta forma de administração evita um contato direto de partículas do vegetal com a mucosa e suco gástrico como acontece quando as drogas são administradas por via oral; as alterações dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico poderiam simplesmente estar relacionadas a um efeito mecânico das amostras vegetais sobre a mucosa gástrica, ou então, a reações químicas específicas entre o conteúdo gástrico e substâncias presentes nas amostras, tais como neutralização do ácido e ligação com as proteínas da mucosa, entre outras.

Foi possível observar, por meio da administração intraduodenal das amostras vegetais, significativo aumento do pH e do conteúdo gástrico, acompanhados de redução da concentração de íons hidrogênio. Estes resultados, além de confirmarem a propriedade antiulcerogênica da planta, indicaram que o(s) composto(s) ativo(s) presente(s) nas amostras vegetais são absorvidos no intestino e promovem a atividade antiulcerogênica por ação sistêmica dos seus constituintes.

Após analisados os resultados obtidos nos experimentos de indução de úlcera gástrica, principalmente aqueles da ligadura de piloro, foi investigada a possibilidade de que o mecanismo de ação antiulcerogênico pudesse estar relacionado à capacidade das amostras vegetais em aumentar os fatores de proteção da mucosa gástrica contra os diferentes agentes lesivos, ou seja, uma 'atividade citoprotetora'.

Citoproteção (gástrica e intestinal) é definida como a propriedade que muitas PG's apresentam em inibir, nas mucosas do estômago e intestino, os processos inflamatórios e necrotizantes, quando estas mucosas são expostas a agentes nocivos. É sugerido que o aumento na síntese de PG's endógenas seja um fator importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica, devido à manutenção do fluxo sanguíneo na parede gástrica e também a uma atividade anti-secretora, inclusive aquela basal; além disso, é relatado que o aumento de diferentes formas de PG's, principalmente a PGE₂, leva ao aumento na produção de muco e bicarbonato pela mucosa gástrica formando uma barreira 'citoprotetora' (ROBERT, NEZAMIS, LANCASTER, HANCHAR, 1979).

Ao contrário, a redução na quantidade de muco da parede gástrica contribui acentuadamente para o desenvolvimento de lesões relacionadas ao aumento da secreção ácida (estresse) e ao etanol (SOUZA BRITO *et al.*, 1998).

Para determinação da hipótese de que as amostras vegetais de *N. lobata* alterariam a fisiologia gástrica na presença de agentes irritantes da mucosa, provavelmente elevando os mecanismos de defesa do estômago, como o aumento da síntese de PG's endógenas e o aumento na produção de muco e bicarbonato pelas células da parede gástrica, realizaram-se experimentos relacionados a estas atividades.

Os resultados obtidos no experimento que determina o aumento na síntese ou liberação de PG's na mucosa gástrica demonstraram que FCl, mas, principalmente FHx, de *N. lobata*, aumentaram significativamente o parâmetro analisado. Estes dados permitiram também confirmar que o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) por esta atividade, encontra(m)-se mais concentrado(s) em FHx do que em FCl, obtidas do EH 90 % das folhas de *N. lobata*.

Além disso, segundo Lichtenberg (1995), a maior parte das drogas que aumentam a síntese de PG's aumentam também a produção de muco e bicarbonato na parede gástrica e podem ainda modular a secreção do ácido gástrico.

É sabido que o muco encontrado na parede gástrica consiste-se de glicoproteínas semelhantes às mucinas, as quais podem ser detectadas pela ligação ao corante "alcian blue". Apesar de ter a mesma origem, o muco pode ser encontrado em duas formas distintas; uma aderida à mucosa gástrica e outra desprendida no lúmen gástrico, denominado muco solúvel ou muco livre. O muco livre é mais frequentemente determinado experimentalmente e seu aumento, mesmo sem ter um papel fisiológico importante, indica que o muco da barreira mucosa também está aumentado (BOLTON *et al.*, 1978).

A amostra FHx de *N. lobata* aumentou significativamente a quantidade de muco livre no conteúdo gástrico, indicando, por consequência, um aumento do muco que recobre o epitélio gástrico. Desta forma, FHx produz o efeito antiulcerogênico provavelmente por aumentar a síntese e(ou) liberação de PG's acompanhado por aumento na produção de muco

pelo epitélio gástrico. Estes mecanismos, podem ainda, estar associados à diminuição da secreção gástrica do ácido clorídrico, a qual não foi inteiramente até aqui estudada.

Drogas sintéticas, apresentando ambas propriedades, citoprotetora e anti-secretória, são raramente descritas. Recentemente alguns polissacarídeos descritos por Sun *et al.* (1991) e uma sesquiterpenolactona obtida da planta *Croton cajucara* (SOUZA BRITO *et al.*, 1998) foram descritos com ambas atividades. FHx de *N. lobata* pode apresentar algum(s) componente(s) com este tipo de atividade.

No entanto, a possível atividade anti-secretória proporcionada pela amostra precisa ser melhor avaliada. A diminuição dos íons H^+ demonstrada na titulação e a alcalinização do pH gástrico apresentados no experimento de ligadura de piloro poderiam, a princípio, estar relacionada ao aumento da síntese de PG's, ao antagonismo de receptores histamínicos do tipo H_2 , a receptores muscarínicos do tipo M_3 ou ainda à inibição da bomba H^+/K^+ ATPase.

Uma outra possibilidade é que a alcalinização do meio e a diminuição dos íons H^+ poderia ocorrer devido a um efeito da neutralização dos íons H^+ em virtude do aumento do volume do conteúdo gástrico que, por sua vez, poderia apresentar grandes quantidades de proteínas, bicarbonato e até mesmo íons carbonato livres. É razoável supor que, nestas condições, haveria formação de bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio, dependendo das quantidades de Na^+ ou K^+ presentes nesta solução. Esta é uma hipótese química que explicaria a diminuição na quantidade de íons H^+ ionizáveis, os quais são detectados pela titulação com NaOH, evidenciando assim uma possível inexistência de atividade anti-secretória das amostras em questão. Neste caso, a planta seria responsável somente pela atividade 'citoprotetora', observada.

Contudo, o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) pelos efeitos antiulcerogênico e analgésico demonstrados pelas frações de *N. lobata* não é(são) ainda conhecido(s), mas certamente não é (são) o(s) mesmo(s). No entanto, as atividades apresentadas pelo extrato bruto e frações de *N. lobata* podem estar relacionadas à presença de qualquer um dos compostos identificados nesta espécie, ou seja, terpenóides,

sesquiterpenolactonas, flavonóides derivados da quercetagenina, alcalóides (GERMOSÉN-ROBINEAU, 1995) ou a alguma outra substância química ainda não identificada na espécie.

6. CONCLUSÃO

A administração em dose única, via oral, dos extratos brutos hidroalcoólicos obtidos das folhas de *Neurolaena lobata* não demonstram sinais de toxicidade em camundongos.

O significativo efeito antiulcerogênico das amostras de *N. lobata* ocorre, principalmente, por elevar os mecanismos de defesa do estômago, induzindo a síntese e(ou) liberação de PG's na mucosa gástrica e também pelo aumento da produção de muco pelas células do epitélio gástrico.

A atividade analgésica está provavelmente relacionada a um efeito farmacológico periférico do(s) composto(s) presente(s) nas amostras vegetais, inibindo a dor de origem inflamatória, provavelmente, pela interação com mediadores endógenos responsáveis pela inflamação.

As atividades farmacológicas demonstradas pelas amostras ocorrem pela ação sistêmica do(s) seu(s) princípio(s) ativo(s).

Os princípios ativos responsáveis por estas atividades não são os mesmos, e certamente tem caráter apolar.

A baixa toxicidade demonstrada em experimentos '*in VIVO*' e os resultados obtidos nos experimentos realizados, analisados juntamente, comprovam que a utilização popular da espécie *N. lobata* para o tratamento da dor de origem inflamatória e de úlceras gástricas em geral é, até certo ponto, segura e eficiente.

7. SUMMARY

Neurolaena lobata is a herbaceous plant belonging to the family Compositae-Asteraceae which is found in countries with tropical and subtropical climate, including northern Brazil. This plant is used in Caribbean folk medicine for the treatment of gastric ulcers and pain. The acute toxicologic effects of the 70% and 90% HE of *N. lobata* leaves were studied on mice and no death or sign of toxicity was observed at doses higher than 5000 mg/kg administered orally to the animals. The 70% HE was fractionated and two fractions were obtained, and aqueous one (AqF) and a partition fraction with ethyl acetate (AcF). The 70% HE inhibited by 64% the ulcerative lesion index in experiments in which the lesions were induced with ethanol in rats. In ulcers induced with indomethacin in rats, the 70% HE, AcF and AqF inhibited the lesions by 60, 70 and 27%, respectively. In the pain test, the preparations inhibited the abdominal writhes induced by acetic acid in mice by 45, 67 and 4%, respectively. Two new fractions were obtained from the 90% HE, one partitioned with hexane (HxF) and one partitioned with chloroform (ClF). The 90% EH, HxF and ClF respectively inhibited by 77, 86 and 83% the lesions induced by HCl/ethanol, by 48, 70 and 52% the lesions induced by stress, and by 40, 57 and 51% the lesions induced with indomethacin and betanecol in mice. The 90% EH, HxF and ClF respectively increased the pH of the gastric content from 3.8 (control) to 6.0, 5.5 and 5.0, and the gastric content from 370 (control) to 380, 400 and 410 mg, and reduced the amount of ionizable H^+ ions of the gastric content from 9.9 (control) to 4.8, 4.6 and 6.1 mEq/ml. HxF and ClF respectively increased PG synthesis in the gastric mucosa of rats by 104 and 38%, and free mucus in the gastric content of mice by 54 and 4%. Thus, the antiulcerogenic mechanism of these substances seems to be involved in an increase of the defense mechanisms of the gastric mucosa such as production of prostaglandins and mucus. The antinociceptive activity of 90% EH, HxF and ClF was evaluated in experiments of chemical and thermal pain induction. The substances inhibited the abdominal writhes induced by acetic acid by 62, 47 and 60%, respectively. In the hot plate test, only HxF and ClF were effective in increasing the latency times of the animals. The analgesic effects of 90% EH, HxF and ClF were not abolished by the opioid antagonist naloxone, ruling out an involvement of these preparations with these receptors. On the other hand, HxF and ClF inhibited the paw edema induced by carrageenin by 43 and 58%, respectively. These results demonstrate that HxF and mainly ClF have antinociceptive activity related to pain of inflammatory origin. The

low toxicity observed in *in vivo* experiments and the data obtained, analyzed as a whole, justify the popular indication of the species for the treatment of gastric ulcer and pain.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPER, J. Ulceras as an infectious disease. **Science**, 260(9):159-160, 1993.
- BACCHI, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar* - org. Luis Cláudio Di Stasi., Editora da Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 1996, p.169-186.
- BARON, J.H.; BARR, J.; BATTEN, J.; SIDEBOTHAM, R.; SPENSER, J. Acid, pepsin and mucus secretion in patients with gastric and duodenal ulcer before and after colloidal bismuth subcitrate. **Gut**. 27:486-490, 1986.
- BARROWMAN, J.A.; PFEIFFER, C.J. Carbenoxolone: A critical analysis of its clinical value in peptic ulcer. In: *Drugs and Peptic Ulcer*, Vol 1. ed. by C.J. Pfeiffer. CRC Press, Boca Raton, Fla., 1982. pp. 123-132.
- BIANCHI PORRO, G.; PARENTE, F.; LAZZARONI, M.; PACE, F. Colloidal bismuth subcitrate and two different dosages of cimetidine in the treatment of resistant duodenal ulcer. **Scand. J. Gastroenterol.** 21(122):39-41, 1986.
- BLACK, J. W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, C.J.; GANELLIN, C.R.; PARSONS, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. **Nature**, 236:385-390, 1972.
- BOHLMANN, F.; NATU, A. A.; KERR, K. Thymol derivatives aus *Neurolaena artem.*. **Phytochemistry** 18:489-490, 1979.
- BOLTON, J.P.; PALMER, D.; COHEN, M. Stimulation of Mucus and Nonparietal Cell Secretion By the E2 Prostaglandins. **Digest. Diseases** 23:359-364, 1978.
- BORGES-DEL-CASTILLO, J.; MANRESA-FERRERO, M. T.; RODRÍGUEZ-LUIS, F.; VÁSQUEZ-BUENO, P. Panamá flora II. New sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. **J. Nat. Prod.** 45 (6):762-765, 1972.
- BRANDÃO, M.L. Dores crônicas. In: *Neurobiologia das doenças mentais*, Graeff, F.G., Brandão, M.L. eds., 2ª edição, Lemos. 1993, p. 145-159.

- BROGDEN, R.N.; CARMINE, A.A.; HEEL, R.C. Domperidone: a review of its pharmacological activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the symptomatic treatment of chronic dyspepsia and as an antiemetic. **Drugs**, **24**:36-40, 1982.
- CASPARY, W.F. Measurement of intragastric potential difference. In: __ *Antiacids in the eighties*. Ed. by F. Halter, Urban and Schwarzenberg, Munich. 1982, p. 64-69.
- COLLIER, H. O. J.; DINNEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** **32**:295-310, 1968.
- CURTIS, G.H.; MACNAUGHTON, W.K.; GALL, D.G.; WALLACE, J.L. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Can.J.Physiol.Pharmacol.** **73**:130-134, 1995.
- D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **72**:74-79, 1941.
- DAYAL, Y.; DELELLIS, R.A. Trato Gastrointestinal - Úlceras Pépticas. In: __ *Patologia Estrutural e Funcional*. Ed. by R. S. Cotran, V. Kumar and Robbins, S. L. Ed. Guanabara Koogan, 4ª ed., Rio de Janeiro. 1991, p. 698-701.
- DI ROSA, M. Biological properties of carragenin. **J. Pharm. Pharmac.** **24**:89-102, 1972.
- DI STASI, L.C. Arte, Ciência e Magia. In: __ *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. Luis Cláudio Di Stasi organizador, Editora da Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 1996, p.15-22.
- DOCKRAY, G.J.; VARRO, A.; DIMALINE, R. Gastric endocrine cells: gene expression, processing and targeting of active products. **Physiol. Reviews**, **76** (3):767-798, 1996.
- EBERHART, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterol.** **109**:285-301, 1995.

- EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **107**:385-393, 1953.
- EHLERT, F.J.; GRIFFIN, M.T.; SAWYER, G.W.; BAILON, R. A simple method for estimation of agonist activity at receptor subtypes: comparison of native and cloned M3 muscarinic receptors in guinea pig ileum and transfected cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **289**(2):981-92, 1999.
- ELDER, J.B. Recent experimental and clinical studies on the pharmacology of colloidal bismuth subcitrate. **Scand. J. Gastroenterol.** **21**(122):14-16, 1986.
- ELIZABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: The Brazilian perspective. **J. Ethnopharmacol.** **51**:11-120, 1996.
- EVANS, F. The Gastro-intestinal Tract. In: __Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Ed. E. M. Williamson, D. T. Okpako and F. J. Evans. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester. 1996, p. 25-45.
- FADEN, A. I. Role of thyrotropin-releasing hormone and opiate receptor antagonists in limiting central nervous system injury. **Adv. Neurol.** **47**:531-546, 1988.
- FALUS, A.; MERETÉY, K. Histamine and early messenger in inflammatory and immune reactions. **Immunol Today.** **13**:154-156, 1992.
- FORTE, J.G. Gastrointestinal Physiology. **Annu. Rev. Physiol.** **48**:73, 1986.
- FRANÇOIS, G.; CLAUS, M. P.; HERMAN, J. W.; MARLEEN V. L. Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. **Planta. Medica.** **62**:126-129, 1995.
- GERMONSÉN-ROBINEAU, L. Investigación científica y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. *Farmacopea Caribeña*. ed. Enda-Caribe, Tramil-7. 1995, p. 420-424.

- GISLASON, H.; SORBYE, H.; ABDI-DEZFULI, F.; WALDUM, H.L.; SVANES K. Role of prostaglandins and histamine in hiperemic response to superficial and deep gastric mucosal injury and H⁺ back-diffusion in cats. **Dig. Dis. Scie.** 40(8):1669-1678, 1995.
- GUTH, P.H., PAULSEN, G; NAGATA, H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. **Gastroenterol.** 87:1083-1090, 1984.
- HALUSHKA, P.V.; CAMPBELL, W.B. Lipid-derived autacoids - Eicosanoids and Platelet-Activating Factor. *In: Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth ed.; Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B, Ruddon, R.W. and Gilman, A.G. eds. McGraw Hill. 1996, p.601-616.
- HAYDEN, L.J.; THOMAS, G.; WEST, G.B. Inhibitors of gastric lesions in the rat. **J. Pharm. Pharmac.** 30: 244-246, 1978.
- HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S.B. PAF-induced oedema in mice. **Brazilian J. of Med. Biol. Res.** 20:243-249, 1987.
- HIRSCHOWITZ, B.I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K.; WALLMARK, B.; SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Dig. Dis. Sci.** 40: 2 (Supplement):3S-23S, 1995.
- HOGABOAM, C.M.; BISSONNETTE, E.Y.; CHIN, B.; BEFUS, A.D.; ALLACE, J.L. Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from mast cells. **Gastroenterol.** 104:122-129, 1993.
- JAKUPOVIC, J.; MISRA, L. N.; CHAU THI, T. V.; BOHLMANN, F.; CASTRO, V. Cuathemone derivatives from *Tessaria integrifolia* and *Pluchea synphytifolia*. **Phytochemistry** 24:3053-3055, 1985.
- JENSEN, D.M. Health and aspects of peptic ulcer disease. **The Am. J. of Med.** 77(Suppl 5B):8-14, 1984.

- JESSEL, T.M.; KELLY, D.D. Pain and Analgesia. In: __Principles of Neural Science - 3rd ed., Kandell, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. eds., Elsevier. 1991, p. 385-399.
- KAPLAN, M.A.C.; GOTTLIEB, O R. Busca racional de princípios ativos em plantas. **Interciência**. **15** (1):26-29, 1990.
- KATSURA, Y.; NISHINO, S.; TAKASUGI, H. Studies on antiulcer drugs. I. Synthesis and antiulcer activities of imidazo [1,2-a]pyridinyl-2-oxobenzoxazolidines-3-oxo-2H-1,4-benzoxazines and related compounds. **Chem. Pharm. Bull.** **39** (11):2937-2943, 1991.
- KERR, K. M.; MABRY, T. J.; YOSER, S. 6-Hydroxy and 6-methoxyflavonoids from *N. lobata* and *N. macrocephala*. **Phytochemistry** **20** (4):791-794, 1981.
- KHAN, R.; JARVIS, C. E. The correct name for the plant known as *Pluchea symphytifolia* (Miller) Gillis (Asteraceae). **Taxon**. **38**:659-663, 1989.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** **18**:418-420, 1959.
- KURATA, J.H. Ulcer epidemiology: An overview and proposed research framework. **Gastroenterol.** 569-580, 1989.
- KUTCHAI, H.C. Gastrointestinal secretions. In: __*Principles of Physiology*. Ed. by R. M. Berne and M. N. Levy, 2nd Edition, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, Missouri. 1996, p. 516-589.
- LAM-SK. A etiological Factors of peptic ulcer: perspectives of epidemiological observations this century. **J-Gastroenterol-Hepatol.** **9** (Suppl 1):S93-98, 1994.
- LEVINE, R. J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: __Peptic Ulcer. Ed. C.J. Pfeiffer. Munksgaard, Copenhagen. 1971 p. 92-97.
- LEWIS, D.A; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In __*Progress Medicinal Chemistry*. Ed. by G. P. Ellis and G. B. West, Elsevier Science Publishers. **28**:201-231, 1991.

- LICHTENBERGER, L.M. The hydrophobic Barrier properties of gastrointestinal mucus. **Annu. Rev. Physiol.** 57:565-583, 1995.
- LIND, T.; CEDERBERG, C.; EKENVED, G.; HAGLAND, U.; OLBE, L. Effect of omeprazole (a gastric proton pump inhibitor) on pentagastrin stimulated acid secretion in man. **Gut.** 24:270-276, 1983.
- MAKINO, M.; KOGA, T.; ITO, K.; KAWADA, H.; TABATA, K. Delayed healing of chronic gastric ulcer after *Helicobacter pylori* infection in mice. **J. Pharm. Pharmacol.** 50:943-948, 1998.
- MANCHAND, P. S.; BLOUNT, J. F. Stereostructure of neurolelin A and B, novel germacranolide sesquiterpenes from *Neurolaena lobata*. **J. Org. Chem.** 43(22):4352-4354, 1978
- MARKENSON, J.A. Mechanisms of chronic pain. **The American J. Med.** 101 (Suppl. 1A):1A-7S, 1996.
- MCINTOSH, J.H.; BYTH, K.; PIPER, D.W. Causes of death amongst a population of gastric ulcer patients in New South Wales, Australia. **Scand. J. Gastroenterol.** 26:806-811, 1991.
- MIGUEL, O. G.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; CECHINEL FILHO, V.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geranin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. **Planta. Medica.** 62:146-149, 1996.
- MIZUI, T.; DOUTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Jap. J. Pharmacol.** 33:939-945, 1983.
- MONCADQ, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. H. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.** 43:109-142, 1991.

- MONK, J.P.; CLISSOLD, S.P. Misoprostol: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. **Drugs**. **33**:1-30, 1987.
- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive Factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japan. J. of Pharmacology**. **57**:495-505, 1991.
- PASRREITER, C. M. Sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. **Phytochemistry**. **39**:133-137, 1995.
- PETERSEN, H.; KRISTENSEN, P.; JOHANNESSEN, T.; KLEVELAND, P.M.; DYBDAHL, J.H.; MYRVOLD, H. The natural course of peptic ulcer disease and its predictors. **Scand-J-Gastroenterol**. **30**:17-24, 1995.
- POPPER, T.L; WATNICK, A.S. In: __Antiinflammatory agents: Chemistry and pharmacology. Academic Press, London, Eds. R.A. Scherrer and M. Whitehouse. 1974, Vol.I, p.245-290.
- POWELL, J.R.; DONN, K.H. Histamine H₂-antagonist drug interactions in perspective: mechanistic concepts and clinical implications. **Am. J. Med**. **7(5B)**:57-84, 1984.
- RAFFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M. A.; MOSSA, J. S.; AGEEL, A. M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J. Ethnopharmacol**. **29**:25-34,1990.
- RAINSFORD, K. D. Gastric ulcerogenicity of non-sterioidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. **J. Pharm. Pharmacol**. **39**: 669-672, 1978.
- RANDALL, L. O.; SELLITO, J. J.; VALDES, J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. **Arch. Int. Pharmacodyn**. **111**:409-419, 1957.

- REISINE, T.; PASTERMARK, G. Opioid analgesics and antagonists. In: __Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth ed.; Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. and Gilman, A.G. eds. McGraw Hill. 1996, p.521-555.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by Prostaglandins in Rats. **Gastroenterology**. 77:433-443, 1979.
- SACHS, G.; PRINZ, C.; LOO, D.; BAMBERG, K.; BESANCON, M. AND SHIN, J.M. Gastric acid secretion: activation and inhibition. **Yale J. of Biol. Med.** 67:81-95, 1994.
- SANDOR, A.; KIDD, M.; LAWTON, G.P.; MIU, K.; TANG, L.H.; MODLIN, I.M. Neurohormonal modulation of rat enterochromaffin-like cell histamine secretion. **Gastroenterol.** 110:1084-1092, 1996.
- SANIOTO, D.L. Sistema digestivo: secreção e digestão. In: __Fisiologia, Ed. por M. Mello Aires, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.
- SARIA, A. Substance P in sensory nerve fibers contributes to the development of oedema in the rat hindpaw after thermal injury. **Br. J. Pharmacol.** 323:341-342, 1984.
- SCHAUF, C. L.; DAVID, F. M.; STACIO, B. M. Fisiologia Humana. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993. 690p.
- SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterol.** 5:43-61, 1945.
- SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 95:729-731, 1957.
- SOLL, A.H. Mechanisms of action of antiseecretory drugs: Studies on isolated canine fundic mucosal cells. **Scand. J. Gastroenterol.** 21:1-6, 1986.

- SONNENBERG, A. Geographic and temporal variations in the occurrence of peptic ulcer disease. **Scand. J. Gastroenterol.** 110 (Suppl.):11-24, 1985.
- SOUZA BRITO, A. R. M. Toxicidade Aguda (Dose Simples). In: __ *Manual de Ensaios Toxicológicos In Vivo*, Editora UNICAMP, Campinas. 1994, p. 15-22.
- SOUZA BRITO, A.R.M. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **J. of Ethnopharmacology.** 54:131-138, 1996.
- SOUZA-BRITO, A. R. M.; RODRIGUEZ J. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; NUNES, D. S. Antiulcerogenic Activity of trans-Dheydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Planta Medica** 64:126-129, 1998.
- SUN, S.B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. J. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **J. Pharm. Pharmacol.** 43:699-704, 1991.
- SZABO, S.; KUSSTATSCHER, S.; SAKOULAS, G.; SANDOR, Z.; VINCZE, A.; JADUS, M. Growth Factors: new endogenous drugs for ulcer healing. **Scand. J. Gastroenterol.** 30 (Suppl. 210):15-18, 1995.
- SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch. Toxicol.** 41:99-105, 1978.
- TABATA, M.; TOMOMASA, T.; ITOH, K.; MORIKAWA, A. Effect of 10% ethanol and sofalcone on prostaglandin E₂ content, mucus gel thickness, and experimental ulcers in the stomach of developing rats. **Digestion.** 57:47-53, 1996.
- TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Serotonin is a directly acting hyperalgesic agent in the rat . **Neuroscience.** 48:485-490, 1992.
- TARNAWSKI, A.; SANTOS, T.A.M.; SARFEH, I.J. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? **Scand. J. Gastroenterol.** 30(Suppl. 210):9-14, 1995.

- TEXTER, E.C.; REYLLY, P.A. The efficacy and selectivity of pirenzepine: review and commentary. **Scand. J. Gastroenterol.** 17(72):237-246, 1982.
- TRENTIN, A. P.; SANTOS, A. R. S.; MIGUEL, O. G.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO J. B. Mechanism involved in the antinociceptive effect in mice of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **J. Pharm. Pharmacol.** 49:567-572, 1996.
- VAZ, Z. R., CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative, on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 278:304-312, 1996.
- WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J.** 10:731-740, 1996.
- WHITTLE, B. J. R.; VANE, J. R. Prostanoids as regulators of gastrointestinal function. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, ed. by L. R. Johnson, 2nd ed., Raven Press, New York. 1987, p. 143-180.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G.W. Carrageenin induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. of the Soc. Exp. Biol.** 3: 544-547, 1962.
- WOLFE, M.M.; SOLL, A.H. The physiology of gastric acid secretion. **N. Engl. J. of Med.** 319(26):1707-15, 1988.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 80:300-307, 1944.
- YANO, S.; AKAHANE, M.; HARADA M. Role of gastric motility in development of stress-induced gastric lesions of rats. **Japan. J. Pharmacol.** 28:607-615, 1978.
- ZIMMERMAN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** 16:109-110, 1983.