

BÁRBARA MAYER

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES ANTIÚLCERA E
ANTI-SECRETORA ÁCIDA DOS EXTRATOS DA *Salvia
officinalis* L.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Consuelo A. Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Michel F. Otuki

CURITIBA

2007

SUMÁRIO

	RESUMO.....	xi
	ABSTRACT.....	xiii
1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	<i>Salvia officinalis</i> L.....	03
1.1.1	Aspectos Botânicos.....	03
1.1.2	Constituintes Químicos.....	05
1.1.3	Atividade Biológica.....	05
1.2	FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL.....	07
1.2.1	Secreção Ácida Gástrica.....	07
1.2.2	Fatores de Proteção da Mucosa Gástrica.....	08
1.2.3	Úlcera Péptica.....	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	MATERIAL.....	20
3.1	Material Botânico.....	20
3.2	Animais.....	20
4	METODOLOGIA.....	21
4.1	MÉTODOS FITOQUÍMICOS.....	21
4.2	MÉTODOS FARMACOLÓGICOS.....	22
4.2.1	Avaliação da Atividade Protetora Gástrica	22

4.2.1.1	Lesões Gástricas Induzidas Por Etanol	22
4.2.1.2	Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético.....	22
4.2.2	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO GASTROPROTETOR DA <i>Salvia officinalis</i> L.....	23
4.2.2.1	Estudo <i>In Vitro</i> da Atividade Seqüestradora de Radicais Livres (DPPH).....	23
4.2.2.2	Quantificação de Grupos Sulfidrílicos não Protéicos (GSH).....	23
4.2.2.3	Caracterização da atividade da Glutathione S- Transferase (GST) na Região Glandular Gástrica.....	24
4.2.2.4	Caracterização da atividade da Catalase (CAT) na Região Glandular Gástrica.....	24
4.2.2.5	Caracterização da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) na Região Glandular Gástrica.....	25
4.2.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA.....	25
4.2.3.1	Estudo do Mecanismo de Ação Anti-Secretor Ácido.....	26
4.2.3.1	Avaliação da Atividade Anti-Secretora Ácida Estimulada por Pentagastrina, Betanecol, Histamina	26
4.2.3.2	Estudo da Atividade Enzimática da H ⁺ , K ⁺ - ATPase <i>in vitro</i>	26
4.2.3.2a	Isolamento das Vesículas Gástricas de Coelho.....	26
4.2.3.2b	Purificação da H ⁺ , K ⁺ - ATPase de Coelho.....	27
4.2.3.2 c	Ensaio da Atividade Enzimática da H ⁺ , K ⁺ - ATPase.....	28
4.2.4	AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL.....	28
4.2.4.1	Esvaziamento Gástrico de Semi-Sólidos.....	28

4.2.4.2	Trânsito Intestinal	28
4.3	Expressão dos dados e análise estatística.....	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Efeito do EHS sobre as Lesões Gástricas Induzidas por Etanol em Ratos.....	31
5.1.2	Efeito do EHS sobre as Lesões Gástricas Induzidas por Etanol em Ratos.....	32
5.1.3	Efeitos do EHS sobre as Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético em Ratos.....	33
5.2	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO GASTROPROTETOR DA <i>Salvia officinalis</i> L.	34
5.2.1	Efeito do EHS no seqüestro do radical livre DPPH	34
5.2.2	Efeitos do EHS no seqüestro do radical livre DPPH.....	36
5.2.3	Efeitos do EHS sobre os níveis de Glutathione (GSH) gástricos em Ratos.....	37
5.2.4	Efeitos do EHS sobre a atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) Gástrica em Ratos.....	38
5.2.5	Efeitos do EHS sobre a atividade da enzima Catalase (CAT) Gástrica em Ratos.....	39
5.2.6	Efeitos do EHS sobre a atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) Gástrica em Ratos.....	40
5.3	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS DA <i>SALVIA OFFICINALIS</i> L SOBRE A SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA EM RATOS.	41
5.3.1	Efeitos do EHS sobre a secreção ácida gástrica basal em ratos.....	41

5.3.2	Efeitos do EHSp sobre a secreção ácida gástrica basal em ratos.	43
5.3.3	Efeitos do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina em ratos.....	44
5.3.4	Efeitos do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol em ratos.....	46
5.3.5	Efeitos do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por histamina em ratos.....	47
5.3.6	Efeito do EHS sobre a atividade da H ⁺ , K ⁺ -ATPase.....	49
5.3.7	Efeito do EHSp sobre a atividade da H ⁺ , K ⁺ -ATPase.....	51
5.3.8	Estudo das ações dos compostos isolados da <i>Salvia officinalis</i>	52
5.4	AVALIAÇÃO DAS AÇÕES DO EHS E DO EHSp SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL EM CAMUNDONGOS.....	54
5.4.1	Efeitos do EHS sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos.....	54
5.4.2	Efeitos do EHSp sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos.....	56
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÃO.....	59
8	REFERENCIAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Salvia officinalis</i> L.....	03
Figura 2	Folhas da <i>Salvia officinalis</i> L.....	04
Figura 3	Resumo da formação das espécies reativas de oxigênio no organismo e ações das enzimas antioxidantes.....	14
Figura 4	Efeitos do EHS sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos	31
Figura 5	Efeitos do EHS sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.....	32
Figura 6	Efeitos do EHSp sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.....	33
Figura 7	Efeitos do EHS sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratos.....	34
Figura 8	Efeitos do EHS na capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.....	35
Figura 9	Efeitos do EHS na capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.....	35
Figura 10	Efeitos do EHSp na capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.....	36
Figura 11	Efeitos do EHS sobre os níveis de glutathiona (GSH) gástrico, após indução de lesões gástricas por etanol 80% em ratos.....	37
Figura 12	Efeitos do EHS sobre a atividade da GST gástrica, após indução de lesões gástricas por etanol 80% em ratos.....	38
Figura 13	Efeitos do EHS sobre a atividade da CAT gástrica, após indução de lesões gástricas por etanol 80% em ratos.....	39
Figura 14	Efeitos do EHS sobre a atividade da SOD gástrica, após indução de lesões gástricas por etanol 80% em ratos.....	40
Figura 15	Efeitos do EHS sobre o volume e a acidez total da secreção gástrica em ratos	42
Figura 16	Efeitos do EHSp sobre o volume e a acidez total da secreção	

	gástrica em ratos.....	43
Figura 17	Efeito do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina.....	45
Figura 18	Efeito do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por .betanecol.....	46
Figura 19	Efeito do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por histamina.....	48
Figura 20	Efeitos do EHS sobre a atividade da H ⁺ , K ⁺ ATPase.....	49
Figura 21	Efeitos do EHS sobre a atividade da H ⁺ , K ⁺ ATPase.....	50
Figura 22	Efeitos do EHSp sobre a atividade da H ⁺ , K ⁺ ATPase.....	51
Figura 23	Efeitos do abietano sobre a atividade da H ⁺ , K ⁺ ATPase.....	52
Figura 24	Efeitos do ácido oleanólico sobre a atividade da H ⁺ , K ⁺ ATPase...	53
Figura 25	Efeitos EHS sobre a distância percorrida pelo marcador colorido no intestino delgado e sobre o esvaziamento gástrico em camundongos.....	55
Figura 26	Efeitos do EHSp sobre a distância percorrida pelo marcador colorido no intestino delgado e sobre o esvaziamento gástrico em camundongos fêmeas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- A - atropina
AA - ácido ascórbico
AINES - antiinflamatórios não esteroidais
AMPC - adenosina monofosfato cíclico
ATP - adenina trifosfato
B - betanecol
C - controle
CAT - catalase
CCK₂ ou CCK -B - receptores do tipo 2 ou B de colecistocinina
CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
Ci - cimetidina
CI₅₀ - concentração 50% inibitória
CL - controle lesado
Gly - glicina
CNL - controle não lesado
COX-1 - ciclooxigenase 1
CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cys - cisteína
DE₅₀ - dose 50% efetiva
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
E - extrato
ECL - células do tipo enterocromafins
EC-SOD - superóxido dismutase extracelular
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
EHS - extrato Hidroalcoólico de salvia officinalis L.
EHSp - extrato hidroalcoólico pós percolação de salvia officinalis
EP₁ - receptores de prostanóides E do tipo 1
EP₃ - receptores de prostanóides E do tipo 3
EP₄ - receptores de prostanóides E do tipo 4

Glu - glutamato
GPx - glutathione peroxidase
GSH - glutathione na forma reduzida
GSSG - glutathione oxidada
GST - glutathione S-transferase
H₂ - receptores do tipo 2 de histamina
HCl - ácido clorídrico
HCO³⁻ - bicarbonato
H - histamina
i.d. - via intraduodenal
IL-1 β - interleucina do tipo 1 β
KCl - cloreto de potássio
M - metoclopramida
M₃ - receptores muscarínicos do tipo 3
MgCl₂ - cloreto de magnésio
MPO - mieloperoxidase
N - neostigmina
N₂O₃ - trióxido de nitrogênio
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaH₂PO₄ - Fosfato de sódio hidratado
NaOH - hidróxido de sódio
NK₁ - receptor do tipo 1 de neurocininas
NO - óxido nítrico
O - omeprazol
O₂^{•-} - radical superóxido
•OH - radical hidroxila
OPT - o-phthalaldehyde
P - pentagastrina
PGD₂ - prostaglandina do tipo D₂
PGE₂ - prostaglandina do tipo E₂
PGH₂ - prostaglandina do tipo H₂

PGs - prostaglandinas

ROS - espécies reativas de oxigênio

s.c. - via subcutânea

SOD - superóxido dismutase

TNF - α - fator de necrose tumoral α

TRPV 1 - receptor transiente potencial vanilóide tipo 1

TXA₂ - tromboxano A₂

U - unidades

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

v.o. - via oral

RESUMO

A *Salvia officinalis* L é popularmente utilizada como espasmolítico, anti-séptico e antiinflamatório, além de seu uso bastante comum na culinária. As folhas da *Salvia officinalis* são bastante conhecidas por suas propriedades antioxidantes. Todos estes usos fazem da Sálvia uma planta de grande interesse para estudos científicos que validem sua ação. Para analisar a sua eficácia estudamos os efeitos da *Salvia officinalis* sobre o trato gastrointestinal e procuramos identificar as vias envolvidas no mecanismo da ação gastroprotetor utilizando dois tipos de extratos: o extrato hidroalcoólico (EHS) e o extrato hidroalcoólico pós-percolação da *Salvia officinalis* (EHS_p). Como o EHS foi mais efetivo que o EHS_p em proteger a mucosa gástrica de ratos contra lesões induzidas por etanol 80% e em reduzir a secreção ácida gástrica, optamos por sua utilização para o estudo do mecanismo de ação da atividade gastroprotetora da salvia. A atividade protetora gástrica do EHS foi confirmada pelo aumento da cicatrização da lesão induzida cronicamente com ácido acético, após o tratamento durante sete dias com o EHS. Para esclarecer as vias envolvidas no efeito gastroprotetor do extrato, passamos a estudar as ações do EHS sobre alguns fatores envolvidos na proteção e na secreção ácida gástrica. A atividade seqüestradora de radicais livres “in vitro” do extrato foi confirmada através da metodologia de seqüestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Para verificar a participação do sistema antioxidante “in vivo” na redução das lesões gástricas induzidas por etanol 80% em ratos, foram dosadas as enzimas glutathione S-transferase, catalase e superóxido dismutase, além dos grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH). O EHS não evitou a queda dos níveis de GSH, foi capaz de impedir o aumento da atividade da enzima GST, o aumento dos níveis da catalase e da superóxido dismutase, sugerindo que o extrato é capaz de reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. O EHS reduziu “in vivo” o volume e a acidez da secreção ácida gástrica basal e a estimulada pela histamina e “in vitro” a atividade da enzima H⁺, K⁺-ATPase, sugerindo uma ação antagonista dos receptores H₂ e inibidora da bomba de prótons na célula parietal. No efeito anti-secretor ácido do EHS os receptores de

gastrina (CCK2) e de acetilcolina (M_3) parecem não estar envolvidos já que o extrato não alterou a secreção ácida gástrica induzida pela pentagastrina e pelo betanecol em ratos e também não alterou a taxa de esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal em camundongos. Também foram testados dois compostos isolados da *Salvia officinalis*, o abietano e o ácido oleanólico sobre a atividade da bomba de prótons, porém apenas o abietano foi efetivo em reduzir a atividade da enzima H^+ , K^+ -ATPase. Os resultados obtidos indicam que o extrato bruto hidroalcoólico da *Salvia officinalis* (EHS) tem atividade gastroprotetora e esta ação envolve mecanismos antioxidantes enzimáticos (CAT, SOD e GST), redução da secreção ácida gástrica através da inibição da atividade da enzima H^+ , K^+ -ATPase e dos receptores H_2 da célula parietal. Além disto, o composto isolado da *Salvia officinalis*, abietano parece ser o responsável pela inibição da bomba de próton.

ABSTRACT

Salvia officinalis (Lamiaceae) is used in traditional medicine because its various properties such as spasmolytic, anti-septic and anti-inflammatory, besides its use for culinary. The leaves of *Salvia officinalis* are known for their antioxidant properties. All these uses make sage a very interesting plant for scientific studies in order to validate its actions. So, the aim of this study was to analyse the actions of sage in the gastrointestinal tract and also tried to identify the possible pathways involved in that actions. For that, we used two extracts: the hydroalcoholic extract (EHS) and the hydroalcoholic extract post-percolation (EHS_p). Since the EHS were much more potent than EHS_p in protecting the gastrointestinal mucosa against lesion induced by ethanol 80% and in reducing the gastric acid secretion, we focused our studies in EHS. The gastric protection activity of EHS was confirmed by the acceleration in healing the mucosa after acetic acid-induced lesions and treatment over 7 days with EHS. To elucidate the pathways involved in the gastroprotective action of the extract, we studied its action in factors related to the protection and the gastric secretion. The scavenger activity of EHS "in vitro" was confirmed with the DPPH assay. To analyse the participation of the antioxidant system "in vivo" in the reduction of ethanol-induced gastric lesions, we evaluated the activity of glutathione S-transferase, catalase and superoxide dismutase and also the levels of GSH. EHS did not avoid the reduction of GSH levels, but it avoided the increase of GST, CAT and SOD activity caused by ethanol, suggesting that the extract is capable of reducing the levels of hydrogen peroxides and superoxide anion. EHS reduced the volume and acidity of acid secretion, and also reduced the stimulated one by histamine "in vivo" and inhibited the activity of H⁺, K⁺-ATPase, suggesting an antagonist action in H₂ and an inhibitory action in proton pumps of the parietal cells. Two chemical components were isolated from sage, abietane and oleanolic acid, and tested "in vitro" assay for H⁺, K⁺-ATPase, but only abietane reduced the enzyme activity. All these results indicate that the crude extract of *Salvia officinalis* (EHS) presents gastroprotective activity and this activity is due to antioxidant enzymatic mechanism (CAT, SOD and GST), reduction of gastric acid

secretion through H^+ , K^+ -ATPase inhibition and blockage of H_2 in the parietal cells. Besides, abietane, a chemical compound isolated from *Salvia officinalis*, seems to be the responsible for the inhibition of the enzyme activity.

1 Introdução

As plantas e extratos vegetais foram e continuam sendo uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos e, devido a sua grande diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, podem ser modelo para a síntese de inúmeros fármacos (NODARI & GUERRA, 2000).

A redução da biodiversidade seja pelos desmatamentos para exploração da madeira, expansão de áreas cultivadas ou como consequência do aquecimento global, despertou maior interesse pelas espécies que ora existem, mas que poderão estar extintas dentro de pouco tempo, trouxe a discussão sobre as perdas que estas práticas acarretam e a necessidade de procedimentos que tenham como meta o desenvolvimento sustentável. A indústria de medicamentos percebeu nos produtos naturais uma grande oportunidade de desenvolvimento em vários segmentos da cadeia produtiva, seja na industrialização dos fitoterápicos, na distribuição de matérias-primas, na produção de plantas medicinais etc (FONTE, 2004).

Atualmente, estima-se que 50% do total dos fármacos mundialmente utilizadas na clínica são derivados de produtos naturais (GURIB-FAKIM, 2006).

Apesar de possuímos a maior biodiversidade do mundo, até 2007 foi desenvolvido apenas um medicamento genuinamente nacional. Isto, talvez seja uma consequência da característica do mercado farmacêutico brasileiro que é composto por empresas multinacionais (70%) que vendem predominantemente (90%) produtos de marca, originados a partir de pesquisas desenvolvidas em seus países de origem.

Apesar do percentual de crescimento do mercado de fitoterápicos ser bastante significativo, apenas 8% da flora mundial apresenta estudos científicos que comprovam sua utilização, sendo a maioria das indicações ainda baseadas na tradição popular e na observação de efeitos com o relato de alguns casos (NODARI e GUERRA, 2000). Assim, o aumento da pesquisa com produtos da

biodiversidade brasileira pode levar ao desenvolvimento de novos produtos de qualidade (com eficácia e segurança).

Um fator a ser levado em consideração para o incentivo às pesquisas com produtos naturais é a adesão do paciente ao tratamento que é um dos maiores problemas para alcançar o sucesso no tratamento durante períodos longos. Esta adesão ao tratamento pode ser aumentada se for ofertado o Produto Natural/ Plantas Medicinais que consegue reunir um enorme grupo de simpatizantes que “acreditam” na ação benéfica da planta e desta forma pode beneficiar o paciente reduzindo significativamente a morbidade/mortalidade.

No Brasil, o consumo de produtos para o tratamento de úlceras é significativo. De acordo com estudo realizado por Arrais et al (1997), a classe de medicamentos mais procurada na automedicação pela população brasileira, é a de medicamentos para o aparelho digestório e metabolismo (24%) seguido de sistema nervoso central (18,2%) e sistema respiratório (17,7%).

Por sua importância social e econômica, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná o grupo de pesquisa do Laboratório de Validação de Plantas Medicinais tem procurado demonstrar a eficácia e a segurança de produtos utilizados pela população no tratamento dos transtornos gástricos, através de metodologia científica padronizada internacionalmente.

1.1 *Salvia officinalis* L.

Foram utilizados nos experimentos extratos e frações obtidos das folhas secas de *Salvia officinalis* L, conhecida popularmente como sálvia, salva, chá da Grécia, chá-da-França, sabiá, sal-das boticas, salva-comum, salva-das-boticas, salva-de remédio, salva-dos jardins, salva-ordinária, sálvia-comum, erva sagrada (ALONSO, 2004; LORENZI & MATOS, 2002).

A *Salvia officinalis* é cultivada desde tempos remotos, sendo considerada uma panacéia pelos gregos. Os egípcios a usavam para aumentar a fertilidade e os romanos a ingeriam para obter atividades estimulantes. Seu nome deriva do

latim “salvere”, que significa saudável. Foi introduzida na América do norte no século XVII (ALONSO, 2004).

1.1.1 Aspectos Botânicos:

A *Salvia officinalis* (Figura 1) é um subarbusto perene, pertencente à família das Lamiaceas. Caracteriza-se por apresentar uma altura entre 30 e 70 cm; raiz fusiforme e fibrosa, talo ereto lenhoso e quadrangular na base com numerosas ramificações, folhas opostas, inteiras, glandulares ou rugosas, finamente denteadas (Figura 2), as inferiores pecioladas e as superiores sésseis, embranquecidas na parte de trás e verdes na frente, recobertas por uma penugem. As flores são azul-violáceas, agrupadas em espigas terminais em número de 7 a 10, com intenso aroma e abundante néctar. As características das flores variam conforme a variedade da sálvia. O fruto é tetraquênio (ALONSO, 2004; INFOAGRO, 2004).



Figura 1: *Salvia officinalis* L.

(Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Salvia_officinalis0.jpg)



Figura 2: Folhas da *Salvia officinalis* L.

(Fonte: www.bbc.co.uk)

1.1.2 Constituintes Químicos

Através de análises fitoquímicas do extrato de *Salvia officinalis*, algumas substâncias foram isoladas e identificadas como o ácido rosmarínico, o ácido salvianólico, e o ácido sagerínico (LU & FOO, 1999). Constituintes diterpênicos do tipo abietano, como o ácido carnósico, o carnosol, o ácido royleanólico e 7-methoxyrosmanol também já foram isolados (WENKERT et al, 1965; URONES et al, 1998; GU et al, 2001) Flavonóides (1- 3%), como a luteolina e glucoronídeos associados, hispidulina, 5-metoxi-salvigenina, genkwanina, 6-metoxigenkwanina, apigenina, vicenina (ALONSO, 2004), e outras substâncias, como ácido caféico, clorogênico, elágico, ferúlico, gálico, labiático e rosmarínico, taninos hidrolisáveis e condensados (3-8%), asparagina (raiz), oleorresina (20%), ácidos fosfórico, oxálico, ursólico (2,1%), oleanólico e nítrico em forma de sais.

Também foram identificados alguns polissacarídeos como arabinose (30,4%), galactose (17,9%), 3-o-metilgalactose (3,0%), glucose (15,5%), manose (8,3%), xilose (7,6%), fucose (2,6%), ramnose (6,7%), ácidos úricos (8,0%) (GILLI et al, 1994).

1.1.4 Atividades Biológicas

Vários estudos demonstraram que o gênero *Salvia* é fonte de alguns potentes antioxidantes (CHIPAULT et al, 1952; CUVELIER et al, 1996). Estas propriedades antioxidantes estão relacionadas com a presença do ácido rosmarínico e ácido carnósico (CHANG et al. 1977; CUVELIER et al., 1994). Estudos mais recentes revelaram a presença de grande quantidade de diterpenóides (GONZALEZ et al., 1992; TANG & EISENBRAND, 1992), ácidos fenólicos (TANAKA et al., 1996, 1997; LI, 1998; TEZUKA et al.,1998) incluindo alguns novos metabólitos do ácido caféico como o ácido sagerínico (LU et al., 1999), e as sagecumarinas (LU et al., 1999) e flavonóides. Sendo que os derivados do ácido rosmarínico (ácido salvianólico K e I, sagecumarinas e ácido sagerinico) demonstraram maior potencial antioxidante que os flavonóides (LU, 2001).

Alguns de seus compostos fenólicos apresentaram uma grande atividade seqüestradora de espécies reativas de oxigênio, como ânions superóxido, radical hidroxila e oxigênio singlete, além de inibirem a peroxidação lipídica (SANTOS-GOMES et al, 2002).

Lamaison et al (1991), descreveram que os princípios amargos (em especial o carnosol) exercem uma atividade aperitiva-eupéptica (ALONSO, 2004).

Estudos realizados com extratos hidroalcoólicos de *Sálvia* sobre o músculo liso isolado de ratas, demonstraram uma atividade inibitória de 60 a 80% nas contrações induzidas por histamina, acetilcolina, serotonina e cloreto de bário (TODOROV et al, 1984).

O óleo essencial tendo como maiores componentes as thujonas e camphor, que, além de hepatotóxicos, são neurotóxicos de forma dependente da dose. Concentrações de óleo essencial maiores que 200 ng/ml agindo diretamente no fígado, causaram toxicidade (LIMA et al, 2004).

O ácido carnósico e o carnosol, encontrados na *Salvia officinalis*, inibiram a atividade da lipase pancreática, enzima com importante papel na digestão de lipídeos. Além disso, o ácido carnósico também suprimiu a elevação de triglicerídeos (NIMOMIYA et al, 2004).

WILLERSHAUSEN et al (1991) atribuíram as atividades antimicrobianas dos taninos presentes na Sálvia à redução do crescimento de placas nos dentes, inflamação na gengiva e efeitos positivos na profilaxia de cáries. MANOLOVA et al (1995), justificaram a inclusão da salvia, como um ingrediente ativo em preparações que utilizam várias plantas para o tratamento de bronquite crônica e aguda, pela sua suposta atividade anti-viral.

BARICEVIC et al (2001) atribuíram à presença do ácido ursólico as propriedades antiinflamatórias tópicas do extrato clorofórmico das folhas de *Salvia officinalis* observado no teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

1. 2 Fisiologia do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal é um tubo muscular derivado do mesoderma com um epitélio especializado que se estende desde a faringe posterior até o ânus. Além de serem responsáveis pela digestão, absorção e excreção das substâncias ingeridas, os órgãos que pertencem ao trato gastrointestinal também coordenam o maior número de células endócrinas e imunes do organismo (GILBERT, 1994; ALHMAN et al, 2001; KELLY et al, 2000).

1. 2.1 Secreção ácida gástrica

As células parietais são as principais células secretoras de ácido na mucosa gástrica. Esta secreção é regulada por mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico (KONTUREK et al, 2004).

O sistema nervoso central é considerado o mecanismo principal responsável pelo início da secreção gástrica em resposta a uma antecipação do alimento através da liberação de acetilcolina pelos neurônios eferentes vagais. Diretamente a acetilcolina liga-se a receptores M_3 na membrana basolateral das células parietais e indiretamente estimula a liberação de histamina das células do tipo enterocromafins (ECL) no fundo gástrico e a liberação de gastrina das células G do antro gástrico (ROBERTS et al, 2003; BRUNTON et al, 2006). A histamina liberada pelas células ECL ativa as células parietais de maneira parácrina através da interação com receptores H_2 . A gastrina liberada das células G estimula as células parietais diretamente através da ligação com receptores CCK 2 (CCK B) presentes na membrana da célula ou indiretamente estimulando a liberação de histamina das ECL. Além dos estímulos centrais, a gastrina pode ser liberada através da distensão local do estômago e composição química do conteúdo gástrico. A ligação da acetilcolina, gastrina e histamina com seus respectivos receptores acoplados a proteína G ativam segundos mensageiros. A ativação das vias que dependem do Ca^{2+} intracelular pela gastrina e acetilcolina e/ou de AMPc pela histamina, ativam a H^+ , K^+ - ATPase nas células parietais, resultando na secreção ácida estomacal (BRUNTON et al, 2006).

1. 2.2 Fatores protetores da mucosa gástrica

O trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões. Estes estímulos podem ser os antiinflamatórios não esteroidais, álcool, alimentos em várias temperaturas, infecções por *Helicobacter pylori*, lesões relacionadas à isquemia/reperfusão e fatores endógenos como a produção fisiológica de ácido gástrico ou alterações de mucosa provocadas por estresse. Em contrapartida a estes estímulos nocivos, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores de proteção (pré-epitelial, epitelial e subepitelial) (DONG & KAUNITZ, 2006).

1.2.2.1 Fatores de Proteção Pré-Epiteliais:

Muco

O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon, formando um gel aderente à superfície que promove uma barreira protetora entre o epitélio e o lúmen contra agentes nocivos, enzimas e microorganismos (ALLEN, 1989; ALLEN & HOSKINS, 1988; FORSTNER & FORSTNER, 1994). A camada de muco funciona como uma barreira física, impedindo o acesso da pepsina, presente no lúmen, à mucosa gástrica. Além disso, mantém o gradiente de pH próximo a neutralidade, impedindo danos a mucosa gástrica (ROSS & TURNBERG, 1983; SCHADE et al, 1994; FLEMSTRÖM & KIVILAAKSO, 1983).

A regulação da secreção de muco está associada a fatores neurais, hormonais e parácrinos. Normalmente a espessura da camada de muco é a diferença resultante entre a taxa de secreção e a erosão provocada pela digestão enzimática. A secreção contínua de muco mantém as propriedades protetoras da barreira, entretanto, alguns fatores como infecção por *Helicobacter pylori*, úlceras pépticas e colite ulcerativa podem comprometer a barreira de muco afetando a sua

estrutura e a sua espessura (ATUMA et al, 1998; NEWTON et al, 1998; PULLAN et al, 1994; STRUGALA et al, 1998; YOUNAN et al, 1982).

Bicarbonato

A secreção de HCO_3 da superfície das células epiteliais é um mecanismo de defesa no estômago juntamente com a barreira de muco (FLEMSTROM & GARNER, 1982). A regulação fisiológica desta secreção envolve diversos fatores, como as prostaglandinas, peptídeos e fatores neuronais. No duodeno, As prostaglandinas sintetizadas pela COX-1 ativam a secreção de HCO_3 através da interação com receptores EP3 e EP4 (FLEMSTROM, 1984; HOGAN et al, 1993).

Sabe-se também que o aumento da secreção de HCO_3 no duodeno é mediado pela estimulação da adenilato ciclase e elevação nos níveis intracelulares de AMPc, e que a ativação de EP₃/EP₄ resulta em um aumento do AMPc celular através da proteína G (FLEMSTROM & GARNER, 1982; FLEMSTROM, 1987; SIMSON et al, 1981; GARNER et al, 1990; AOI et al, 2004)

No estômago, o aumento da secreção de HCO_3 é regulado pelas PGE₂ através da interação com receptores EP₁ (TAKEUCHI et al, 2006).

1.2.2.2 Fatores de Proteção Epiteliais

Quando estas barreiras iniciais são transpostas, são ativados mecanismos complexos de proteção epitelial e subepitelial. Um destes mecanismos é a redução do estresse oxidativo (DONG & KAUNITZ, 2006). Um radical livre é definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Espécies reativas de oxigênio (ROS) é uma expressão que inclui radicais de oxigênio, como radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH), peroxila (RO_2) e hidroperoxila (HO_2) e outros agentes oxidantes que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3), porém podem ser convertidos fácil e rapidamente em radicais (HALLIWELL & GUTRIDGE, 1989).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas durante o metabolismo normal. Aproximadamente 95% do oxigênio molecular sofre redução pela citocromo oxidase nas mitocôndrias para formação de água e estão envolvidos em reações enzimáticas, transporte de elétrons da mitocôndria, ativação de fatores de transcrição nucleares, expressão de genes e ação antimicrobiana de neutrófilos e macrófagos (BAYIR H, 2005). O restante do oxigênio é reduzido às espécies reativas (DONG & KAUNITZ, 2006).

O trato gastrointestinal tem a capacidade de produzir grandes quantidades de ROS pelas oxidases de mucosa como a xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO) e NADPH oxidase, encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) da lâmina própria (GRISHAM & GRANGER, 1988). Além disto, vários fatores podem acarretar o aumento da produção de ROS como, por exemplo, o processo inflamatório e conseqüente recrutamento de neutrófilos por citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (DONG & KAUNITZ, 2006).

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

1.2.2.2.1 Defesas Antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio coexistem em equilíbrio com moléculas antioxidantes nas células. O aumento dos níveis intracelulares de ROS, a diminuição das defesas antioxidantes, ou ambos é denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser impedido por defesas antioxidantes enzimáticas e químicas. As enzimas que promovem a primeira linha de defesa contra superóxido e peróxido de hidrogênio são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Moléculas químicas pequenas também têm papel

antioxidante como vitaminas, flavonóides, carotenóides, ácido úrico e glutathiona (GSH), promovendo uma segunda linha de defesa (CNUBBEN et al. 2001).

GSH

O GSH é um tripeptídeo (γ - L- Glu- L- Cys- Gly) com alta capacidade doadora de elétrons (alto potencial redox negativo) devido ao grupamento tiol (-SH) na porção cisteína, combinada com uma alta concentração intracelular, resultando em um alto poder redutor. Estas características justificam sua potente atividade antioxidante e sua propriedade de cofator enzimático, importantes para regulação da atividade celular. Sob condições de estresse oxidativo, as ROS são reduzidas por GSH com concomitante formação do dissulfito oxidado, a GSSG (ou glutathiona oxidada). Apesar de sua relativamente resistência a oxidação espontânea, GSH reage rapidamente e de forma não enzimática com o radical hidroxila, com N_2O_3 e peroxinitrito (GRIFFITH, 1999).

Os radicais endógenos, como peróxido de hidrogênio, são reduzidos de forma efetiva por uma peroxidase dependente de selênio, a GPx, que requer a presença do GSH como substrato. Durante esta reação, o GSH é convertido a GSSG, que é transformado novamente em 2 GSH pela GSSG redutase com gasto de NADPH/ H^+ , formando então o ciclo redox, o qual é orientado por fatores transcricionais (HADDAD, 2005). Devido a esta capacidade de regular o estado redox de fatores de transcrição, o GSH pode estar envolvido na regulação da expressão de genes em resposta ao estresse. Além disso, o GSH é necessário para a conversão da prostaglandina H_2 em prostaglandina E_2 e D_2 (LU et al, 2000), para o controle das vias neuro-imune-endócrinas atuando como neurotransmissor e também sendo cofator de diversas enzimas como as peroxidases, transhidrogenases e glutathiona S-transferase (GST) (MONKS & LAU, 1994; MULDER & OUWERKERK, 1997).

Para manter o equilíbrio redox celular, o GSSG é exportado das células por proteínas de transporte dependentes de ATP, implicando que condições

severas de estresses diminuem níveis celulares de GSH (LEIER et al, 1996; MULCAHY & GIPP, 2005, CNUBBEN et al, 2001). Esta depleção de GSH está relacionada com a patofisiologia de muitas doenças. (CANTIN et al., 1989; BUNNELL & PACHT, 1993; ROUM et al., 1993; SAUGSTAD, 1997), sugerindo um importante papel do GSH na manutenção da integridade dos sistemas fisiológicos.

Glutathione S-Transferase

GST é uma super família de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos a GSH, produzindo compostos menos reativos. Estão organizadas em sete principais classes de genes designadas α (alfa), σ (um), π (pi), θ (teta), δ (sigma), zeta e κ (kappa). São proteínas diméricas compostas por duas subunidades. Cada uma destas subunidades possui um sítio de ligação para a glutathione (sítio G) assim como um sítio adjacente hidrofóbico para a ligação do substrato eletrofílico (CNUBBEN et al, 2001).

A GST participa da defesa contra o estresse oxidativo devido a capacidade desta enzima em detoxificar compostos endógenos que causam danos (CNUBBEN et al, 2001). Nas reações de conjugação, a GST atua diminuindo o pKa da cisteína nucleofílica do GSH de 9,5 em solução aquosa para um valor mais neutro. Quando ligada no estado ativo, permite o GSH de formar ligações tio-éter com o agente oxidante em seu sítio eletrofílico, resultando em um composto menos reativo quimicamente (SCHULTZ et al, 1997)

Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima tetramérica encontrada em todos os organismos aeróbios. Ela metaboliza o peróxido de hidrogênio de maneira extremamente rápida e pode atuar de duas maneiras, dependendo da concentração do substrato. Em baixas concentrações ($< 1\mu\text{M}$), atua como peroxidase ($\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R} + 2\text{H}_2\text{O}$). Isto ocorre com uma variedade de doadores de hidrogênio, como etanol,

metanol, fenol, nitritos e ácido ascórbico. Em altas concentrações de substrato, a CAT decompõe rapidamente o peróxido de hidrogênio tóxico rapidamente utilizando a reação catalítica, na qual o H_2O_2 atua como acceptor e doador de hidrogênio: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$, promovendo à célula um mecanismo altamente eficiente de remoção do peróxido de hidrogênio (OSHINO et al, 1973; SCANDALIOS, 2005).

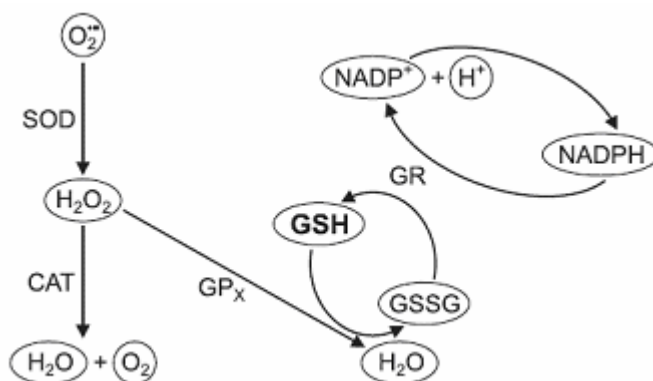
A catalase tem um papel protetor importante contra os efeitos tóxicos dos peróxidos gerados nos peroxissomos e os remove com grande eficácia (SIRAKI et al, 2002).

Superóxido Dismutase (SOD)

As espécies reativas de oxigênio são liberadas dos neutrófilos ativados, podendo resultar em danos teciduais. Em condições de estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD) atua como um sistema de defesa intracelular que degrada o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. As células de mamíferos apresentam três tipos de SOD, a CuZn-SOD ou SOD 1, a Mn-SOD ou SOD 2 e a SOD extracelular ou EC-SOD. A SOD 1 está localizada nos espaços intermembranas da mitocôndria, núcleo e citosol. A SOD 2 está localizada na matriz mitocondrial e reage com alguns dos anions superóxidos gerados na cadeia respiratória de elétrons. A EC-SOD é secretada extracelularmente e está ligada a polissacarídeos sulfatados na superfície da célula (CHANDEL & BUDINGER, 2007; YASUI & BABA, 2006)

Estudos demonstraram que a SOD apresenta um alto poder inibitório da inflamação mediada por neutrófilos através da modulação da apoptose dos neutrófilos (YASUI & BABA, 2006). Os neutrófilos estão entre as primeiras células a serem recrutadas para os sítios de inflamação. Neutrófilos ativados aderem ao endotélio vascular e transmigram para o espaço extravascular até o sítio alvo da inflamação, onde liberam ROS, proteases, e diversas quimiocinas. ROS e proteases danificam o tecido normal, e proteínas da matriz extracelular e citocinas liberadas posteriormente mantêm o influxo de células inflamatórias.

Os ânions superóxido ativam células endoteliais e aumentam a infiltração de neutrófilos (SALVEMINI et al, 1999; MASINI et al, 2002), através da geração de mediadores quimiotáticos, como leucotrienos B₄ (FANTONE & WARD, 1982), ou através do aumento da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 (CUZZOCREA et al, 2001). A inibição do superóxido impede a infiltração de neutrófilos no local da inflamação (SALVEMINI et al, 1999).



SOD - superóxido dismutase, CAT- catalase, GPX – Glutaciona peroxidase, GR- Glutaciona reductase, GSH- Glutaciona reduzida, GSSG - Glutaciona oxidada, $NADP^+$ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

Figura 3: Resumo da formação das espécies reativas de oxigênio no organismo e ações das enzimas antioxidantes. Figura adaptada de KWIECIEN et al. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. J Physiol Pharmacol, v. 53(1), pg.39-50, 2002.

1.2.2.2.2 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PG) são derivados de ácidos graxos compostos por 20 carbonos. São encontradas em todos os tecidos e órgãos e estão envolvidas em uma variedade de funções fisiológicas e patológicas. São sintetizadas a partir de diferentes ácidos graxos essenciais, entre eles, o ácido araquidônico (AA). As

PG derivadas do ácido araquidônico são denominadas de série-2, e consistem a prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina F_{2α} e tromboxano A₂ (TXA₂) (CALDER, 2001). As PG são liberadas da célula imediatamente após a síntese e vão exercer suas funções biológicas através da interação com receptores prostanoídes presentes nas superfícies das células de maneira autócrina e parácrina (DEY et al, 2006).

As PG têm efeito na motilidade, secreção e citoproteção do trato gastrointestinal. As PGE₂ podem influenciar de duas maneiras a secreção ácida gástrica. Em baixas concentrações inibem a secreção ácida através da interação com receptores EP3 e em concentrações maiores estimulam a secreção ácida através da interação com receptores EP4. Ambos os receptores estão presentes nas células parietais e nas células principais da mucosa gástrica (DING et al, 1997).

Com relação às defesas primárias da mucosa gastrointestinal, as PGE₂ tem um efeito estimulatório na secreção de bicarbonato, este efeito parece estar relacionado com receptores EP 1 no estômago e EP3/EP4 no duodeno (HIROKAWA et al, 2004) e um efeito secretagogo de mucina (TANI, 1997). Esta ação ocorre através da indução da ativação do gene da mucina pela via ERK MAPK/RSK1/CREB (CHO, 2005).

As PG também têm importante papel na citoproteção da mucosa gastrointestinal, como em lesões da mucosa pelo uso de antiinflamatórios não esteroides, envolvendo fatores neurais, vasculares e hormonais (Brzozowski et al, 2005).

1.2.2.3 Proteção Sub Epitelial

Microcirculação

Um dos mais importantes componentes de defesa da mucosa é a resposta da circulação sanguínea a agentes irritantes. Quando ácidos ou outros irritantes

entram na camada subepitelial, neurônios aferentes sensoriais medeiam um rápido aumento no fluxo sanguíneo da mucosa, permitindo a rápida remoção das substâncias tóxicas, limitando a penetração em camadas mais profundas da mucosa (WALLACE et al, 1996).

Os neurônios aferentes sensoriais, quando apropriadamente estimulados, liberam peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na vizinhança das arteríolas presentes na submucosa. O CGRP causa vasodilatação nestes vasos, através da via mediado por óxido nítrico (NO), aumentando o fluxo sanguíneo. A resposta hiperêmica é também fundamental para processos de restituição da mucosa. Além do NO, as prostaglandinas também são importantes na manutenção do fluxo sanguíneo durante o processo de restituição (HOLZER & SAMETZ, 1986).

Inflamação

Quando os níveis superficiais de defesa da mucosa falham, ou são transpostos por fatores agressores, o próximo nível de defesa da mucosa ativado é a resposta inflamatória aguda. Os neutrófilos são recrutados da circulação para o local de ação para facilitar a cicatrização e reduzir a entrada de microorganismos na circulação sistêmica (WALLACE, 2001).

A liberação de fatores quimiotáticos (leucotrienos B₄, fator ativador de plaquetas) dos imunócitos da mucosa, como mastócitos e macrófagos, é sinal para o extravasamento de neutrófilos com migração para o sítio da lesão (WALLACE, 2001).

Há várias maneiras nas quais aderências de neutrófilos ao endotélio vascular contribui para a formação de úlceras gastroduodenais. A aderência de neutrófilos ao endotélio vascular é acompanhada por liberação de proteases e espécies reativas de oxigênio. Estas substâncias medeiam vários danos provocados na mucosa gástrica por agentes irritantes, como os antiinflamatórios não esteroidais (WALLACE, 2001).

1. 2.3 Úlcera Péptica

A úlcera péptica pode ser definida como um desequilíbrio entre fatores protetores (bicarbonato, muco, prostaglandina, etc.) e fatores agressores (ácido e pepsina) da mucosa gástrica. Outros fatores como *Helicobacter pylori* e antiinflamatórios não esteroidais (AINES) também podem ocasionar úlceras. Aproximadamente 60% das úlceras pépticas estão relacionadas com infecção estomacal por *H. pylori* (BRUNTON et al, 2006).

Úlceras são lesões da mucosa gastrointestinal que penetram até a *muscularis mucosae*. É resultado de necrose tecidual causada por isquemia da mucosa, formação de radicais livres e redução do aporte de nutrientes (TARNAWSKI et al, 1990; BAATAR et al, 2002). A úlcera péptica é considerada doença crônica, e a recorrência anual é esperada na maioria dos casos (BRUNTON et al, 2006).

1. 2.3.1 Farmacoterapêutica da úlcera péptica

Por mais de um século, as úlceras pépticas eram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento farmacológico resumia-se em neutralizar a acidez gástrica estomacal com a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio (NaH_2CO_3), carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) e hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ou associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas de dissolução e absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. Alguns podem também quelar outras drogas presentes no trato gastrointestinal, formando complexos insolúveis que passam pelo TGI sem serem absorvidos. Assim, a supressão farmacológica efetiva e mais segura da secreção ácida gástrica teve início com a introdução dos antagonistas de receptores H_2 de histamina nos anos 70. Estes fármacos inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores H_2 na membrana basolateral das células parietais. Atualmente existem quatro diferentes

antagonistas de receptores H_2 , a cimetidina, a ranitidina, a famotidina e a nizatidina, possuem estruturas químicas diferentes que possibilitam variação nas interações com outros fármacos e alteram o perfil dos efeitos colaterais. Durante os anos 80, as cirurgias de úlceras pépticas diminuíram cerca de 85%, o que pode ser atribuído ao uso de cimetidina e ranitidina. A partir de 1980 foram lançados os fármacos que inibem a bomba H^+ , K^+ -ATPase (bomba de prótons) omeprazol, lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol esomeprazol considerados, atualmente os fármacos mais eficazes na supressão da secreção de ácido gástrico. O desenvolvimento destes fármacos melhorou a inibição da acidez gástrica, melhorando também a cicatrização das úlceras gástricas e duodenais. Estes inibidores de bomba são pró-fármacos, necessitando ativação em ambiente ácido. Entram na célula parietal a partir do sangue e, devido a sua fraca natureza básica, acumulam-se em canalículos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons que resulta na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+ , K^+ -ATPase, resultando em uma inativação irreversível da bomba. A secreção do ácido só se reinicia após a inserção de novas moléculas de bomba na membrana luminal. (YUAN et al, 2006; BRUNTON et al, 2006). Entretanto, estas duas classes de fármacos, principalmente quando utilizados de forma crônica promovem vários efeitos colaterais, entre eles a hipergastrinemia que pode estar associada ao desenvolvimento do câncer gástrico. Os efeitos colaterais agravados pela utilização prolongada levam ao estudo para o desenvolvimento de alternativas que associem múltiplas ações, reduzindo os mecanismos reflexos compensatórios.

2 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos do extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* L sobre o trato gastrointestinal e algumas vias envolvidas no mecanismo de ação gastroprotetor em modelos animais.

2.1 Objetivos específicos:

1. Avaliar os efeitos dos extratos de *Salvia officinalis* na proteção da mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol em ratos.
2. Avaliar os efeitos do extrato de *Salvia officinalis* na cicatrização de lesões induzidas com ácido acético em ratos.
3. Avaliar os efeitos dos extratos de *Salvia officinalis* na redução da secreção ácida gástrica, utilizando o modelo de ligadura do piloro em ratos.
4. Avaliar o mecanismo de ação responsável pelo efeito sobre a secreção ácida gástrica: receptores histaminérgicos, colinérgicos e de gastrina em ratos.
5. Avaliar o efeito do extrato e substâncias isoladas da *Salvia officinalis* sobre a atividade da enzima H⁺, K⁺ ATPase “in vitro”.
6. Avaliar a ação seqüestradora de radicais livres dos extratos de *Salvia officinalis* “in vitro”.
7. Avaliar a atividade antioxidante do extrato, através de sua ação sobre os níveis de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione S-transferase e superóxido dismutase)
8. Avaliar a ação dos extratos de *Salvia officinalis* sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos.

3. Material:

3.1 Material Botânico:

As folhas de *Salvia officinalis* foram fornecidas pela Chamel Indústria e Comércio de Produtos Naturais Ltda.

A preparação dos extratos e frações da planta foram realizadas pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, do Departamento de Química da UFSC.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, variedade Swiss) adultos, machos e fêmeas, com peso variando entre 15 a 30g; ratos (*Ratus norvegicus*, variedade Wistar) adultos, fêmeas, com peso variando entre 150 a 300g e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albino adultos, machos e fêmeas, com peso variando entre 1 a 2kg, adquirido na Cooperativa dos Produtores de Coelho do Estado do Paraná (Coelho Brasil), São José dos Pinhais, PR. Os camundongos e ratos foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná e adquiridos do Instituto de tecnologia do Paraná (TECPAR) com condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com acesso livre à água e ração. Os protocolos experimentais que utilizaram animais estão de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação Animal da UFPR, com o número de protocolo 161.

4. Metodologia

4.1 Métodos Fitoquímicos – Preparação dos extratos brutos hidroalcoólicos:

Os extratos de *Salvia officinalis* (EHS) foram obtidos a partir de uma quantidade de 2kg de planta seca e moída, utilizando os métodos de percolação e maceração, ambos utilizando etanol 85% como solvente. Foram obtidos 10 litros de percolado, o qual foi concentrado no rotaevaporador na temperatura de 45° C rendendo 154,8g (7,74%) de percolado hidroalcoólico seco. Como neste procedimento a planta fica em contato com o solvente extrator por apenas alguns minutos, foi também realizado o procedimento de maceração para obtenção de um extrato pós-percolação de *Salvia officinalis* (EHSp), que consiste em deixar a planta em contato com o solvente (etanol/15%água) por um período maior de tempo (8 dias). Após a maceração, o solvente foi concentrado em rotaevaporador na temperatura de 45° C, e apresentou rendimento de 320g de extrato bruto hidroalcoólico seco.

4.2 Diluição dos extratos (EHS e EHSp) da *Salvia officinalis* L.

Ambos os extratos foram diluídos com água destilada a frio, com a adição de Tween 80[®].

4.2 Métodos Farmacológicos

4.2.1 Avaliação da Atividade Protetora Gástrica

4.2.1.1 Lesões gástricas induzidas por etanol

As lesões gástricas induzidas por etanol (indução aguda) seguiram metodologia descrita por Robert e colaboradores (1979)

Ratos fêmeas foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. Grupos de 6 animais foram tratados por via oral com o veículo (água - 0,1 mL/100 g), omeprazol (40 mg/kg) e o extrato (EHS - 30, 100, 300, 1000 mg/kg e EHSp - 100, 300, 1000 mg/kg). Sessenta minutos após estes tratamentos, foi administrado etanol 80% (0,5 ml/200 g) por via oral. Uma hora após a administração do etanol, os animais foram mortos por deslocamento cervical e os estômagos removidos, distendidos e fixados com alfinetes para a análise das lesões gástricas.

A avaliação das lesões gástricas induzidas por etanol foi realizada pela medida da área de lesão por meio de uma régua graduada (mm).

4.2.1.2 Lesões gástricas induzidas por ácido acético (TAKAGI *et al.*, 1969)

As lesões gástricas induzidas por ácido acético (indução crônica) seguiram metodologia descrita por Takagi e colaboradores (1969)

Grupos 6 de ratas foram previamente submetidas a uma dieta alimentar padronizada (2 vezes por dia). Ao final do terceiro dia, os animais foram submetidos à cirurgia para a indução das úlceras. Os animais foram anestesiados com éter etílico. Após exposição do estômago, foi injetado 50 µL de ácido acético 20% na subserosa da parede gástrica anterior. O estômago foi lavado cuidadosamente com salina 0,9% e a parede abdominal suturada. Após a recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e continuaram sob regime de restrição alimentar com consumo livre de água. Os tratamentos foram iniciados administrando o veículo (água - 0,5 mL/100 g), o omeprazol (40 mg/kg) e

as diferentes doses do extrato (EHS - 10, 30, 100, 300 mg/kg) por gavagem, 30 minutos após o consumo de ração. O tratamento iniciou sete dias após a cirurgia e teve a duração de 7 dias. Ao final do tratamento, os animais foram mortos, o estômago removido e esticado para posterior inspeção da mucosa e determinação da cicatrização.

A avaliação das lesões gástricas induzidas por ácido acético foi realizada pela medida da altura e diâmetro da lesão por meio de uma régua graduada (mm³).

4.2.2 Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetor da *Salvia officinalis*

4.2.2.1 Estudo *in vitro* da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH)

A reatividade dos extratos de Sálvia com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada através de medidas de alteração da absorbância a 517 nm, de acordo com o método descrito por BLOIS (1958) e CHEN et al (2004), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de 750 µL de solução teste (EHS e EHSp) e 250 µL de solução metanólica de DPPH (1mg em 25 ml). Após 5 minutos, o decréscimo da absorbância foi medido. A solução do agente redutor, ácido ascórbico (50 µg/ml), foi utilizada como controle positivo do teste e como controle negativo foi utilizado a água destilada.

4.2.2.2 Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos

Estômagos previamente submetidos ao etanol 80% foram utilizados para verificar a participação dos grupamentos sulfidrílicos não protéicos na proteção da mucosa pelo EHS. Os níveis de GSH na mucosa gástrica foram determinados através de um ensaio de fluorescência baseado em Hissin et al (1976). A parte

glandular da mucosa gástrica foi diluída em tampão 100 mM NaH_2PO_4 (pH 8.0) contendo 5 mM EDTA. Os homogenatos receberam ácido tricloro acético (ATC) 30% e depois foram centrifugado a 1940 g por 6 minutos. Foram adicionados 100 μl de OPT (o-phthalaldehydo) ao sobrenadante e a fluorescência resultante medida após 15 minutos de incubação na ausência de luz. A curva analítica foi preparada com GSH 0 a 40 mM. Os resultados foram expressos em nmoles de GSH/ g de tecido.

4.2.2.3 Caracterização da atividade da Glutathione S- Transferase (GST) na região Glandular Gástrica

Estômagos previamente submetidos ao etanol 80% foram utilizados para verificar a participação da enzima glutathione S-transferase (GST) na proteção da mucosa pelo EHS. O método para a determinação da atividade da GST presente na mucosa gástrica foi realizado com base no método de HABIG et al (1974). A atividade específica da GST foi determinada pela conjugação do CDNB com a glutathione reduzida (GSH), na presença de citosol gástrico, por leitura espectrofotométrica a 340 nm. As reações foram realizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM em pH 6,5 e temperatura ambiente.

A atividade específica da GST foi expressa em nmoles/mg/min, utilizando o coeficiente de extinção da glutathione de 9,5 mM/cm.

4.2.2.4 Caracterização da atividade da catalase (CAT) na região Glandular Gástrica

Estômagos previamente submetidos ao etanol 80% foram utilizados para verificar a participação da catalase (CAT) na proteção da mucosa pelo EHS. A determinação da atividade da CAT presente na mucosa gástrica foi realizado com base no método de AEBI et al (1984). A mucosa gástrica foi homogeneizada em tampão fosfato pH 6,5. Em uma cubeta de quartzo 990 μl de solução reação 20 mM (Tampão Tris/ EDTA 5mM, pH8,0 + peróxido de hidrogênio 30% + água miliQ)

foram adicionadas a 10µl da amostra diluída, foram feitas 2 réplicas de cada amostra. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 240 nm.

4.2.2.5 Caracterização dos níveis de superóxido dismutase (SOD) na região Glandular Gástrica

Estômagos previamente submetidos ao etanol 80% foram utilizados para verificar a participação da enzima superóxido dismutase (SOD) na proteção da mucosa pelo EHS. O método para determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizado com base no método de Marklund et al (1974) e Gao et al (1998) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a autooxidação do pirogallol. As reações foram realizadas em tampão Tris HCl 200 mM com 2mM de EDTA em pH 8,5 e temperatura ambiente.

Em um eppendorf foram adicionados 442,5 µl Tampão Tris - EDTA e 20 µl de amostra. Após agitação em vortex, 25 µl de pirogallol 1 mM foram adicionados e incubado por 20 minutos. 12,5 µl de HCl 1N foram utilizados para parar a reação. Os eppendorfes foram centrifugados por 4 minutos a 14000 rpm e 300 µl do sobrenadante pipetados em microplaca para leitura em espectrofotômetro a 205 nm.

Os resultados foram comparados com o controle (Tampão Tris-EDTA com pirogallol sem incubação + média sem amostra sem incubação), sendo este valor igual a 100%. A quantidade de proteína que inibe a reação em 50% (IC₅₀) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados são expressos em U de SOD/mg de proteína.

4.2.3 Avaliação da Atividade Anti-Secretora ácida

4.2.3.1 Ligadura de Píloro

A avaliação da atividade anti-secretora ácida basal foi realizada conforme metodologia de Shay e colaboradores (1945)

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. Ratas foram anestesiadas com éter e colocadas em decúbito dorsal em uma placa de isopor. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, foi localizado o estômago e procedido a ligadura do piloro com linha. Uma hora antes da cirurgia, os animais recebem o omeprazol (40mg/kg) por via oral. Durante a cirurgia, por via intraduodenal, os animais recebem o veículo (água - 0,1 mL/100 g) e o extrato (EHS - 100, 300, 600, 1000 mg/kg e EHSp - 100, 300, 1000). A seguir, foi suturada a parede abdominal. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos com anestesia etérea profunda e seus estômagos removidos. O esôfago foi fechado através do pinçamento do esôfago para evitar perda do material secretado. O órgão foi lavado com água, secado em gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaios para a centrifugação (1500 rpm durante 30 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico foi quantificado em proveta e a acidez total ($\text{mEq}[\text{H}^+]/\text{mL}/4 \text{ h}$) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

4.2.3.2 Estudo do mecanismo de ação anti-secretor ácido

4.2.3.2 a Avaliação da atividade anti-secretora ácida estimulada por Pentagastrina, Betanecol e Histamina

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. As ratas foram anestesiadas com éter e colocadas em decúbito dorsal em uma placa de isopor. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, foi localizado o estômago e procedido a ligadura do piloro com linha. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos: betanecol + atropina; betanecol + extrato; betanecol; pentagastrina + extrato; pentagastrina; histamina + cimetidina; histamina + extrato; histamina; extrato e controle (água). No momento da ligadura

por via intraduodenal os animais receberam o veículo (água - 0,1 mL/100 g), cimetidina (60 mg/kg) e o EHS (700 mg/kg) e por via sub-cutânea a atropina (1mg/kg). A seguir, foi suturada a parede abdominal. Após 1h da ligadura os animais receberam os estímulos secretagogos s.c histamina, pentagastrina e betanecol. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos com anestesia etérea profunda e seus estômagos foram removidos após o pinçamento do esôfago para evitar a perda do material secretado. O órgão foi lavado com água, secado em gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaios para a centrifugação (1500 rpm durante 30 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico foi quantificado em proveta. A acidez total (mEq[H⁺]/mL/4 h) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base.

4.2.3.2 b Estudo da atividade enzimática da H⁺, K⁺- ATPase *in vitro* :

Isolamento das vesículas gástricas de coelho

O coelho foi morto por concussão cerebral. O estômago foi extraído, acondicionado em banho de gelo, aberto pela curvatura menor, lavado e descartadas as regiões antral e cardial. A mucosa do corpo gástrico foi rapidamente separada das camadas muscular e submucosa. A mucosa gástrica foi picada em pedaços menores, pesada, transferida para o tampão de homogeneização (Tris HCl 50 mM- pH7,4 – sacarose 250 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 5 mM, EDTA 1 mM e coquetel de inibidores de protease 0,01%) e homogeneizada. O homogenato foi centrifugado a 9000 x g por 40 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a 100000 x g por 1h, obtendo-se um precipitado com as vesículas da membrana apical contendo a H⁺, K⁺ ATPase não purificada (KUBO et al, 1995).

Purificação da H⁺, K⁺ ATPase de coelho

Realizado por centrifugação, em gradiente descontínuo de sacarose segundo método de KUBO et al (1995). O precipitado contendo a H⁺, K⁺ ATPase foi suspenso novamente em tampão de homogeneização (sacarose 250 mM, MgCl₂ 2 mM, ácido etilenoglicol-tetracético (EGTA) 1 mM e Tris HCl 50 mM – pH 7,4) e foi cuidadosamente adicionado a uma solução de sacarose 30% (1:3). Os tubos foram centrifugados a 100 000 x g por 2 horas. Duas bandas e um precipitado foram obtidos. As membranas sedimentadas na superfície da solução de sacarose 30% foram coletadas. Todos os procedimentos foram realizados a 4° C. O material enzimático foi congelado e guardado a – 70° C.

A quantificação protéica foi realizada através do kit de análise protéica BCA – Pierce, utilizando albumina bovina como padrão.

Ensaio da atividade enzimática da H⁺, K⁺ ATPase

A atividade ATPásica foi medida mediante a quantificação do fósforo inorgânico (Pi) liberado da hidrólise de ATP exógeno, na presença de K⁺. A reação teve início pela adição da proteína enzimática a 150 µl de tampão Tris HCl (pH7,4) contendo cloreto de magnésio 2,5mM, cloreto de potássio 20 mM e ATP, na ausência e na presença do extrato. A reação foi interrompida, após 20 min de incubação a 37° C pela adição de 50 µl de ATC 50% e esfriamento rápido em banho de gelo (MURAKAMI et al, 1992). A quantificação do fosfato inorgânico liberado foi realizada através da adição de 900 µl da solução reagente (4,7 ml de água; 0,7 ml de ácido sulfúrico 10 N; 0,6 ml de molibdato de amônio 2,4%; e 3 ml de ácido ascórbico 10%) nas amostras, que foram então incubadas por 20 min a 37° C. O produto obtido foi quantificado por leitura espectrofotométrica a 820 nm (Fiske & Subbarow, 1925; Tersariol, 1989). A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção do Pi ($\epsilon=11000/M/cm$).

4.2.4 Avaliação da Motilidade Gastrointestinal

4.2.4.1 Esvaziamento Gástrico de semi-sólidos

A avaliação do esvaziamento gástrico foi realizada conforme metodologia de Scarpignato e colaboradores (1980) e consiste na administração de um marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%) e na avaliação da quantidade do marcador que permanece no estômago durante um período de tempo. Camundongos, em jejum de 6 horas foram tratados e após 30 minutos ou 1 hora dos tratamentos, foi administrado o marcador colorido. O grupo controle tempo zero foi morto por deslocamento cervical logo após a administração do marcador colorido, e os outros grupos após 15 min da administração. A cavidade abdominal foi aberta, o piloro e a parte distal do esôfago foram pinçados, o estômago foi retirado com seu conteúdo e então aberto e lavado com 7 ml de água destilada. O conteúdo gástrico foi coletado e centrifugado a 1500 x g por 15 min. 0,6 ml do sobrenadante foi coletado, e adicionado a 0,6 ml de NaOH 1N (pH12). Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 560 nm, e expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero.

4.2.4.2 Trânsito Intestinal

A avaliação do trânsito intestinal foi realizada conforme metodologia de Sticney e Northup (1959). O método consiste na administração de um marcador colorido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%) e na avaliação do trajeto do mesmo no intestino delgado durante um período de tempo. Camundongos, em jejum de 6 horas, foram tratados e após 30 minutos ou 1 hora dos tratamentos, foi administrado o marcador colorido. O grupo controle tempo zero foi morto, por deslocamento cervical, logo após a administração do marcador colorido, e os

outros grupos após 15 minutos da administração. A cavidade abdominal foi aberta e o intestino delgado removido. Com auxílio de uma régua, determinou-se o comprimento total do intestino delgado de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal), e a distância percorrida pelo marcador (até a última porção que contenha pelo menos 1 cm contínuo do marcador). Os resultados foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado.

4.3 Expressão dos dados e análise estatística

Os dados foram representados como médias \pm erro padrão das médias de 6 - 7 animais por grupo nos experimentos *in vivo* e 3 amostras dos experimentos *in vitro*. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, *GraphPad Prism* versão 4.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo. As DE_{50} e CI_{50} foram calculadas pela equação $y = (m_1 \times 100) / (m_1 + m_0)$, utilizando o programa *Kaleida Graph* for Windows (*Synergy Software*, Pensylvania, EUA).

5 Resultados

5.1 Efeito do extrato hidroalcolico da *Salvia officinalis* (EHS) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.

A média das áreas das lesões provocadas por etanol 80% (0,5 ml/200 g - vo) foi de $112,4 \pm 5,73$ mm². O omeprazol, 40mg/kg (controle positivo do teste), reduziu a área das lesões em 57,98% ($47,22 \pm 6,38$ mm²). O EHS reduziu as áreas das lesões para $72,40 \pm 13,79$; $57,10 \pm 6,65$; $23,90 \pm 5,87$ e $10,25 \pm 3,14$ mm² com as doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, respectivamente. A DE₅₀ calculada do EHS foi de $80,84 \pm 11,77$ mg/kg. (Figuras 4 e 5).

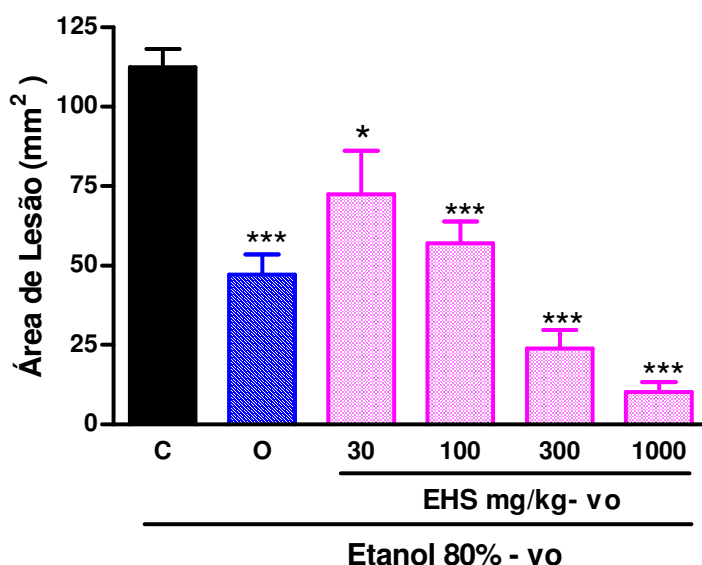


Figura 4: Efeitos do extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* (EHS: 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, vo), do Omeprazol (O: 40 mg/kg- vo) e da água (C: 1mL/kg) sobre lesões gástricas induzidas por etanol (80%, 0,5 ml/200 g - vo) em ratos fêmeas. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias de 5 a 6 animais e representam a área das lesões. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

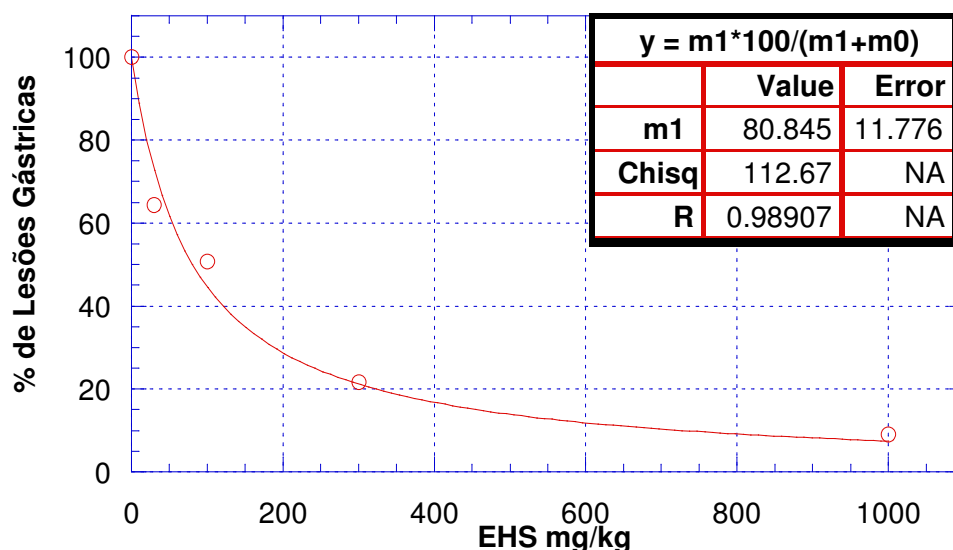


Figura 5: Efeitos do extrato hidroalcólico de *Salvia officinalis* (EHS: 30, 100, 300 e 1000mg/kg, vo), sobre lesões gástricas induzidas por etanol (80%, 0,5 ml/200 g - vo) em ratos fêmeas. Os resultados estão expressos como porcentagem da média da área de lesões produzidas na mucosa gástrica de 5 a 6 animais, considerando os estômagos dos grupos controle como 100% lesionados.

5.1.2 Efeitos do extrato hidroalcólico da *Salvia officinalis* pós percolação (EHSp) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.

No grupo controle (C: animais que receberam apenas água), a média das áreas das lesões provocadas por etanol 80% foi de $90,94 \pm 8,17 \text{ mm}^2$. O omeprazol, controle positivo do teste, reduziu a área das lesões para $38,06 \pm 8,9 \text{ mm}^2$ (58,15%). O EHSp manteve as lesões dos grupos de dose 100 e 300 mg/kg ($93,50 \pm 8,5$ e $93,33 \pm 17,62 \text{ mm}^2$, respectivamente) semelhantes a área das lesões do grupo controle. A dose de 1000 mg/kg reduziu a área das lesões para $93,50 \pm 7,06 \text{ mm}^2$ (66,92%) (Fig 6).

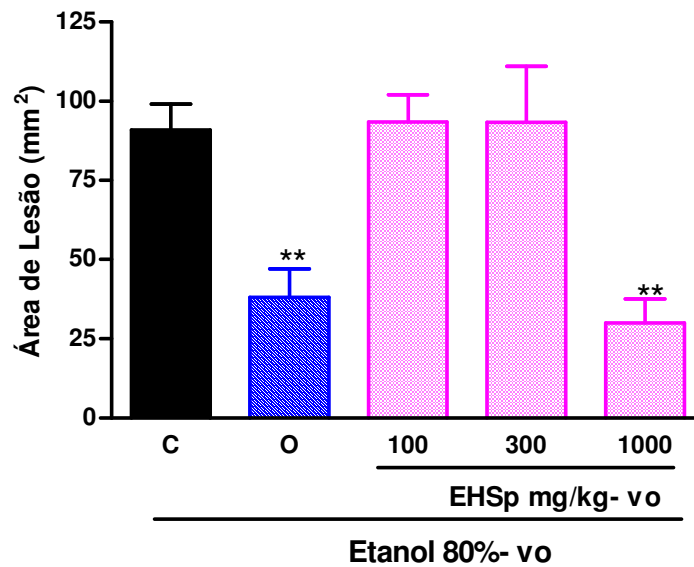


Figura 6: Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* pós percolação (EHSp 100, 300 e 1000mg/kg, vo), do Omeprazol (O: 40 mg/kg- vo) e da água (C: 1mL/kg) sobre lesões gástricas induzidas por etanol (80%, 0,5 ml/200 g - vo) em ratos fêmeas. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de 5 a 6 animais e representam a área das lesões. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

CL= controle lesado e O= omeprazol

** Diferente do grupo controle para $p < 0,01$.

5.1.3 Efeitos do extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* (EHS) sobre as lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratos:

No grupo controle (C: ratos tratados apenas com água), a média das áreas das lesões provocadas por ácido acético 20% foi de $106,70 \pm 22,56 \text{ mm}^3$. O omeprazol, controle positivo do teste, reduziu a área das lesões para $24,72 \pm 5,3 \text{ mm}^3$ (75,22%). O EHS reduziu a área das lesões para $43,92 \pm 8,9$; $35,73 \pm 5,74$; $25,25 \pm 3,95$ e $22,4 \pm 5,15 \text{ mm}^3$ com as doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente (Fig 7).

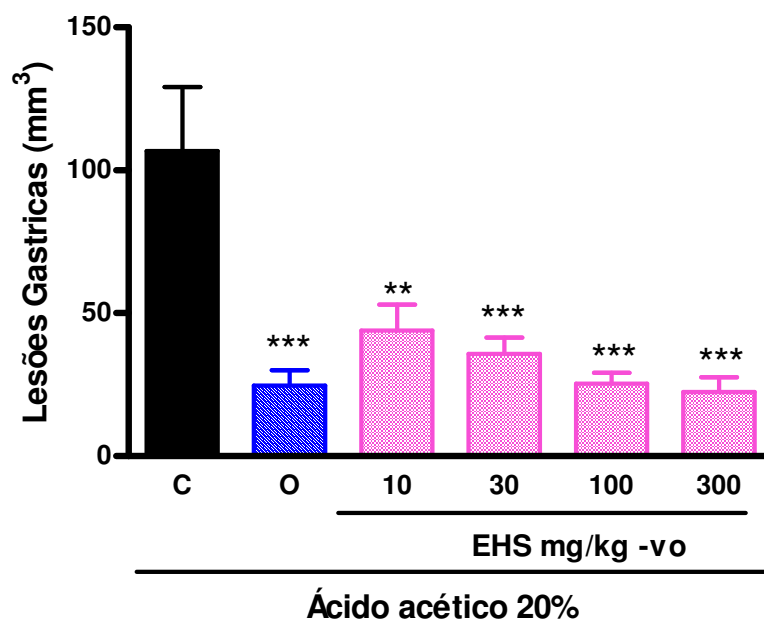


Figura 7: Efeitos do extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* (EHS: 10, 30, 100, 300 mg/kg, vo), do Omeprazol (O: 20 mg/kg- vo) e da água (C: 1mL/kg) em ratos fêmeas após indução de lesões gástricas por ácido acético 20%. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de 5 a 6 animais e representam a área das lesões. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

** Diferente do grupo controle para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

5.2 Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetor da *Salvia officinalis* L.

5.2.1 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) sobre o seqüestro do radical livre DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazil):

O grupo controle, na ausência do EHS, apresentou atividade seqüestrante do radical DPPH de $0,2853 \pm 0,021$ nm. O ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, reduziu os níveis de DPPH em 68,10% ($0,091 \pm 0,002$ nm). O EHS nas concentrações de 30, 100 e 300 $\mu\text{g/ml}$ reduziu os níveis de DPPH em 25,45% ($0,2127 \pm 0,005$ nm), 77,57% ($0,064 \pm 0,004$ nm) e 92,76% ($0,02067 \pm 0,005$ nm), respectivamente; com uma CI_{50} de $49,30 \pm 12,97$ $\mu\text{g/ml}$ (Figs 8 e 9).

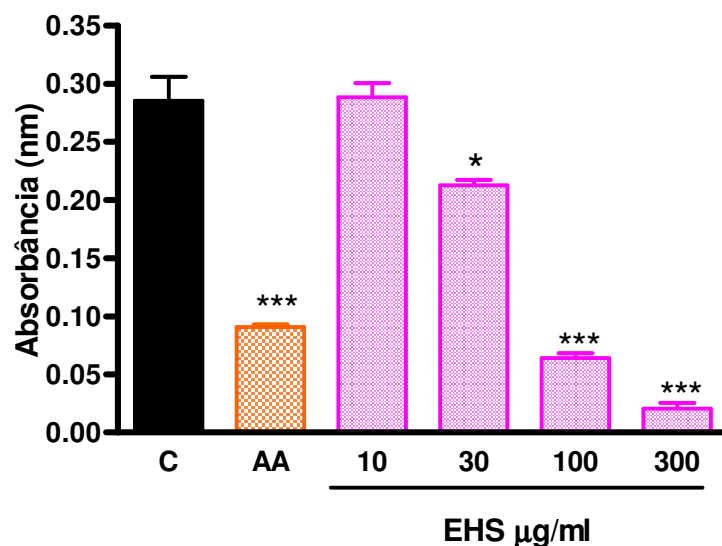


Figura 8: Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS: 10, 30, 100, 300, $\mu\text{g/ml}$) e do ácido ascórbico (AA: 50 $\mu\text{g/ml}$) na capacidade de seqüestro do radical livre DPPH. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

*Diferente do grupo controle para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$.

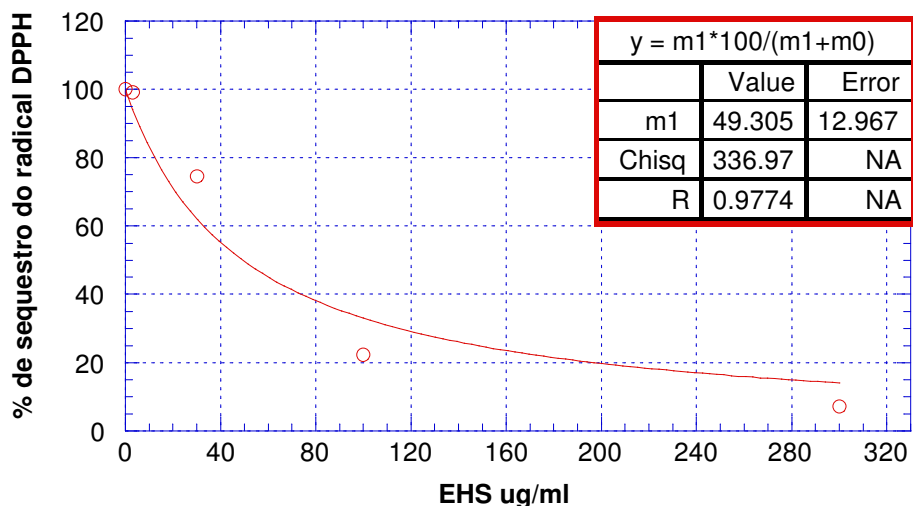


Figura 9: Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS: 3,10, 30, 100, 300, µg/ml), sobre a o seqüestro do radical livre DPPH. Os resultados estão expressos em % de seqüestro, considerando 100% o seqüestro do DPPH na ausência de EHS.

5.2.2 Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHSp) pós percolação no seqüestro do radical livre DPPH:

O grupo controle, na ausência do EHSp, apresentou atividade seqüestrante do radical livre DPPH de $0,2853 \pm 0,021$ nm. O ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, reduziu os níveis de DPPH em 68,10%. O EHSp reduziu os níveis de DPPH nas concentrações de 10, 30, 100 e 300 µg/ml em 23,94%, 45,78%, 53,25 e 52,58%, respectivamente (Fig.10)

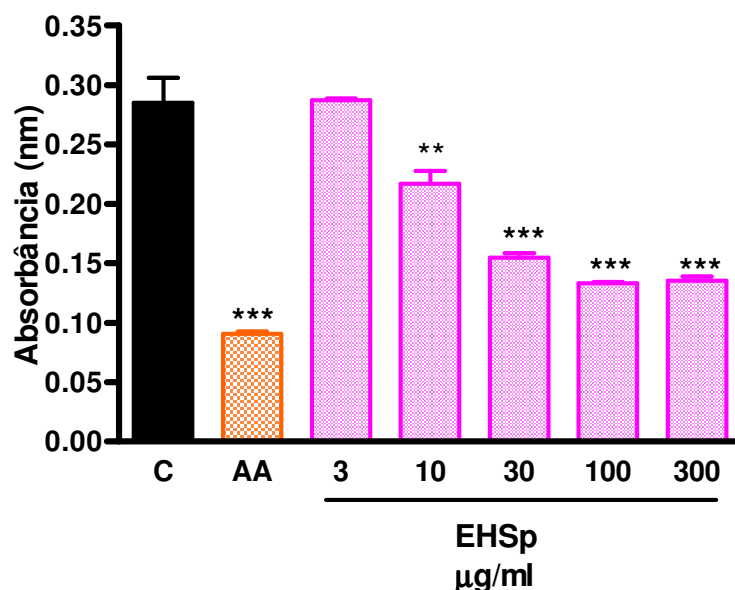


Figura 10: Efeitos do extrato hidroalcoólico pós percolação de *Salvia officinalis* (EHSp:3, 10, 30, 100, 300, µg/ml) e do ácido ascórbico (AA: 50 µg/ml) na capacidade de seqüestro do radical livre DPPH. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

** Diferente do grupo controle para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

5.2.3 Efeitos do extrato hidroalcoólico da *Salvia officinalis* sobre os níveis de glutathiona (GSH) gástricos após a indução de lesões gástricas com Etanol 80% em ratos.

Os níveis de GSH gástricos no grupo de animais que não recebeu etanol (CNL: controle não lesado) foram de $1709 \pm 50,07$ µg/g de tecido (Fig. 9). A administração de etanol 80% (CL: controle lesado) reduziu os níveis de GSH gástricos em 26% ($1262 \pm 35,64$ µg/g de tecido). O EHS (30, 100, 300 mg/kg) não foi capaz de impedir a queda dos níveis de GSH gástricos induzida pela administração de etanol (Fig 11).

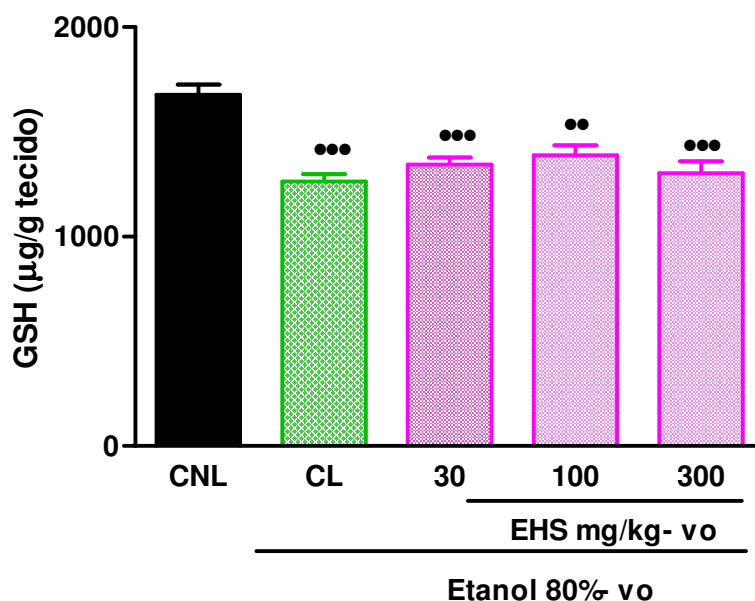


Figura 11: Efeitos do extrato hidroalcóolico de *Salvia officinalis* (EHS: 30, 100, 300 mg/kg) sobre os níveis de glutatona (GSH) gástrico, após indução de lesões gástricas por etanol 80% em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de 5 a 6 animais e representam os níveis de GSH gástricos, após a indução de lesões por etanol. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Bonferroni.

●● Diferente do grupo controle não lesado (CNL) para $p < 0,01$ e ●●● para $p < 0,001$.

5.2.4 Efeitos do extrato hidroalcóolico da *Salvia officinalis* sobre a atividade da enzima Glutationa S-transferase (GST) Gástrica após a Indução de lesões gástricas com Etanol 80% em ratos.

A atividade da GST presente na região glandular gástrica do grupo de animais que não recebeu etanol (CNL: controle não lesado) foi de $93,8 \pm 3,06$ nmoles/mg/min (Fig.10). A administração de etanol 80% (C) aumentou a atividade da GST para $136,4 \pm 6,57$ nmoles/mg/min. O EHS nas doses de 30 e 100 mg/kg foi

capaz de impedir o aumento da atividade da GST induzido pela administração de etanol (Fig.12).

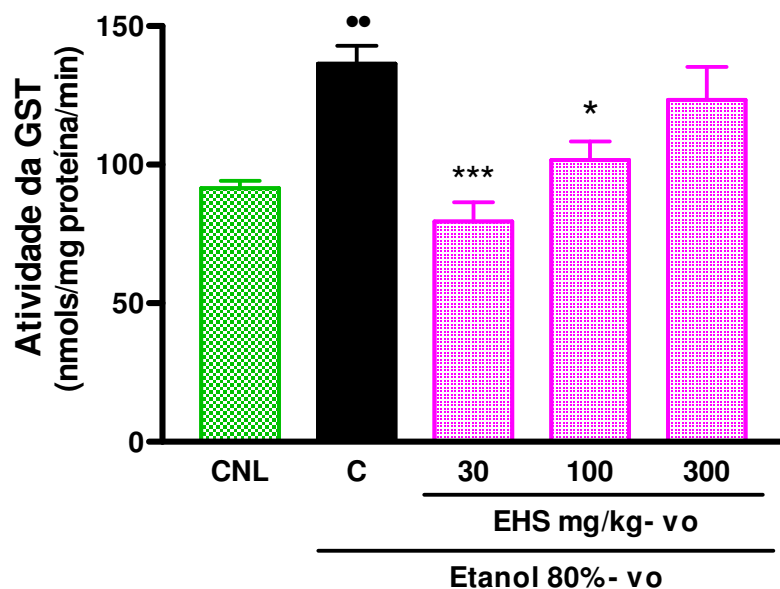


Figura 12: Efeitos do extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* (EHS: 10, 30, 100 mg/kg), sobre a atividade da enzima Glutationa S-transferase (GST) da região glandular gástrica, após indução de lesões gástricas por etanol 80% em ratos. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de 5 a 6 animais e representam a taxa de conjugação com GSH. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni.

•• Diferente do controle lesado não lesado para $p < 0,01$.

* Diferente do grupo controle lesado para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$.

5.2.5 Efeitos do extrato hidroalcolico da *Salvia officinalis* sobre a atividade da enzima Catalase (CAT) Gástrica após a Indução de lesões por Etanol 80% em ratos.

A atividade da CAT na região glandular gástrica do grupo de animais que não recebeu etanol (CNL) foi de $0,0108 \pm 0,0006$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{mg}$ proteína. A administração de etanol 80% (C) aumentou a atividade da CAT para $0,0191 \pm 0,00025$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{mg}$ proteína. O EHS, nas três doses testadas (30, 100 e 300 mg/kg) foi capaz de impedir o aumento da atividade da CAT provocado pela lesão

da mucosa gástrica pelo etanol, ficando com valores de $0,011 \pm 0,0012$; $0,0104 \pm 0,0005$; $0,008 \pm 0,0006$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{mg}$ proteína, respectivamente. (Fig 13)

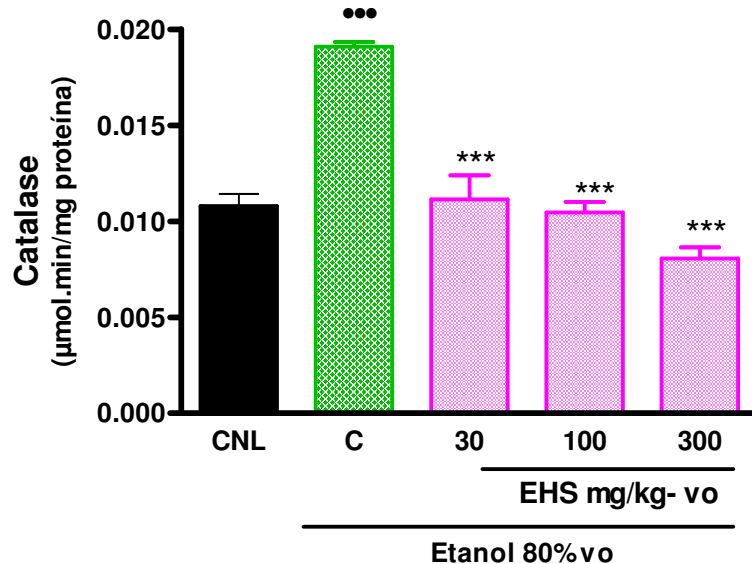


Figura 13: Efeitos do extrato hidroalcólico de *Salvia officinalis* (EHS: 30, 100, 300 mg/kg), do omeprazol (40 mg/kg) e da água (1ml/kg) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) da região glandular gástrica, após indução de lesões gástricas por etanol. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de 5 a 6 animais. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni.

*** Diferente do controle lesado para $p < 0,001$.

●●● Diferente do grupo controle não lesado para $p < 0,05$.

5.2.6 Efeitos do extrato hidroalcolico da *Salvia officinalis* sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) Gástrica após a Indução de lesões por Etanol 80% em ratos

Os níveis de SOD na região presente na região glandular gástrica do grupo de animais que não recebeu etanol (CNL: controle não lesado) foi de $4,1 \pm 0,20$ U SOD/ mg de proteínas. A administração de etanol 80% (C) aumentou os níveis da SOD para $6,42 \pm 0,68$ U SOD/ mg de proteínas. O EHS, nas três doses testadas (30, 100 e 300 mg/kg) foi capaz de impedir o aumento dos níveis da SOD provocado pela lesão da mucosa gástrica pelo etanol, ficando com valores de $4,09 \pm 0,21$; $4,707 \pm 0,19$; $3,765 \pm 0,51$ U de SOD/mg proteína, respectivamente (Fig. 14)

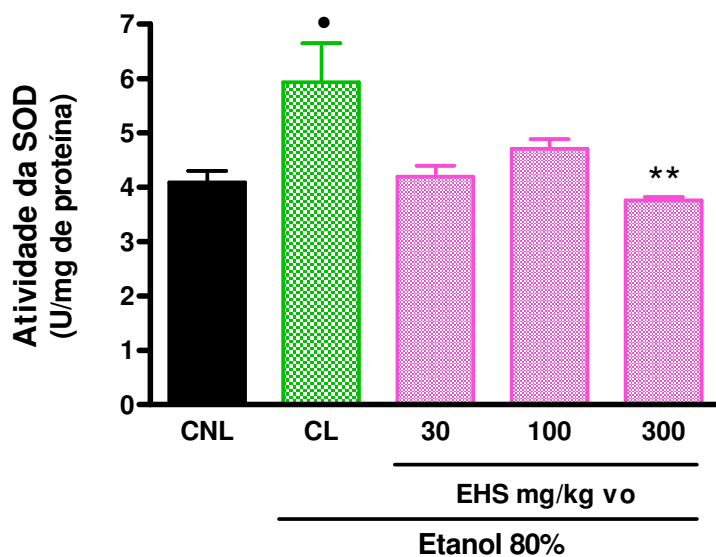


Figura 14: Efeitos do extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* (EHS: 10, 30, 100 mg/kg), e água (1ml/kg) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) da região glandular gástrica, após indução de lesões gástricas por etanol 80% em ratos. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de 5 a 6 animais. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni.

** Diferente do controle lesado (C) para $p < 0,01$.

• Diferente do grupo controle não lesado (CNL) para $p < 0,05$.

5.3 Avaliação dos efeitos dos extratos da *Salvia officinalis* L sobre a secreção ácida gástrica em ratos.

5.3.1 Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) sobre a secreção ácida gástrica basal.

No grupo de animais tratados apenas com água (C), o volume total do conteúdo gástrico secretado durante 4 horas foi de $6,425 \pm 0,52$ ml, e a acidez total foi de $47,92 \pm 5,65$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]/\text{ml}$. O EHS reduziu o volume da secreção gástrica para $4,1717 \pm 0,31$; $3,68 \pm 0,26$; $3,18 \pm 0,08$ ml com as doses de 300, 600 e 1000 mg/kg, respectivamente. A acidez total do conteúdo gástrico foi reduzida em 54,09% e 71,47%, com as doses de 600 e 1000 mg/kg, respectivamente, com uma DE_{50} de $660,8 \pm 224,51$ mg/kg. O omeprazol reduziu o volume de conteúdo gástrico para $4,9 \pm 0,17$ ml e a acidez para $15,62 \pm 2,91$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]/\text{ml}$ (Fig15).

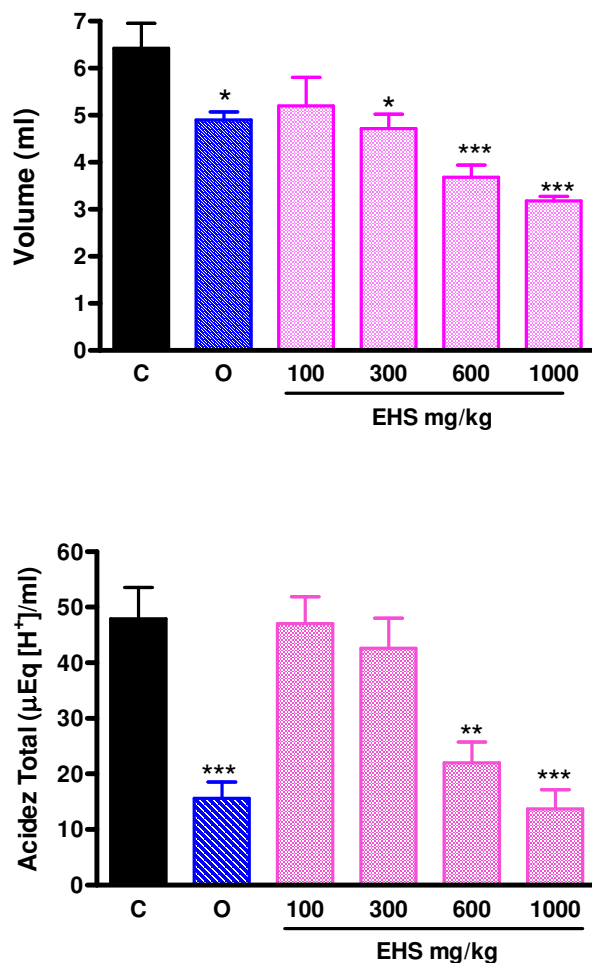


Figura 15: Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS: 100, 300 e 1000mg/kg, vo), do Omeprazol (O: 40 mg/kg- vo) e da água (C: 1mL/kg) sobre o volume e a acidez total da secreção gástrica, após 4 horas da ligadura do piloro em ratos fêmeas. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni

** Diferente do grupo controle para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

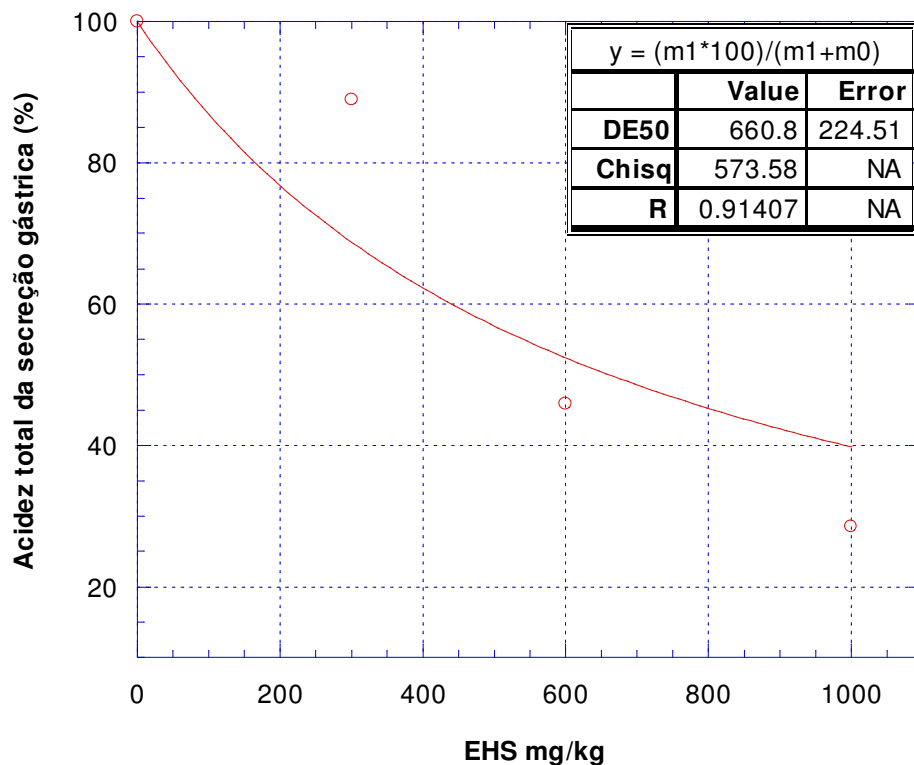


Figura 16: Efeito do EHS sobre a acidez do conteúdo gástrico secretado. Os resultados estão expressos como porcentagem da acidez da secreção ácida gástrica dos grupos tratados em relação ao grupo controle.

5.3.2 Efeitos do extrato hidroalcolóico de *Salvia officinalis* pós-percolação (EHSp) sobre a secreção ácida gástrica basal em ratos.

No grupo controle, o volume de conteúdo gástrico secretado foi de $6,858 \pm 0,58$ ml e a acidez total foi de $88,3 \pm 19,86$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]/\text{ml}$. O omeprazol reduziu a acidez do conteúdo gástrico para $35,33 \pm 11,4$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]/\text{ml}$. O tratamento dos animais com o EHSp com a dose de 100 mg/kg reduziu o volume da secreção em 35,55% e reduziu a acidez total em 56,06% e 45,93% com as doses de 100 e 1000 mg/kg, respectivamente (Fig.16).

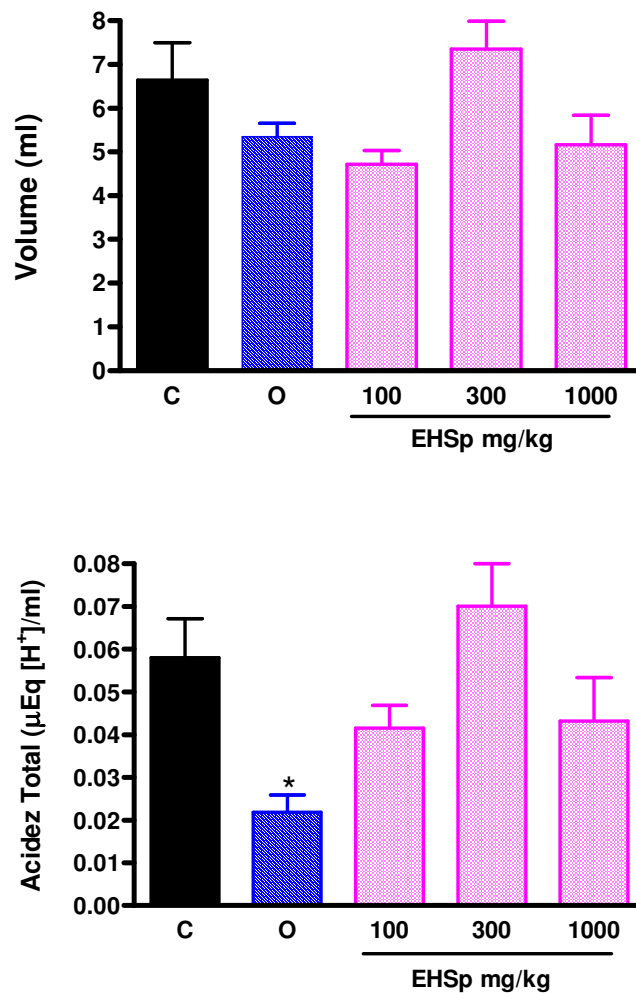


Figura 16: Efeitos do extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* pós percolação (EHSp: 100, 300 e 1000mg/kg, vo), do Omeprazol (O: 40 mg/kg- vo) e da água (C: 1mL/kg) sobre o volume e acidez total da secreção gástrica, após 4 horas da ligadura do piloro em ratos fêmeas. A correlação entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.4 Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina em ratos.

O volume secretado durante 4 horas após a ligadura do piloro foi de $7,44 \pm 0,6124$ ml e a acidez total foi de $61 \pm 3,7$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]/\text{ml}$. A Pentagastrina, administrada pela via subcutânea (sc) estimulou a liberação da secreção ácida gástrica, aumentando o volume e a acidez total do conteúdo gástrico em 41% e 49%, respectivamente. O EHS (700 mg/kg) não impediu o aumento do volume e da acidez total do conteúdo gástrico estimulado pela pentagastrina. A dose de EHS foi escolhida a partir do resultado obtido previamente na secreção ácida basal, quando a DE_{50} foi de $660,8 \pm 224,51$ mg/kg (Fig.17).

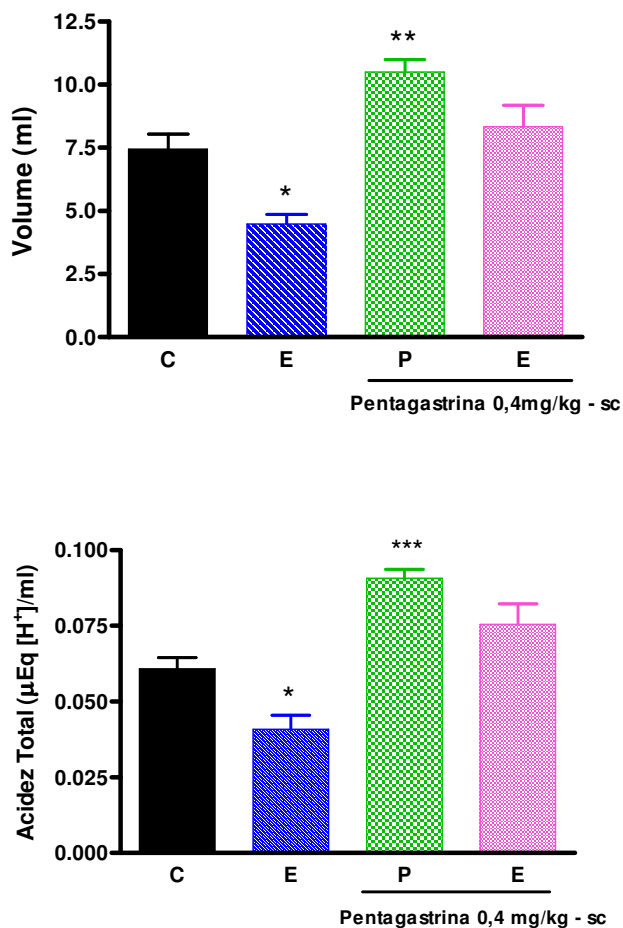


Figura 17: Efeito do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina (0,4 mg/kg-sc). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de 6 animais e representam o volume e a acidez total da secreção gástrica, após 4 horas de ligadura do piloro em ratos. A correlação entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

*Diferente do grupo controle para $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.5 Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol em ratos.

Após 4 horas da ligadura do piloro o volume de conteúdo gástrico secretado foi de $7,44 \pm 0,6124$ ml e a acidez total foi de $61 \pm 3,7$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]/\text{ml}$. O

Betanecol, (2,5mg/kg) administrado pela via subcutânea (sc) estimulou a secreção ácida gástrica, aumentando o volume e a acidez total do conteúdo gástrico em 54% e 20%, respectivamente durante as 4 horas de ligadura do piloro. O EHS (700mg/kg) não conseguiu impedir o aumento da acidez da secreção, porém reduziu o volume da secreção estimulada por betanecol em 18% . A dose de EHS foi escolhida a partir do resultado obtido previamente na secreção ácida basal, quando a DE_{50} foi de $660,8 \pm 224,51$ mg/kg (Fig.18)

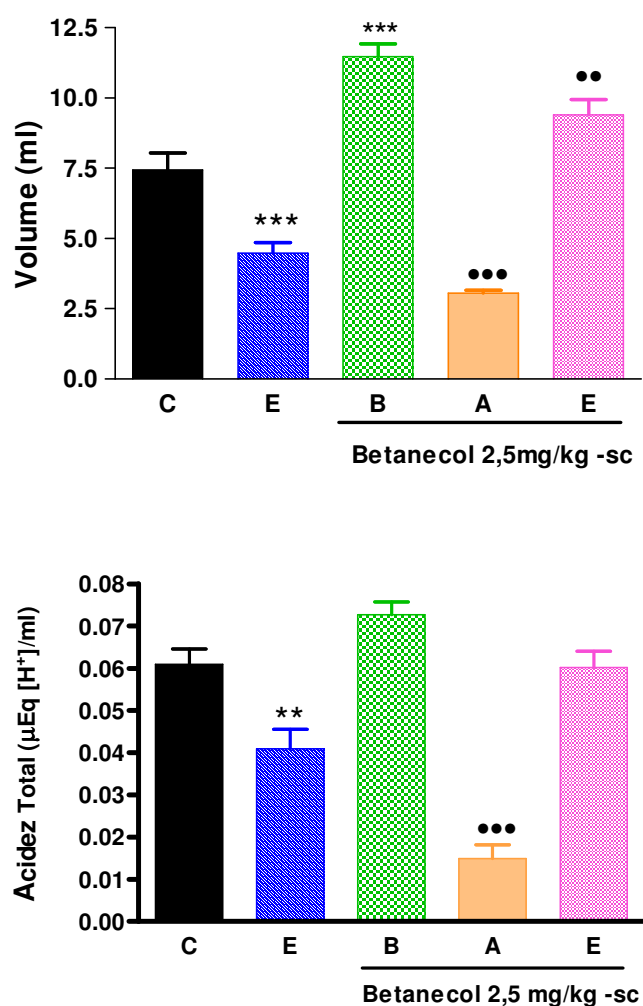


Figura 18: Efeito do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol (B: 2,5 mg/kg-sc). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de 6 animais e representam o volume e acidez total da secreção gástrica, após 4 horas de ligadura do piloro em

ratos. A correlação entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

Diferente do grupo controle $p < 0,01$ e * $p < 0,001$.

●● Diferente do grupo betanecol para $p < 0,01$ e ●●● para $p < 0,001$

5.3.6 Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por Histamina em ratos.

Após 4 horas da ligadura do piloro, o volume do conteúdo gástrico secretado (C: grupo controle) foi de $7,44 \pm 0,6124$ ml e a acidez total de $61 \pm 3,7$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]/\text{ml}$. A Histamina (H: 20mg/kg), administrada pela via subcutânea (sc) estimulou a secreção ácida gástrica, aumentando a acidez total do conteúdo gástrico em 62%. O EHS (700mg/kg) conseguiu impedir o aumento do volume e da acidez total estimulada pela histamina em 28% e 23%, respectivamente. A dose de EHS foi escolhida a partir do resultado obtido previamente na secreção ácida basal, quando a DE_{50} foi de $660,8 \pm 224,51$ mg/kg.(Fig.19)

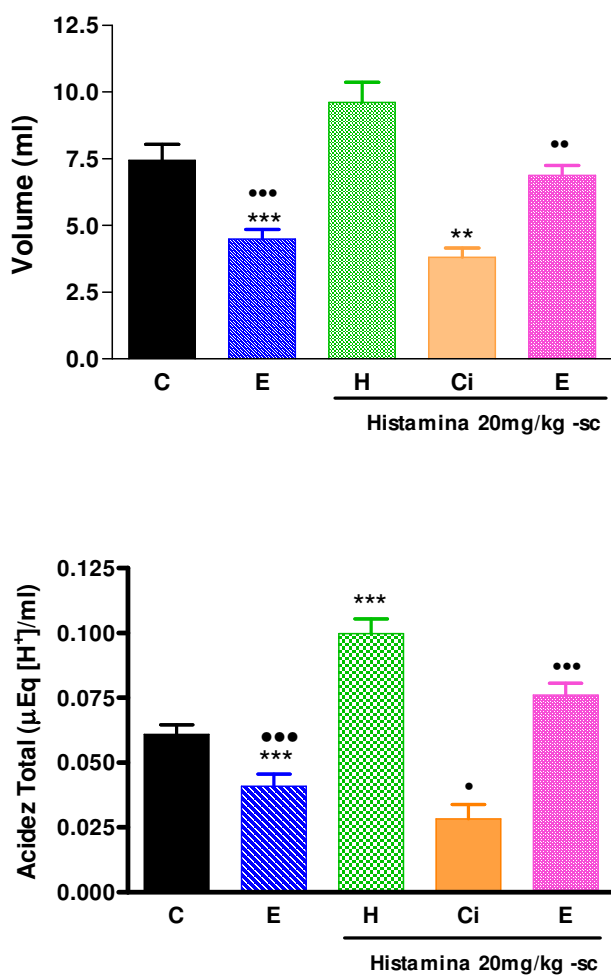


Figura 19: Efeito do EHS sobre a secreção ácida gástrica estimulada por histamina. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de 6 animais e representam o volume e acidez total da secreção gástrica, após 4 horas de ligadura do piloro. A correlação entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

Diferente do grupo controle para $p < 0,01$ e * $p < 0,001$.

● Diferente do grupo histamina para $p < 0,05$; ●● para $p < 0,01$ e ●●● para $p < 0,001$.

5.3.7 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) sobre a atividade da H⁺, K⁺-ATPase

A porcentagem de inibição da atividade da H⁺, K⁺ - ATPase foi avaliada considerando o grupo controle como 100% de atividade. O omeprazol nas concentrações de 0,173 mg/ml e 0,345 mg/ml inibiu a atividade da enzima em 49,2% e 94,8%, respectivamente. As concentrações de 0,03, 0,1 e 0,3 mg/ml inibiram a atividade da enzima em 7,86%, 46,41% e 66,52%, respectivamente. A Cl₅₀ calculada foi de 175,77 ± 51,69 µg/ml (Fig. 20 e 21).

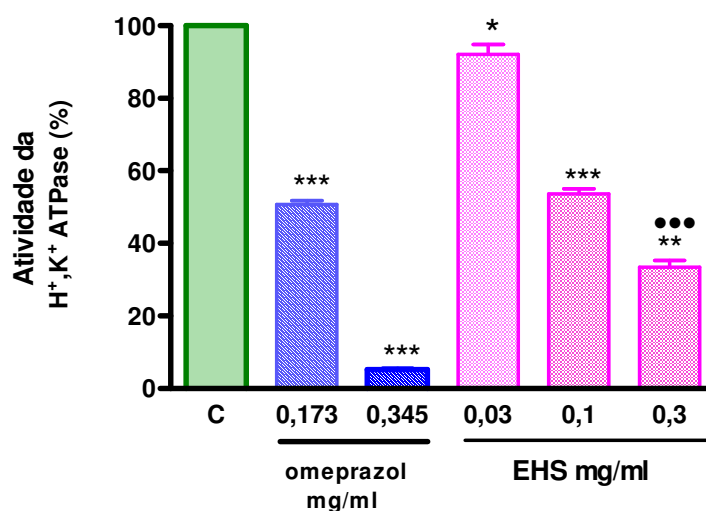


Figura 20: Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS: 30, 100, 300 e 1000 µg/ml) e do omeprazol (0,173 e 0,345 mg/ml), sobre a atividade da H⁺, K⁺ ATPase. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

*Diferente do grupo controle para p <0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001

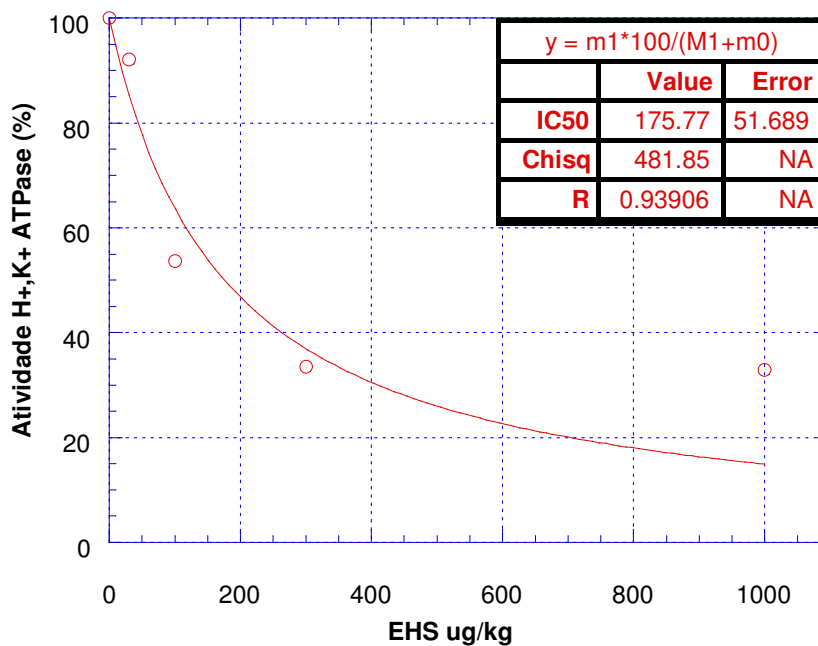


Figura 21: Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS: 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$), sobre a atividade da H^+ , K^+ -ATPase gástrica isolada de coelho. Os resultados estão expressos em % da atividade ATPásica, considerando 100% de atividade da H^+ , K^+ -ATPase na ausência de EHS. As CI_{50} foram calculadas pela equação $y = (m1 \times 100) / (m1 + m0)$, utilizando o programa Kaleida Graph for Windows (Synergy Software-Pensylvania).

5.3.8 Efeito do extrato hidroalcolico pós percolação de *Salvia officinalis* (EHSp) sobre a atividade da H⁺, K⁺-ATPase

A porcentagem de inibição da atividade da H⁺, K⁺ ATPase foi avaliada considerando o grupo controle como 100% de atividade. O omeprazol nas concentrações de 0,173 mg/ml e 0,345 mg/ml inibiu a atividade da enzima em 49,2% e 94,8%, respectivamente. As concentrações de EHSp 300 e 1000 µg/ml inibiram a atividade da enzima em 72,6% e 78%. (Fig.22)

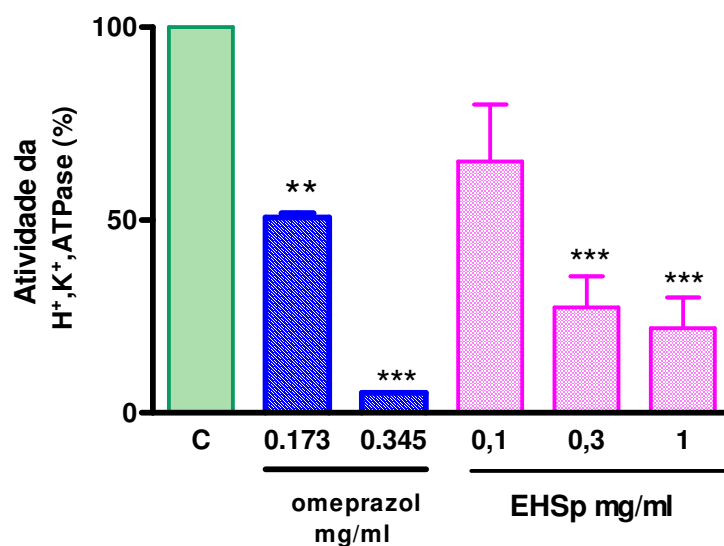


Figura 22: Efeitos do extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* pós percolação (EHSp : 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/ml) e do omeprazol (0,173 e 0,345 mg/ml) sobre a atividade da H⁺, K⁺ ATPase. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para p <0,05.

5.3.8 Estudo das ações dos compostos isolados da *Salvia officinalis* L.

Efeito do composto abietano isolado da *Salvia officinalis* sobre a atividade da enzima H⁺, K⁺ ATPase

A porcentagem de inibição da atividade da H⁺, K⁺ ATPase foi avaliada considerando o grupo controle como 100% de atividade. O omeprazol nas concentrações de 0,173 mg/ml e 0,345 mg/ml inibiu a atividade da enzima em 49,2% e 94,8%, respectivamente. O abietano inibiu a atividade da enzima em 29,59%, 46,07% e 72,62% nas concentrações de 0,28; 2,8 e 28 mg/ml, respectivamente. (Fig 23)

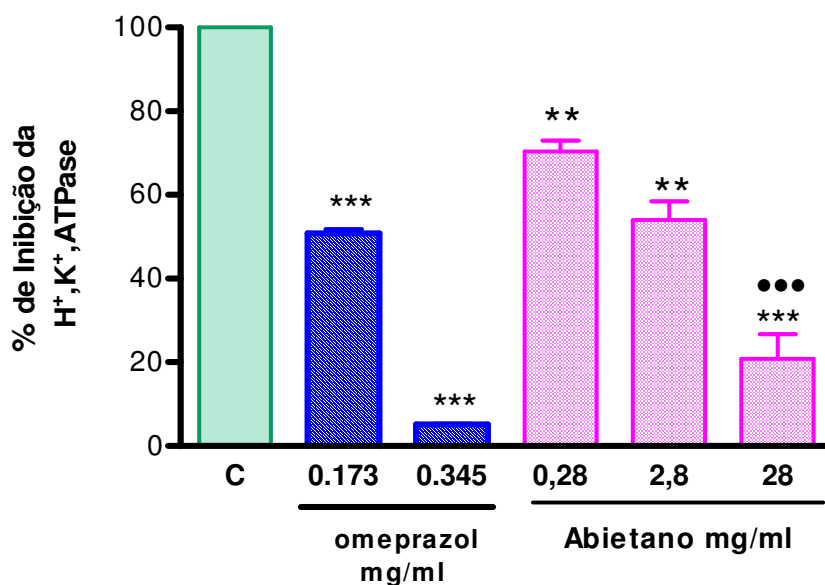


Figura 23: Efeito do composto abietano (0,28; 2,8 e 28 mg/ml) e do omeprazol (0,173 e 0,345 mg/ml) sobre a atividade da H⁺, K⁺ ATPase. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

*Diferente do grupo omeprazol p < 0,05

Efeito do composto ácido oleanólico isolado da *Salvia officinalis* sobre a atividade da enzima H⁺, K⁺ ATPase

A porcentagem de inibição da atividade da H⁺, K⁺ ATPase foi avaliada considerando o grupo controle como 100% de atividade. O omeprazol nas concentrações de 0,173 mg/ml e 0,345 mg/ml inibiu a atividade da enzima em 49,2% e 94,8%, respectivamente. O ácido oleanólico não foi capaz de inibir a atividade da H⁺, K⁺-ATPase em nenhuma das doses testadas.

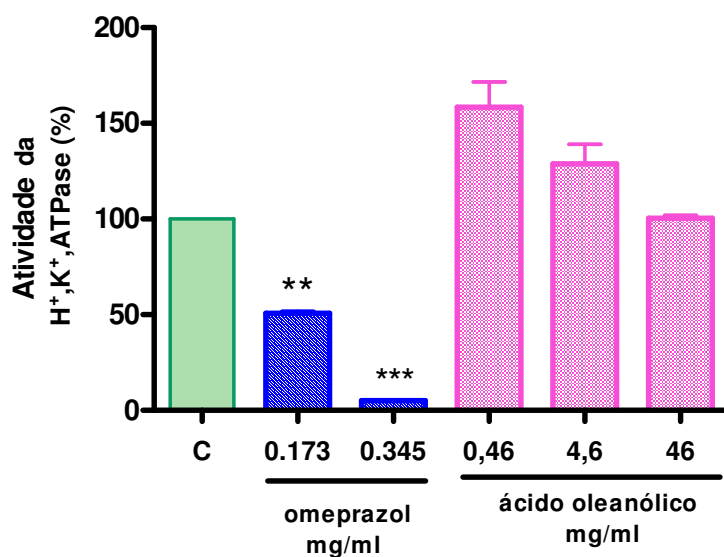


Figura 24: Efeito do composto ácido oleanólico (0,46; 4,6 e 46 mg/ml) e do omeprazol (0,173 mg/ml e 0,345 mg/ml) sobre a atividade da H⁺, K⁺ ATPase. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

*Diferente do grupo omeprazol p < 0,05

5.4 Avaliação das ações do extrato hidroalcolóico (EHS) e do extrato hidroalcolóico pós percolação (EHSp) de *Salvia officinalis* sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos.

5.4.1 Efeitos do extrato hidroalcolóico percolado (EHS) de *Salvia officinalis* sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos.

Em 30 minutos, o marcador colorido percorreu $64,77 \pm 3,29\%$ do comprimento total do intestino delgado dos camundongos tratados apenas com água (controle). O tratamento com a atropina (3 mg/kg) reduziu a distância percorrida pelo marcador em 67,40%. O EHS em nenhuma das doses testadas foi capaz de alterar o trânsito intestinal. O esvaziamento gástrico do grupo de animais tratados apenas com água (controle) foi de $52,74 \pm 9,25\%$. A metoclopramida (30 mg/kg), aumentou o esvaziamento gástrico em 44,14% e o tratamento dos camundongos com EHS na dose de 300 mg/kg reduziu o esvaziamento em 47,40%. (Fig. 25)

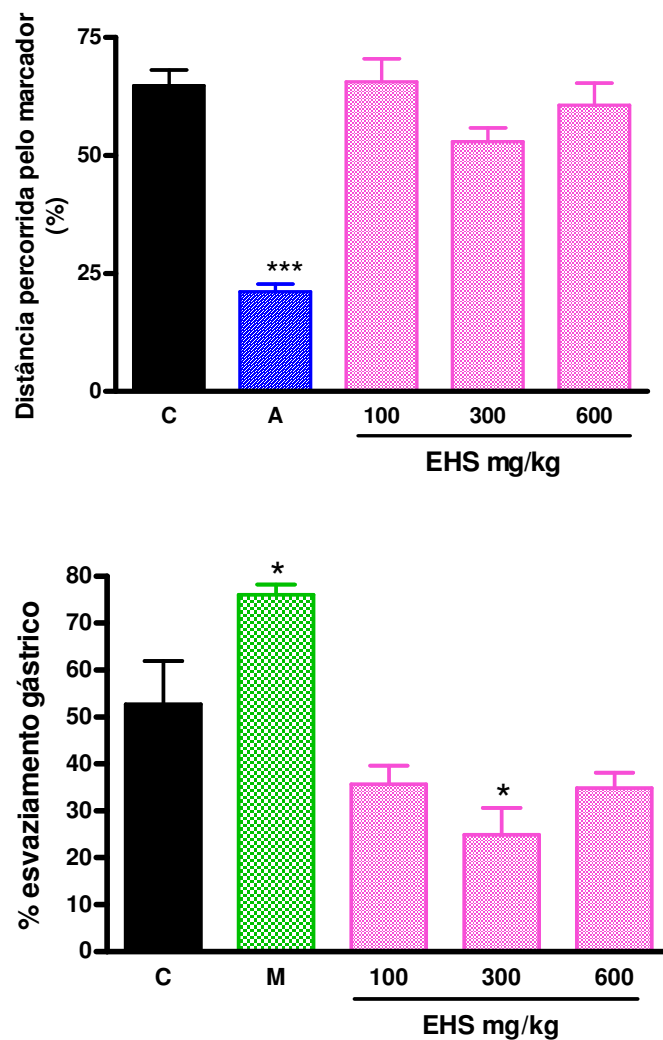


Figura 25: Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS: 100, 300, 600 mg/kg, vo), da atropina (A: 3 mg/kg) metoclopramida (M: 30 mg/kg) e da água (C: 1mL/kg) sobre a distância percorrida pelo marcador colorido no intestino delgado e sobre o esvaziamento gástrico em camundongos fêmeas. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 a 7 animais. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

*** Diferente do grupo controle para $p < 0,001$ e * para $p < 0,05$.

5.4.2 Efeitos do extrato hidroalcoólico pós-percolação de *Salvia officinalis* (EHSp) sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos.

A distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado dos animais tratados apenas com água (grupo controle) foi de $60,67 \pm 3,02\%$. O EHSp reduziu em 31,78% o trânsito intestinal com a dose de 300 mg/kg. A atropina (3 mg/kg) reduziu o trânsito intestinal em 64,35%. O esvaziamento gástrico que foi de $76,77 \pm 3,10\%$ no grupo de animais tratados apenas com água (grupo controle) não foi alterado pelo EHSp, com nenhuma das doses testadas (100, 300, 1000 mg/kg) (Fig. 26).

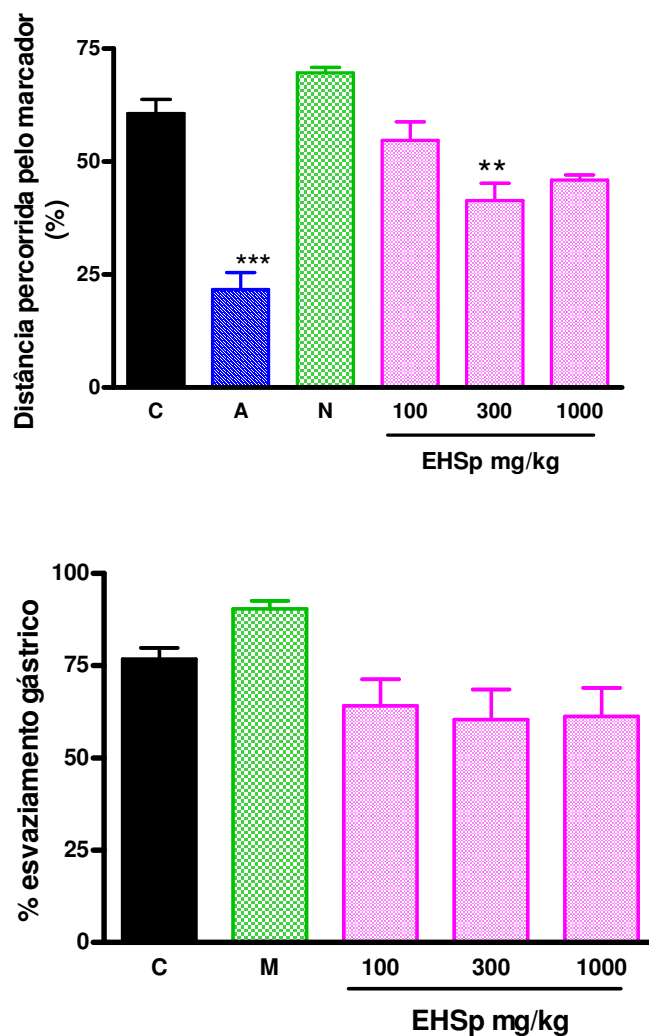


Figura 24 Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* pós percolação (EHSp: 100, 300, 1000 mg/kg, vo), da atropina (A: 3 mg/kg), metoclopramida (M: 30 mg/kg) e da água (C: 1mL/kg) sobre a distância percorrida pelo marcador colorido no intestino delgado e sobre o esvaziamento gástrico de camundongos fêmeas. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 a 7 animais. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

*Diferente do grupo controle para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

6 Discussão

A *Salvia officinalis*, popularmente conhecida como sálvia, é muito utilizada na culinária. Na medicina popular o seu uso é baseado nas descrições de seus efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e digestivos. Como a maioria das informações existentes sobre as ações digestivas da *Salvia officinalis* L. são apenas relatos populares sem o devido embasamento científico, o objetivo deste trabalho foi avaliar, através de metodologias padronizadas e validadas internacionalmente, a ação dos extratos hidroalcoólicos de *Salvia officinalis* L. na proteção gástrica e definir o mecanismo de ação responsável por esta ação.

A atividade protetora gástrica da *Salvia officinalis* foi monitorada em modelos *in vivo* através da indução de lesões gástricas agudas por etanol 80%. Sabe-se que os danos provocados pelo etanol na mucosa gástrica resultam de distúrbios de micro-circulação, isquemia e aparecimento de radicais livres, liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos, inibição da síntese de prostaglandinas e conseqüente diminuição da produção de muco (SAMONINA et al, 2004).

Tanto o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) quanto o extrato hidroalcoólico pós percolação de *Salvia officinalis* (EHSp) protegeram a mucosa gástrica contra as lesões induzidas por etanol, porém o EHS foi aproximadamente 10 vezes mais potente que o extrato pós-percolação, além de ter mostrado efeito progressivamente maior com o aumento da dose.

O envolvimento de ROS na patogênese das úlceras gástricas foi evidenciada primeiramente em estudos utilizando modelos de indução de úlceras gástricas por isquemia-reperfusão. Porém, existem inúmeros estudos que demonstram que a capacidade ulcerogênica do etanol, antiinflamatórios não esteroidais e *Helicobacter pylori* é mediada por ROS. Além disso, as ROS também têm papel importante na indução de úlceras por estresse. Com o estresse oxidativo, os níveis de antioxidantes endógenos são reduzidos, resultando em uma mucosa mais vulnerável a danos. Quando as espécies reativas atingem a mucosa gástrica, um grupo de células morre quando as ROS superam as defesas

antioxidantes, outro grupo de células parcialmente danificadas pode morrer através do processo de apoptose, o qual pode ser estimulado pelas ROS atuando como segundos mensageiros. Entretanto, a possibilidade da morte das células devido à necrose da mucosa gástrica sempre permanece, ou seja, qualquer que seja a via responsável pela morte das células, resulta em ulcerações da mucosa gástrica causada por estresse oxidativo, provocado pelas ROS (Bandyopadhyay et al, 2001).

Recentemente, GAZZIERI et al (2007), demonstraram que o etanol ativa receptores TRPV1 em neurônios sensoriais da mucosa gástrica, estimulando a liberação de substância P no estômago. A substância P ativa receptores NK1 das células epiteliais gástricas promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio, causando lesões hemorrágicas da parede do estômago. Vários estudos demonstram a ação antioxidante da *Salvia officinalis* L. Muitos atribuem a atividade antioxidante do gênero *Salvia* à presença dos diterpenos do tipo abietano (ácido carnósico e carnosol) (LAMAISON et al, 1990) e derivados do ácido caféico, como o ácido rosmarínico (CUVELIER et al, 1994), além dos flavonóides e alguns componentes do óleo essencial (LU & FOO, 2001). Para verificar se o sistema antioxidante está envolvido no mecanismo protetor dos extratos da *Sálvia* contra as lesões agudas induzidas por etanol, foi analisada a ação do extrato como seqüestrador de radicais livres e sobre a atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A atividade seqüestradora de radicais livres do EHS e do EHSp foi realizada por meio da reação com DPPH “in vitro”. O DPPH é um radical livre estável potencialmente reativo. Os dois extratos analisados (EHS e o EHSp) foram capazes de seqüestrar o DPPH. A partir deste resultado, decidiu-se analisar a participação das enzimas antioxidantes na atividade protetora do extrato, para verificar se o extrato estaria agindo diretamente sobre os radicais livres ou estaria mediando um aumento da atividade das enzimas antioxidantes. As enzimas glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e os grupamentos sulfidrílicos não protéicos (GSH) foram dosados em estômagos previamente submetidos à lesões induzidas por etanol 80% e tratados com EHS.

Estudos anteriores demonstram que o etanol reduz os níveis de GSH via geração de oxidantes e inibição do transportador de glutathiona mitocondrial (COLELL et al., 1998; FERNANDEZ-CHECA et al., 1993, 1998; VINA et al., 1980; WHEELER et al., 2003), e aumenta a atividade da GST (SALIM, 1990; PUSHPAKIRAN et al, 2004). Neste trabalho, o etanol induziu um aumento da atividade da GST e a redução dos níveis de GSH, sugerindo que o etanol estava efetivamente reagindo com a GST, pois esta enzima promove a detoxificação de substâncias através da conjugação com o GSH (CNUBBEN, 2001). O EHS 30, 100 e 300 mg/kg não impediu a queda nos níveis de GSH, porém reverteu o aumento da atividade da GST induzido pelo etanol com a dose de 30 mg/kg.

KOCH et al (2004) demonstraram que a administração aguda e crônica de etanol aumenta os níveis de superóxido dismutase (SOD). Um aumento na atividade da SOD foi observado após a administração aguda de etanol 80%, sugerindo que as altas concentrações de $O_2^{\bullet -}$ na mucosa gástrica ativaram a SOD, assim como um aumento da concentração de H_2O_2 na mucosa gástrica gera uma conseqüente ativação da enzima catalase (CAT). O EHS impediu o aumento da atividade da SOD e da CAT provocados pelo etanol, sugerindo que a ativação destas enzimas não foi necessária para a atividade protetora gástrica do extrato. Relacionando estes resultados com o resultado obtido da reação do EHS com o DPPH, sugere-se uma potente atividade seqüestradora de radicais livres do extrato, não sendo necessária a participação das enzimas antioxidantes.

Além de proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo agente citagressor, etanol, o extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* (EHS) também foi capaz de aumentar a capacidade de resolução das lesões gástricas (cicatrização) induzidas com ácido acético (modelo de úlcera crônica). O EHS promoveu uma aceleração na cicatrização das úlceras e este efeito, além de ter sido proporcional a dose administrada, foi tão potente quanto o omeprazol, utilizado como controle positivo.

Por ser uma doença multifatorial, a complexa interação entre fatores protetores (muco, prostaglandinas, enzimas antioxidantes) e agressivos da mucosa gástrica (acidez da secreção gástrica, pepsina, motilidade gastrointestinal,

Helicobacter pylori) pode participar da patogênese da úlcera. Portanto, a eficácia da redução da secreção ácida para a remissão da úlcera é indiscutível e parece ser mais facilmente obtida do que através do aumento dos fatores protetores. Para avaliarmos a participação da redução dos fatores agressores na ação protetora da mucosa gástrica exercida pela *Salvia officinalis* foi analisado o efeito dos extratos da Salvia sobre a secreção ácida gástrica (basal e induzida por secretagogos), através da metodologia da ligadura de piloro. Vários fatores parecem estar relacionados com a hipersecreção ácida gástrica neste modelo de ligadura do piloro. Um dos mecanismos é a estimulação vagal reflexa de receptores de pressão localizados na mucosa gástrica antral, provocando a liberação de acetilcolina. Além disto, a distensão gástrica produzida pelo acúmulo de secreção parece influenciar a secreção ácida neste modelo, possivelmente pelo aumento de liberação de gastrina e conseqüente aumento da secreção ácida. (BRODIE, 1966; NAGY et al, 1968).

O EHS reduziu tanto o volume total, quanto a acidez da secreção ácida gástrica durante quatro horas em que o piloro ficou ocluído e estas ações foram aumentadas de acordo com doses administradas, sugerindo ser um efeito específico. A ação inibitória da secreção ácida gástrica pelo EHS sugere que este efeito esteja relacionado com a proteção gástrica observada após a administração dos extratos da *Salvia officinalis* nos modelos de úlcera aguda e crônica descritos anteriormente. Estes resultados conduziram ao estudo das ações da *Salvia officinalis* na célula parietal para verificar alguns possíveis mecanismos de ação do extrato, como por exemplo, sua ação sobre a enzima H^+ , K^+ -ATPase, e/ou sobre os receptores de histamina, de acetilcolina e de gastrina.

Na tentativa de avaliar a participação do bloqueio dos receptores H_2 , CCK_2 e M_3 , da célula parietal pela Salvia, a histamina, a pentagastrina e o betanecol foram utilizados, na ausência e na presença do EHS, após a ligadura pilórica. Como o extrato da salvia impediu o aumento da secreção ácida induzida pela Histamina, mas não alterou a secreção induzida pelos outros dois secretagogos (pentagastrina e betanecol), levantou-se a hipótese que a inibição da secreção ácida gástrica observada na presença do EHS tenha, além dos receptores

histaminérgicos (H_2) um outro alvo de ação como, por exemplo, a inibição da enzima $H^+, K^+ - ATPase$.

A ausência do efeito colinérgico, sugerida pela falta de efeito do EHS sobre a secreção ácida induzida pelo betanecol foi reforçada através da metodologia do trânsito intestinal e esvaziamento gástrico. O EHS reduziu o esvaziamento gástrico apenas com a dose mais elevada (300 mg/kg) e não alterou a velocidade do trânsito intestinal e o EHS_p, promoveu uma pequena redução na motilidade intestinal sem alterar o esvaziamento gástrico.

Como a redução da secreção ácida gástrica basal, observada na presença do EHS parece não envolver os receptores de gastrina (CCK_2) e muscarínicos (M_3) e não se justifica por um efeito tão discreto sobre os receptores H_2 , procedeu-se a determinação da atividade da enzima $H^+, K^+ - ATPase$, para esclarecer se esta seria outra via importante envolvida no mecanismo de ação antissecretor ácida do extrato da salvia. Esta enzima $H^+, K^+ - ATPase$ ou bomba de prótons, está localizada na membrana apical das células parietais e constitui o último passo na secreção gástrica. O EHS foi capaz de inibir a atividade da enzima com uma CI_{50} de $175 \pm 51,69 \mu g/ml$ podendo ser este, portanto, o maior responsável pela redução do volume e da acidez da secreção ácida gástrica provocada pelo EHS.

Dois compostos foram isolados da *Salvia officinalis* e suas ações testadas na capacidade de inibição da enzima $H^+, K^+ - ATPase$. O ácido oleanólico é um triterpeno amplamente encontrado nas plantas. Estudos anteriores demonstraram a ação efetiva do ácido oleanólico na cicatrização de úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos e na proteção gástrica contra lesões induzidas por etanol e antiinflamatórios não esteroidais, porém não apresentou atividade antissecretora no modelo de ligadura do piloro (RODRIGUEZ et al, 2003; ASTUDILLO et al, 2002), concordando com nossos resultados, pois o ácido oleanólico não foi capaz de inibir a bomba de prótons, sugerindo que seu mecanismo gastroprotetor seja exercido por outros fatores de proteção da mucosa, como o aumento dos níveis das prostaglandinas (LEWIS; HANSON, 1991).

ONODA et al. (1990) e WADA et al. (1985) demonstraram que os derivados do ácido abiético (diterpenos de abietano) como o ácido carnósico, um

dos principais constituintes da *Salvia officinalis* apresentam atividade gastroprotetora. Nos experimentos deste estudo, os diterpenos de abietano inibiram em 72,62% a atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase com potência 3 vezes maior do que o EHS, sugerindo que o abietano pode ser um dos compostos responsáveis pela redução da secreção ácida gástrica da *Salvia officinalis*.

7 Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que

- Ambos os extratos da *Salvia officinalis*, (EHS e EHSp) têm atividade protetora gástrica no modelo de lesões gástricas agudas induzidas por etanol 80%, porém o EHS é mais potente que o EHSp.
- O EHS confirma sua atividade protetora gástrica acelerando a cicatrização (resolução) de úlceras induzidas por ácido acético 20%
- Ambos os extratos apresentaram atividade seqüestradora de radicais livres, porém, novamente o EHS foi mais potente que o EHSp.
- O sistema antioxidante parece estar envolvido no mecanismo de proteção gástrica do EHS. O extrato foi capaz de impedir o aumento provocado pelo etanol na atividade das enzimas antioxidantes “in vivo”, glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), sugerindo que a ação antioxidante dos extratos da *Salvia officinalis* é uma via importante envolvida do mecanismo de ação do seu efeito gastroprotetor.
- O EHS reduziu o volume e a acidez da secreção ácida gástrica, contribuindo para a integridade da mucosa.
- O mecanismo pelo qual o EHS reduz secreção ácida gástrica parece envolver a inibição da atividade da enzima H^+ , K^+ -ATPase, e a inibição dos receptores H_2 .
- O abietano, composto isolado da *Salvia officinalis* L., pode ser o responsável pela ação anti-secretora do extrato, pois foi capaz de inibir a atividade da enzima H^+ , K^+ -ATPase.
- Não foi observado efeitos do EHS e o EHSp na motilidade gastrointestinal, excluindo a participação da via colinérgica em suas ações.

Os resultados obtidos indicam que o extrato bruto hidroalcolico de *Salvia officinalis* (EHS) tem atividade gastroprotetora e esta ação envolve mecanismo seqüestrador de radicais livres, envolve também antioxidantes enzimáticos (CAT, SOD e GST), redução da secreção ácida gástrica através da inibição da atividade da enzima H^+ , K^+ -ATPase e dos receptores H_2 de histamina da célula parietal. Além disso, o composto isolado da *Salvia officinalis*, abietano parece ser o responsável pela inibição da bomba de prótons.

8 Referências

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods. Enzymol.** v.105, pg.121-126, 1984.

AHLMAN, H.; NILSSON. The gut as the largest endocrine organ in the body. **Ann. Oncol.** v.12 (2), pg. S63-S68, 2001.

AIHARA, Y. SASAKI, Y. NOMURA, F. ISE. Involvement Of Cyclooxygenase-1, Prostaglandin E2 And Ep1 Receptors In Acid-Induced HCO³⁻ Secretion In Stomach. **Journal of Physiology And Pharmacology**, v. 57, pg. 661- 676, 2006.

ALLEN A ; HOSKINS LC. Colonic mucus in health and disease. In: KRISTNER JB; SHORTER RG. **Diseases of the Rectum and Colon.** Baltimore: Williams and Wilkinsp, pg. 65–94, 1988.

ALLEN A. Gastrointestinal mucus. In: **Handbook of Physiology:** The Gastrointestinal System. Salivary, Gastric, Pancreatic, and Hepatobiliary Secretion. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc, v. 3, p. 359–382, 1989.

ALONSO, J. **Tratado de Fítofarmacos y Nutracéuticos.** Rosário, Argentina: Corpus Libros, 2004.

AOI M, AIHARA E, NAKASHIMA M, TAKEUCHI K. Participation of prostaglandin receptor EP4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Am J Physiol**, 287, pg. 96-103, 2004.

ARRAIS, P.S.D, et al. Perfil da automedicação no Brasil. **Rev.Saúde Pública**, v. 31, n.1, 1997.

ARUOMA, O.I. et al. Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. **Xenobiotica**, v.22, p.257-268, 1992.

ASTUDILLO L, RODRIGUEZ JA, SCHEDA-HIRSCHMANN G. Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **J Phar Pharmacol**, v.54, pg. 583-588, 2002.

ATUMA C, JOHANSSON M, ENGSTRAND L, LI H, AND HOLM L. Effects of a chronic *Helicobacter pylori* infection on the gastric mucus gel in vivo. **Gastroenterology**, v.114, pg. A61, 1998.

BAATAR D, KAWANAKA H, SZABO IL, PAI R, JONES MK, KITANO S, TARNAWSKI AS. Esophageal ulceration activates genes encoding keratinocyte growth factor and its receptor in rats: a key to esophageal ulcer healing? **Gastroenterology**, v. 122, pg. 458–468, 2002.

BAGGIO, C.H. et al. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, pg. 93-98, 2003.

BANDYOPADHYAY, D.; BISWAS, K.; BHATTACHARYYA, M.; REITER, R.J; BANERJEE, R.K. Gastric Toxicity and Mucosal Ulceration Induced by Oxygen-derived Reactive Species: Protection by Melatonin. **Current Molecular Medicine**, v.1, pg.501-513, 2001.

BERICEVIC, D. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. Leaves: the relevance of ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, pg.125-132, 2001.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by use of a stable free radical. **Nature**, v.181, pg. 1199-1200, 1958.

BRODIE, D.A. The mechanism of gastric hyperacidity produced by pylorus ligation in the rat. **Am J Dig Dis**, v.11, p.231-41, 1966.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11 Ed. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2006.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; PAJDO, R.; SCHUPPAN, D; DROZDOWICZ, D; et al. Involvement of cyclooxygenase (COX)-2 products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. **J Physiol Pharmacol**, vol.51, pg. 751-3, 2000.

BRZOZOWSKI T, TARNAWSKI A, HOLLANDER D, SEKHON S, KRAUSE WJ, GERGELY H. Comparison of prostaglandin and cimetidine in protection of isolated gastric glands against indomethacin injury. **J.Physiol Pharmacol.**, v.56, suplemento 5, pg.75-88, 2005.

BUNNELL, E., PACTH, E.R. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.** v. 148, pg. 174–1178, 1993.

CANTIN, A.M., HUBBARD, R.C., CRYSTAL, R.G., Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. **Am. Rev. Respir. Dis.** v. 139, pg. 370–372, 1989.

CHANDE, N.S. L; BUDINGER, G.R.S. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42 pg. 165–174, 2007

CHEN, F.A.; WU, A.B.; CHEN, C.Y. The influence of treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its activity. **Food Chemistry**, v.86, pg. 479-484, 2004.

CHIPAULT, J.R., MIZUNO, G.R., HAWKINS, J.M., LUNDBERG, W.O., The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, pg. 46-55, 1952.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.;VAN BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Environ. Toxicol. and Pharmacol.**, v.10, pg141-152, 2001.

COLELL, A., GARCIA-RUIZ, C., MIRANDA, M., ARDITE, E., MARI, M., MORALES, A., CORRALES, F., KAPLOWITZ, N., FERNANDEZ-CHECA, J.C. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. **Gastroenterology**, v. 115 (6), pg.1541–1551, 1998.

COLEMAN RA, SMITH WL, NARUMIYA S. Classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol Ver**, v. 46 pg. 205-229, 1994

CUVELIER, M.E. et al. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts os sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society** v. 13, pg.645-652, 1996

CUVELIER, M.-E., BERSET, C., RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, pg.665 - 669, 1994.

CUZZOCREA S, et al. Protective effects of a new stable, highly active SOD mimetic, M40401 in splanchnic artery occlusion and reperfusion. **Br J Pharmacol**, v. 132, pg. 19–29. 2001;

DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology**. v. 149, pg.611-623, 2006.

DING M, KINOSHITA Y, KISHI K, NAKATA H, HASSAN S, KAWANAMI C et al. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**, v.53, pg. 199–216, 1997.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal Mucosal Defense. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 22, pg.599–606, 2006.

EIDI M; EIDI A; HAMIDREZA Z. Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100 p. 310–313, 2005.

FADEEL B, AHLIN A, HENTER J-I, ORRENIUS S, HAMPTON MB. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. **Blood**, v. 92, pg. 4808–18, 1998.

FANTONE JC, WARD PA. A review: role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am J Pathol**, v. 107, pg. 395–418, 1982.

FERNANDEZ- CHECA, J.C., GARCIA-RUIZ, C., COLELL, A., MORALES, A., MARI, M., MIRANDA, M., ARDITE, E. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. **Biofactors**, v. 8 (1–2), pg. 7–11, 1998.

FERNANDEZ-CHECA, J.C., HIRANO, T., TSUKAMOTO, H., KAPLOWITZ, N., Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. **Alcohol**, v. 10 (6), pg. 469–475, 1993.

FISKE, C.H. ; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v.66, pg.375-400, 1925.

FLEMSTROM G ; KIVILAAKSO E. Demonstration of a pH gradient at the luminal surface of rat duodenum in vivo and its dependence on mucosal alkaline secretion. **Gastroenterology**, v. 84, pg. 787–794, 1983.

FLEMSTROM G, GARNER A. Gastroduodenal HCO₃⁻ transport: Characteristics and proposed role in acidity regulation and mucosal protection. **Am J Physiol**, v. 242, pg. 183-193, 1982

FLEMSTROM G. Gastric and duodenal mucosal bicarbonate secretion. In: JOHNSON LR, CRISTENSEN J, GROSSMAN MI, JACOBSON ED, SCHULTZ SG **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, pg. 1011-1034. 1987.

FONTE, N.N. A Complexidade das Plantas Medicinais: Enfoque Farmacêutico. In: CORREIA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas**. 1.ed. Curitiba: EMATER, pg.24 – 45,2004.

FORSTNER JF AND FORSTNER GG. Gastrointestinal mucus. In: JOHNSON LR **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, 3 ed. New York: Raven, pg. 1255–1284, 1994.

GAO R, YUAN Z, ZHAO Z, GAO X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dimutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, pg. 41-45, 1998.

GARNER A, HELYINGS JR, HAMPSON SE, STANIER AM. Identification of agonists of duodenal alkaline secretion. **J Intern Med.** v. 228 (*Suppl*), pg. 97-103. 1990;

GAZZIERI, F, et al. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radic. Biol. Med.** ,2007

GERGELY H. Comparison of prostaglandin and cimetidine in protection of isolated gastric glands against indomethacin injury. **J Physiol Pharmacol**, v. 56, pg. 75–88, 2005.

GIACHETTI D, et al. Pharmacological activity of essential oils on Oddi's sphincter. **Planta Med.** v.54, pg.389-92, 1988.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology.** Massachusetts: Sinauer Associates Inc, pg. 361–368. 1994.

GILLI, R. et al. FT-IR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solutions. **Carbohydr. Res.** v. 263, p.315-326, 1994

GONZALEZ, A.G., ANDRES, L.S., AGUIAR, Z.E., LUIS, J.G. Diterpenes from *Salvia mellifera* and their biogenetic significance. **Phytochemistry**, v. 31, pg. 1297-1305, 1992

GUIMARÃES, M.M.; RIECK, L.; SILVA-SANTOS, J.E.; MESIA-VELA, S.; MARQUES, M.C.S. Pesquisas realizadas com Plantas Mediciniais no Estado do Paraná no período de 1992 a 2002. In: CORREIA JR, C.; GRAÇA, L.R.;

SCEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas**. 1.ed. Curitiba: EMATER, 2004, p.167-69.

GÜLÇİN, I. ; F6UFREVIOGLU, O.I. ; OKTAY, M. ; BÜYÜKOKUROGLU, M.E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). **Journal of Ethnopharmacol.** v. 90, pg. 205-215, 2004.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27 pg. 1–93 ,2006 .

HABIG, W.H. ; PABST, M.J. ; JAKOBY, N.B. Gltahione S-tranferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v.249, pg.7130-7139, 1974.

HADDAD, J.J.; HARB, H.L. L- λ -Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? **Molecular Immunology**. v. 42, pg. 987–1014, 2005.

HERLING, A. W.; WEIDMANN, K. In: ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, 5 ed. New Jersey: John Wiley, v. 2, pg 122–134, 1996.

HIROKAWA M, FURUKAWA O, GUTH PH, ENGEL E, KAUNITZ JD. Lowdose HISSIN P.J.; HILF R., A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem**, v. 74, pg. 241-226, 1976.

HOGAN DL, YAO B, STEINBACH JH, ISENBERG JI. The enteric nervous system modulates mammalian duodenal mucosal bicarbonate secretion. **Gastroenterology**, v.105, pg. 410-417, 1993.

HOLZER P, SAMETZ W. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. **Gastroenterology**, v. 91, pg. 975–981, 1986.

INFOAGRO. **Cultivo de la sálvia**. Disponível em <www.infoagro.com/aromaticas/salviaref2.asp> Acesso em 18 de outubro de 2005.

KELLY, D.; COUTTS, A.G. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **Proc. Nutr. Soc.** v.59, pg.177–185, 2000

KIMURA, M., et al. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Microb. Pathol**, v. 31, pg. 29– 36, 2001.

KOBAYASHI T, OHTA Y, YOSHINO J, NAKAZAWA S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacol Res**, vol.43, pg. 23-30,2001.

KOCH, O.R.; PANI G.; BORRELLO S.; COLAVITTI, R.; CRAVERO, A.; FARR, S.; GALEOTTI, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, pg. 91–198, 2004.

KONTUREK PC, KONTUREK SJ, OCHMANSKI W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO³⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **Eur J Pharmacol**, v. 19, pg.15-27, 2004.

KUBO, K.; UEHARA, H.; KUBOTA, T.; NOZU, T. MORUYA, M.WATANABE, Y.; SHOJI, E.;SANTOS, S.B.; HARADA, K.; KONGO, Y. Effects of ranitidine on gastric

vesicles containing H⁺, K⁺-ATPase adenosine triphosphatase in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.30, pg 944-951, 1995.

LAMAISON, J. L., PETITJEAN-FREYTET, C., & CARNAT, A.. Rosmarinic acid, totalhydroxycinnamic derivative contents and antioxidant activity of medicinal *Apiaceae*, *Boraginaceae* and *Lamiaceae*. **Ann. Pharm. Franc.**,vol 48, pg.103-108, 1990.

LEWIS DA, HANSON D. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: ELLIS GP, EST GB. **Progress in medicinal chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science, pg.201-231, 1991.

Li, L et al. Biologically active components from traditional Chinese medicines. **Pure & Applied Chemistry** , v.70, pg. 547-554, 1998

LIMA, C.F. et al. Evaluation of toxic/protective effects of the essencial oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. **Toxicology in vitro** v.18 pg. 457-465, 2004.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LU, S.C. Regulation of glutathione syntesis. **Curr.Topics Cell. Regulation**. v. 36, pg.95-116, 2000.

LU, Y,FOO, L.Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry** v.75, pg.197-202, 2001.

LU, Y., FOO, L.Y. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 51,pg. 91-94, 1999.

LU, Y., FOO, L.Y., WONG, H., Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 52, pg 1149-1152, 1999.

LU, Y; FOO, L.Y. Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. **Tetrahedron Letters** v.42, p.8223-8225, 2001

LUIS J.G. Chemistry, biogenesis and chemotaxonomy of the diterpenoids of *Salvia*. In: HARBORNE J.B., TOMAS-BARBERAN F.A. **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. Clarendon Press, Oxford, pp 63-82.

MA L, CHOW JY, WONG BC, CHO CH. Role of capsaicin sensory nerves and EGF in the healing of gastric ulcer in rats. **Life Sci**, v. 66, pg.213–220, 2000.

MANOLOVA N, SERKEDJIEVA, J.; IVANOVA, V. Anti-influenza activity of the plant preparation “Broncho Pam”. **Fitoterapia** LVI, pg. 223-226, 1995.

MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol: an convenient assay for superoxide dismutase enzyme activity. **Eur J. Biochem**, v.47, pg. 469-474, 1974.

MASINI E, CUZZOCREA S, MAZZON E, MARZOCCA C, MANNAIONI PF, SALVEMINI D. Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo. **Br J Pharmacol** v. 136, pg. 905–17, 2002.

MURAKAMI, S.; ARAI, L. MURAMATSU, M.; OTOMO, S.; BABA, K.; KIDO, T; KOZAWA, M. Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase and acid secretion by cassinol A, a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. **Biochem. Pharmacol.**, v.44, pg.33-37, 1992.

NAGY L et al. Interrelationships between the gastric secretory responses, prostaglandin E2 inhibition and serum level of immunoreactive gastrin in pylorus ligated and antrectomized rats. **Pharmacology**, v.16, p.135-41,1968.

NEWTON JN, OLIVER L, STRUGALA V, PEARSON JP, JAMES OJ, AND ALLEN A. *Helicobacter pylori* in vivo causes structural changes in the adherent gastric mucus layer but barrier function is not compromised. **Gut**, v. 43, pg. 470–475, 1998.

NINOMIYA, K. et al. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p. 1943-1946, 2004

NODARI, R.O; GUERRA, M.P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: SIMÕES, M.O, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2^a Edição. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000

ONODA Y, MAGARIBUCHI T, TAMAKI H. Effects of the new antiulcer agent 12 sulfodehydroabiatic acid monosodium salt on duodenal alkaline secretion in rats. **Arzneimittelforschung**, v.l.40, pg 576-8, 1990.

ONODA Y, TAKIDO M, MAGARIBUCHI T, TAMAKI H. Effects of 12-sulfodehydroabiatic acid monosodium salt (TA-2711), a new antiulcer agent, on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents and gastric mucosal defensive factors in rats. **Jpn J Pharmacol** v.52 , pg631–8, 1990.

OSHINO N., CHANCE B., SIES H., . BUCHER T. The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors, **Arch. Biochem. Biophys**, v. 154, pg.117–131, 1973.

PULLAN RD, THOMAS GA, RHODES M, NEWCOMBE RG, WILLIAMS GT, ALLEN A; RHODES J. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. **Gut**, v. 35, pg. 353–359, 1994.

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

QIN Z, CHEN C. Synergistic action of famotidine and chlorpheniramine on acetic acid-induced chronic gastric ulcer in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 45, pg. 7203-7207,2005.

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

ROBERTS, S.; MCDONALD, I. M. In: ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, 6 ed. New Jersey: John Wiley, v. 4, pg 86–121, 2003.

RODRIGUEZ JA, ASTUDILLO L, SCHMEDA-HIRSCHMANN G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. **Pharmacological Research**, v.48, pg. 291-294, 2003.

ROSS IN AND TURNBERG LA. Studies of the mucus-bicarbonate barrier on rat fundic mucosa: the effects of luminal pH and a stable prostaglandin analogue. **Gut**, v. 24, pg. 1030–1033, 1983.

ROUM, J.H., BEHLD, R., MCELVANCY, N.G., BOROK, Z., CRYSTAL, R.G.
SALIM, A.S. Sulphydryls protect patients against complications of erosive gastritis.
Dig. Dis. Sci., v.11, pg. 1436-1437, 1994.

SALVEMINI D, RILEY DP, LENNON PJ, WANG ZQ, CURRIE MG, MACARTHUR H et al. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxininduced intestinal damage. **Br J Pharmacol**, v. 127, pg. 685–92, 1999

SALVEMINI D, WANG ZQ, ZWEIER JL, SAMOUILOV A, MACARTHUR H, MISKO TP et al. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. **Science**, v. 286, pg. 304–306, 1999.

SAMONINA, G et al. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology**, v.11, p. 1–6, 2004.

SANTOS-GOMES, P.C.; FERNANDES-FERREIRA, M. Essential Oils Produced by in Vitro Shoots of Sage (*Salvia officinalis* L.). **J. Agric. Food Chem**, v.51 (8), pg. 2260-2266, 2002.

SCARPIGNATO, S. CAPOVILLA, T.; BERTACCINI, G. Action of caerilein on gastric emptying of conscious rat. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.246, pg.286-294, 1980.

SCHADE C, FLEMSTROM G, HOLM L. Hydrogen-ion concentration in the mucus layer on top of acid-stimulated and acid inhibited rat gastric mucosa. **Gastroenterology** , v.107, pg. 180–188, 1994.

SCHEEL-TOELLNER D, WANG K, CRADDOCK R, WEBB PR, MCGETTRICK HM, ASSI LK et al. Reactive oxygen species limit neutrophil lifespan by activating death receptor signaling. **Blood**, v.104, pg. 2557–64, 2004.

SCHULTZ M; DUTTA S AND TEW KD. Inhibitors of glutathione S-transferase as therapeutic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 26, pg. 91-104, 1997.

SHAY, H. KOMAROV, S.A.; FELLS, S.E;MERAZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v.5, p.43-61, 1945

SHIMURA M, OSAWA Y, YUO A, HATAKE K, TAKAKU F, ISHIZAKA Y. Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells. **J Leukoc Biol**, v. 68, pg. 87–96, 2000.

SIMSON et al. Alkaline secretion by amphibian duodenum: III. Effects of dbcAMP, theophylline, and prostaglandins. **Am J Physiol**, v. 240, pg. 528-534, 1981.

SIRAKI A.G., POURAHMAD J., CHAN T.S., KHAN S., O'BRIEN P.J. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes, **Free Radical Biol. Med.**,v. 32, pg. 2–10, 2002.

STRUGALA V, JORDAN N, PEARSON J, AND ALLEN A. The colonic mucus barrier and changes in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 114 Suplemento A1093, 1998.

TAKEUCHI K.; AIHARA E.; SASAKI, Y.; NOMURA Y.; ISE, F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced HCO³⁻ secretion in stomach. **Jour. of Phys. and Pharm.** v. 57, pg. 661-676, 2006.

TAN PV, NYASSE B, ENOW-OROCK GE,WAFO P, FORCHA EA. Prophylactic and healing properties of a new anti-ulcer compound from *Enantia chlorantha* in rats. **Phytomedicine**, vol 7, pg.291–6, 2000.

TANAKA, T., NISHIMURA, A., KOUNO, I., NONAKA, G., YANG, C.-R. Four new caffeic acid metabolites, yunnaneic acids E-H, from *Salvia yunnanensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v. 45, pg.1596-1600, 1997.

TANAKA, T., NISHIMURA, A., KOUNO, I., NONAKA, G., YOUNG, T., TANG, W., EISENBRAND, G. Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pg 891±902, 1992.

TANI S, OKUDA M, MORISHIGE R, TANAKA T. Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. **Biol Pharm Bull**, v. 20, pg.482–485,1997.

TARNAWSKI A, HOLLANDER D, STACHURA J, et al. Vascular and microvascular changes- key factors in the development of acetic acid induced gastric ulcers in rats. **J Clin Gastroenterol**, v. 12(1), pg. S148–S157, 1990.

TEPE, B. et al. Screening of the antioxidant potential of six *Salvia* species from Turkey . **Food Chemistry**,v. 95, p. 200-204,2006

TEPPERMAN, B.L., JACOBSON, E.D. Circulatory factors in gastric mucosal defence and repair. In: Johnson, L.R. (Ed.), **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, 3a Edição. New York: Raven Press, 1994.

TEZUKA, Y., KASIMU, R., LI, J.X., BASNET, P., TANAKA, K., NAMBA, T.et al.,. Constituents of roots of *Salvia deserta* Schang. (Xinjiang-Danshen). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, pg.107-112, 1998

TODOROV S. et al. Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. **Acta Physiol Pharmacol Bulg**. v.10(2), p.13-20, 1984

VINA, J., ESTRELA, J.M., GUERRI, C., ROMERO, F.J. Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. **The Biochemical Journal**, v. 75, 2419–2424, 1993.

WADA H, KODATO S, KAWAMORI M, MORIKAWA T, NAKAI H, TAKEDA M, et al. Antiulcer activity of dehydroabietic acid derivatives. **Chem Pharm Bull** vol.33 pg.1472–87, 1985;

WALLACE, J. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **Am J Med**, v.110, pg. 19S–23S, 2001

WALLACE, J.L.; GRANGER, D.N. The cellular and molecular basis for gastroduodenal mucosal defense. **FASEB Journal**. V. 10, pg. 731-740, 1996.

WILLERSHAUSEN, B. et al. The influence of herbal ingredients on the plaque index and bleeding tendency of the gingiva. **J. Clin. Dent.**, v.2, p.75-78,1991.

WHEELER, M.D., THURMAN, R.G. Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278 (10), pg. 8435–8441, 2003.

YASUI K, KOBAYASHI N, YAMAZAKI T, AGEMATSU K, MATSUZAKI S, ITO S et al. Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis. **Free Radic Res**, v. 39, pg. 755–62, 2005.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflamm. res.**, v.55, pg. 359–363, 2006.

YOUNAN F, PEARSON JP, ALLEN A, AND VENABLES CW. Changes in the structure of the mucus gel on the mucosal surface of the stomach in association with peptic ulcer disease. **Gastroenterology** , v.82, pg. 827–831, 1982.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clin Pract Gastroent & Hepat.** v. 3(2), 2006.