

PATRÍCIA CORRÊA DIAS

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO
DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA
DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DE
Artemisia annua L.**

**CAMPINAS
2004**

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

João Ernesto de Carvalho

Membros:

1. Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira

Ricardo Ferraz de Oliveira

2. Prof. Dr. Jose Artur da Silva Emim

Jose Artur da Silva Emim

3. Profª. Dra. Vera Lucia Garcia Rehder

Vera Lucia Garcia Rehder

4. Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho

Thales Rocha de Mattos Filho

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/04/2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D543ii Dias, Patrícia Corrêa
 Isolamento, identificação e determinação do mecanismo de ação
 antiulcerogênica dos princípios ativos de *Artemisia annua* L. / Patrícia
 Corrêa Dias. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

 Orientadores : João Ernesto de Carvalho, Mary Ann Foglio
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

 1. Úlcera gástrica. 2. Lactonas. Fitoterapia. I. Carvalho, João
 Ernesto. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(slp/fcm)

PATRÍCIA CORRÊA DIAS

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO
MECANISMO DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA DOS
PRINCÍPIOS ATIVOS DE
Artemisia annua L.**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso
de Pós Graduação em Clínica Médica da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientação

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
CPQBA / UNICAMP

Co-Orientação

Profa. Dra. Mary Ann Foglio
CPQBA / UNICAMP

**CAMPINAS
2004**

Agradecimentos

Ao CPQBA/UNICAMP, pela acolhida, apoio financeiro e oferecimento de sua infraestrutura, o que proporcionou a plena execução deste trabalho,

Ao Departamento de Clínica Médica da FCM/UNICAMP, pela possibilidade de trabalho junto ao seu Programa de Doutorado,

À Mary Ann Foglio, pela co-orientação e participação imprescindível na realização do trabalho fitoquímico, pelo exemplo de pessoa e profissional, além da consideração, apoio e inestimável amizade que sempre dispensou a mim, desde a minha chegada ao CPQBA/UNICAMP,

À Ana Possenti, pela colaboração indispensável na realização dos experimentos e sobretudo, pelo apoio, amizade, confiança e constante incentivo dado à obtenção deste título,

À Márcia Aparecida Antônio, pelo apoio técnico prestado, pelos ensinamentos, confiança, amizade e trabalho conjunto, em todos estes anos de convivência,

À Sirlene Maria Valério Tinti, pela amizade, carinho e exemplo, além da disponibilidade e apoio técnico sempre presentes,

À Luciana Konecny Kohn e Aparecida Érica Bighetti, contemporâneas na pós graduação, pela amizade e convivência,

Aos amigos Carina, Maria Carolina, Alik, Kárin, Luís Augusto, Cristiana, Luciana, Mário Sérgio, Bruno, Orlando, Juliana e Marina, pelo companheirismo,

À Débora Christian Fachim Nogueira, pelo importante trabalho realizado na padronização dos experimentos, grande amizade e também, pela “velha” epígrafe, que continua acompanhando o meu trabalho,

Ao Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues e à Vera Lúcia Garcia Rehder, pela colaboração no trabalho fitoquímico, pela amizade e agradável convivência,

Aos colegas da Divisão de Fitoquímica, Ilza, Ana Paula e Érica, pela colaboração no trabalho fitoquímico e pela agradável convivência,

À Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/UNICAMP pelo fornecimento da espécie vegetal estudada,

Às Equipes de Administração, Secretaria e Manutenção do CPQBA/UNICAMP, pelos apoios técnico e administrativo, também tão importantes no desenvolvimento desta Tese,

Ao Eduardo e à Renata, secretários do Curso de Pós Graduação do Departamento de Clínica Médica da FCM/UNICAMP, pela atenção dispensada a mim e a todos os alunos deste Departamento,

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro,

À Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), pela possibilidade de trabalho, pelo incentivo na obtenção deste título e pela confiança, para que eu transmitisse ao seu corpo discente, o meu aprendizado, também adquirido com o desenvolvimento deste trabalho,

A todos os amigos que de alguma forma, colaboraram no pleno desenvolvimento deste trabalho.

*A Deus, pela vida e por ter sempre
iluminado a minha caminhada:*

*Aos meus pais,
Tarciso e Neusa.
simplesmente, por tudo aquilo que sou.*

*Pelo amor, apoio e incentivo sempre
constantemente. Por estarem sempre ao meu
lado incondicionalmente, em todos os
momentos de minha vida.*

Amo vocês.

*Às minhas irmãs,
Cristiana e Rogéria,
Pelo carinho e apoio sempre presentes*

*Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho,
Por mais uma vez, ter-me concedido esta oportunidade
de trabalho, imprescindível para a minha realização
pessoal e profissional.
Pela seriedade, profissionalismo, confiança e amizade
que conquistamos nestes anos de convivência.
Por tudo, agradeço e ofereço-lhe este trabalho,
Caro Mestre.*

Neste momento, é importante dizer que.....

*“Pode-se viver no mundo, uma vida maravilhosa,
quando se sabe trabalhar e amar.
Trabalhar pelo que se ama e
amar aquilo em que se trabalha”.*

Tolstoi

E ainda, mais uma vez.....

*“Eu de fato, não sou um homem da ciência.
Não sou um pesquisador, nem pensador.
Por temperamento, não sou nada, a não ser, um
conquistador ou aventureiro, com toda a
curiosidade e tenacidade deste tipo de gente”.*

Sigmund Freud

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Descrição
CCD	Cromatografia em camada delgada
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância de uma única via
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia gasosa
COX	Ciclooxigenase
DE ₅₀	Dose efetiva 50%
EM	Espectroscopia de massas
epm	Erro padrão da média
EV	Elétron volt
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
Hz	Hertz
IgA	Imunoglobulina A
ILU	Índice de lesões ulcerativas
J	Constante de acoplamento
M/z	Relação massa carga
M ⁺	Íon molecular
MHz	Megahertz
N	Número de animais por grupo de tratamento
NANC	Não adrenérgico e não colinérgico
NO	Óxido nítrico

PGE₁	Prostaglandina do tipo E ₁
PGE₂	Prostaglandina do tipo E ₂
PGI₂	Prostaciclina
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
Rf:	Relação da distância percorrida pela amostra / distância percorrida pelo eluente em cromatografia de camada delgada
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TGFβ1	Fator de crescimento transformador
TMS	Tetrametilsilano
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UV	Ultra-violeta
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

Lista de Gráficos

Página

- GRÁFICO 1:** Efeito da administração oral da carbenoxolona e das frações $F1A_{LAC}$, $F1B_{LAC}$, $F1C_{LAC}$ e $F1D_{LAC}$, obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}), no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos 48
- GRÁFICO 2:** Efeito da administração oral da carbenoxolona e da dihidro-epideoxiarteauína b em cinco doses diferentes, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos 50
- GRÁFICO 3:** Efeito da administração oral da carbenoxolona e da deoxiartemisinina em três doses diferentes, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos .. 51
- GRÁFICO 4:** Efeito da administração intraperitoneal da Fração FAB_{LAC} , obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}) e da deoxiartemisinina, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos 52
- GRÁFICO 5:** Efeito da administração intraperitoneal das frações $F1A_{AB}$, $F1B_{AB}$, $F1C_{AB}$ e $F1D_{AB}$, obtidas a partir da purificação da Fração FAB_{LAC} , no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos , 53
- GRÁFICO 6:** Efeito da administração oral da cimetidina e da dihidro-epideoxiarteauína b, no modelo de úlcera induzida por indometacina . 54
- GRÁFICO 7:** Efeito da administração oral da carbenoxolona, da dihidro-epideoxiarteauína b e da deoxiartemisinina no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos previamente tratados com indometacina 56
- GRÁFICO 8:** Efeito da administração oral da carbenoxolona, da dihidro-epideoxiarteauína b e da deoxiartemisinina sobre a produção de muco protetor aderido à mucosa gástrica, em animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol absoluto 57

GRÁFICO 9: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da Fração FAB_{LAC} sobre a produção basal de muco protetor aderido à mucosa gástrica em ratos . .	58
GRÁFICO 10: Efeito da administração intraduodenal da cimetidina, da dihidro-epideoxiarteanuina b e da deoxiartemisinina sobre o volume, a concentração hidrogeniônica e atividade péptica do conteúdo gástrico no modelo de ligadura do piloro	60

Lista de Tabelas

	Página
TABELA 1: Efeito da administração oral da carbenoxolona e das frações FIA_{LAC} , FIB_{LAC} , FIC_{LAC} e FID_{LAC} , obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}), no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos	48
TABELA 2: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da dihidro-epideoxiarteanuina b em cinco doses diferentes, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos	49
TABELA 3: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da deoxiartemisinina em três doses diferentes, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos . . .	51
TABELA 4: Efeito da administração intraperitoneal da Fração FAB_{LAC} , obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}) e da deoxiartemisinina, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos	52
TABELA 5: Efeito da administração intraperitoneal das frações FIA_{AB} , FIB_{AB} , FIC_{AB} e FID_{AB} , obtidas a partir da purificação da Fração FAB_{LAC} , no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos	53
TABELA 6: Efeito da administração oral da cimetidina e da dihidro-epideoxiarteanuina b, no modelo de úlcera induzida por indometacina	54

Lista de Figuras

	Página
FIGURA 1: Estrutura molecular da artemisinina	15
FIGURA 2: Exemplar de <i>Artemisia annua</i> L., cultivada no Campo de Cultivo Experimental da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/UNICAMP ...	33
FIGURA 3: Estrutura molecular das lactonas sesquiterpênicas isoladas das frações F1C _{LAC} e F1D _{LAC}	64
FIGURA 4: Perfil por cromatografia de camada delgada da F1D _{LAC} , indicando a presença da deoxiartemisinina (Fase móvel: diclorometano metanol 1%) ...	65
FIGURA 5: Perfil por cromatografia de camada delgada das subfrações coletadas das colunas clássicas, utilizadas na purificação da F1D _{LAC} , obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas F _{LAC} . Fração 1, isenta de artemisinina e Fração 2, contendo artemisinina (Fase móvel: diclorometano metanol 1%)	66
FIGURA 6: Perfil por cromatografia de camada delgada das frações 1 e 2, com ausência e presença de artemisinina, respectivamente, obtidas da reunião de subfrações coletadas a partir da eluição da coluna clássica, utilizada na purificação da F1D _{LAC} , obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (Fase móvel: diclorometano metanol 1%)	66
FIGURA 7: Cromatografia em camada delgada utilizada como guia para o corte da coluna cromatográfica seca, para a separação da deoxiartemisinina e artemisinina (Fase móvel: diclorometano metanol 1%)	67
FIGURA 8: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas da deoxiartemisinina, obtidas por CG/EM (HP5980 / HP 5870)	68
FIGURA 9: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (500 MHz) da deoxiartemisinina	69
FIGURA 10: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (125,7 MHz) da deoxiartemisinina	70

- FIGURA 11:** Cromatografia em camada delgada obtida no monitoramento da purificação da fração F1C_{LAC} para a obtenção de uma subfração enriquecida em dihidro-epideoxiarteauína b (F3) 71
- FIGURA 12:** Cromatografia em camada delgada obtida no monitoramento da purificação da fração F1C_{LAC} para a obtenção da dihidro-epideoxiarteauína b, a partir de subfrações enriquecidas em dihidro-epideoxiarteauína b (F3) 71
- FIGURA 13:** Espectro de massas da dihidro-epideoxiarteauína b, obtido por CG/EM (HP5980 / HP 5870) 72
- FIGURA 14:** Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (500 MHz) da dihidro-epideoxiarteauína b 73
- FIGURA 15:** Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (127,5 MHz) da dihidro-epideoxiarteauína b 74

Sumário

	Página
1. Resumo	1
2. Abstract	4
3. Introdução	7
3.1. A contribuição das espécies vegetais para a terapêutica medicamentosa ...	8
3.2. A <i>Artemisia annua</i> L.	14
3.3. A úlcera péptica e seus aspectos fisiopatológicos	17
3.4. A úlcera péptica e seus alvos terapêuticos	26
4. Objetivos	29
5. Materiais e Métodos	31
5.1. Obtenção do material vegetal	32
5.2. Descrição botânica da espécie	34
5.3. Fitoquímica	35
5.3.1. Obtenção dos extratos brutos	35
5.3.2. Obtenção da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F _{LAC}) a partir do extrato bruto hidroetanólico	35
5.3.3. Purificação da fração lactonas (F _{LAC})	35
5.3.4. Isolamento da dihidro-epideoxiarteauína b, a partir da fração FIC _{LAC}	36
5.3.5. Isolamento da deoxiartemisina a partir da fração FID _{LAC}	36
5.3.6. Análise cromatográfica	37
5.3.6.1. Cromatografia em camada delgada	37
5.3.6.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	37
5.3.7. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13	38
5.4. Testes de atividade farmacológica	38
5.4.1. Animais	38
5.4.2. Úlcera induzida por indometacina	39
5.4.3. Úlcera induzida por etanol	40

5.4.4. Úlcera induzida por etanol absoluto em ratos previamente tratados com indometacina	40
5.4.5. Determinação quantitativa do muco gastrotetor	41
5.4.6. Ligadura do piloro	41
5.4.7. Determinação da atividade péptica	42
5.4.8. Medida da agregação plaquetária	43
5.4.9. Determinação quantitativa do conteúdo de prostaglandina do tipo E ₂ (PGE ₂) na mucosa gástrica de ratos	44
5.4.9.1. Manipulação dos animais	44
5.4.9.2. Manipulação dos estômagos e obtenção das amostras para análise	44
5.4.9.3. Purificação das amostras	45
5.4.9.3. Ensaio imunoenzimático	45
5.5. Análise estatística	45
6. Resultados	46
6.1. Avaliação Farmacológica	47
6.1.1. Úlcera induzida por etanol absoluto em ratos	47
6.1.1.1. Frações F1A _{LAC} , F1B _{LAC} , F1C _{LAC} , e F1D _{LAC} , obtidas da purificação da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F _{LAC})	47
6.1.1.2. Dihidro-epideoxiarteauína b	49
6.1.1.3. Deoxiartemisinina	50
6.1.1.4. Fração FAB _{LAC} e deoxiartemisinina	51
6.1.1.5. Fracionamento da fração FAB _{LAC}	52
6.1.2. Úlcera induzida por indometacina	54
6.1.2.1. Dihidro-epideoxiarteauína b	54
6.1.3. Úlcera induzida por etanol em ratos previamente tratados com indometacina	55
6.1.3.1. Dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina	55
6.1.4. Dosagem de muco protetor aderido à mucosa gástrica de ratos	56

6.1.4.1. Dihidro-epideoxiarteanaína b e deoxiartemisinina	
6.1.4.2. Fração FAB_{LAC}	58
6.1.3. Ligadura do pílulo: determinação do volume, concentração hidrogeniônica e atividade péptica do suco gástrico	59
6.1.5.1. Dihidro-epideoxiarteanaína b e deoxiartemisinina	59
6.1.6. Medida da agregação plaquetária	60
6.1.6.1. Dihidro-epideoxiarteanaína b e deoxiartemisinina	60
6.1.7. Determinação quantitativa do conteúdo de prostaglandina E_2 (PGE_2) da mucosa gástrica de ratos	62
6.1.7.1. Dihidro-epideoxiarteanaína b e deoxiartemisinina	62
6.2. Fitoquímica	64
6.2.1. Deoxiartemisinina	64
6.2.2. Dihidro-epideoxiarteanaína b	70
7. Discussão	74
8. Conclusão	83
9. Referências bibliográficas	85
10. Apêndices	97

1. Resumo

Os extratos brutos e frações semipurificadas obtidos de *Artemisia annua* L. apresentaram atividade antiulcerogênica em diferentes modelos experimentais, possivelmente relacionada aos mecanismos citoprotetores, especialmente a síntese de prostaglandinas na mucosa gástrica.

Portanto, os objetivos deste trabalho corresponderam ao isolamento, à identificação e à determinação do mecanismo de ação antiulcerogênica do(s) princípio(s) ativo(s) obtidos da referida espécie vegetal.

Uma fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}), obtida do extrato bruto hidroetanólico, foi purificada em coluna cromatográfica, fornecendo quatro frações denominadas F1A_{LAC}, F1B_{LAC}, F1C_{LAC} e F1D_{LAC}, que reduziram o índice de lesões ulcerativas no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.

As frações F1C_{LAC} e F1D_{LAC} também foram purificadas, fornecendo respectivamente, as lactonas sesquiterpênicas denominadas dihidro-epideoxiarteanaína b e deoxiartemisinina, que tiveram as estruturas moleculares definidas por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas e por ressonância magnética nuclear.

A dihidro-epideoxiarteanaína b e a deoxiartemisinina foram avaliadas no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos, em diferentes doses, tendo apresentado atividade

antiulcerogênica. As doses efetivas 50% (DE₅₀), foram de 55,6 mg/kg e 88,7 mg/kg, respectivamente. Estes compostos foram também avaliados neste mesmo modelo experimental, porém, com tratamento prévio dos animais com indometacina, um inibidor da ciclooxigenase, enzima responsável pela síntese de prostaglandinas. Nestas condições, os dois compostos deixaram de apresentar a atividade antiulcerogênica anteriormente observada.

Na sequência, foi detectado um aumento do muco aderido à mucosa gástrica, de 23,2 e 34,9%, respectivamente, nos grupos de animais tratados com a dihidro-epideoxiarteauína b e com a deoxiartemisinina. Estes resultados reforçaram a hipótese da interferência destes princípios ativos com o aumento da síntese de prostaglandinas.

No modelo de ligadura pilórica em ratos, os tratamentos intraduodenais com a dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina aumentaram em 80,8 e 40,7%, a atividade péptica do conteúdo gástrico, respectivamente. Somente o grupo de animais tratado com a deoxiartemisinina, apresentou redução de 45,9%, da concentração hidrogeniônica deste conteúdo. Estes resultados também são sugestivos de um aumento das prostaglandinas na mucosa gástrica, que promovem o aumento da liberação de pepsinogênio e ainda, podem exercer seus efeitos citoprotetores, diminuindo ou não, a secreção ácida gástrica.

Outro experimento capaz de avaliar a atividade de substâncias sobre a ciclooxigenase é a medida da agregação plaquetária. A dihidro-epideoxiarteauína b e a deoxiartemisinina potencializaram a agregação plaquetária induzida por ADP. Esta atividade foi totalmente revertida, quando realizada a adição prévia de indometacina, um inibidor da ciclooxigenase.

Sequencialmente, foi realizada a dosagem da prostaglandina E₂ na mucosa gástrica de ratos. Foi observado um aumento de 34,9%, na produção desta substância endógena, somente no grupo de animais tratado com a dihidro-epideoxiarteauína b.

O trabalho fitoquímico resultou inicialmente no isolamento das lactonas sesquiterpênicas identificadas como dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina. Os resultados obtidos na avaliação farmacológica destes compostos, indicaram que o mecanismo da ação antiulcerogênica destas substâncias esteja relacionado com o aumento da síntese de prostaglandinas, substâncias endógenas que constituem um dos principais fatores citoprotetores da mucosa gástrica.

2. Abstract

Artemisia annua L. crude hydroethanolic extract reduced the ulcerative lesion index on ethanol induced ulcer model. This extract was purified with the intention of having an enriched fraction of sesquiterpene lactones, since previous work had indicate the presence of this chemical group. The resulting fraction was more efficient in decreasing the ulcerative lesion index when evaluated under the same experimental conditions.

With these informations in mind, this study was undertaken to isolate and identify the active(s) substance(s) and to determine the probable pharmacological mechanism.

The enriched sesquiterpene lactone fraction was purified through column chromatography, using silicagel, and supplied four different polarity fractions as follows, F1A_{LAC}, F1B_{LAC}, F1C_{LAC} e F1D_{LAC}. All these fractions, when submitted to the ethanol induced ulcer in rats, resulted in different inhibition levels of the ulcerative lesion index.

F1C_{LAC} and F1D_{LAC} were purified through column chromatograpy using silicagel and increasing gradientes of hexane / ethyl acetate. The obtained fractions were monitorated by thin layer chromatography. The physical and spectral data (mass, ¹H-RMN and ¹³C-RMN) of compounds obtained from F1C_{LAC} and F1D_{LAC} were consistent with those of dhydro-epideoxyarteannuin b and deoxyartemisinin, respectively.

Dihydro-epideoxyarteannuin b and deoxyartemisinin were administrated orally on ethanol induced ulcer model in different dose levels. These two compounds presented dose-dependent inhibition of ulcerative lesion index, with ED₅₀ values of 55,6 and 87,5 mg/Kg, respectively.

The previous treatment with indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, blocked the antiulcerogenic activity of dihydro-epideoxyarteannuin b and deoxyartemisinin on ethanol induced ulcer model. These results suggest that the antiulcerogenic activity of these compounds have a straight relationship with an increase of prostaglandin synthesis.

This hypothesis was reinforced by the increase of adherent mucus on the gastric mucosa produced when dihydro-epideoxyarteannuin b and deoxyartemisinin were administrated orally, on ethanol induced ulcer model. Since the mucus synthesis is mediated by prostaglandins, the active substances could be acting by stimulating synthesis of these autacoids.

Intraduodenal administration of dihydro-epideoxyarteannuin b and deoxyartemisinin on pylorus ligation model in rats, was adopted to evaluate gastric acid and pepsin secretion. These substances did not modify the secretion volume. Only deoxyartemisinin reduced the hydrogenionic concentration of gastric content. The peptic activity was increased in both groups of animals, treated with dihydro-epideoxyarteannuin b and deoxyartemisinin.

Dihydro-epideoxyarteannuin b and deoxyartemisinin were evaluated in platelet agregation and increased the ADP induced agregation. This activity was reverted with the indomethacin presence.

The prostaglandin E₂ was quantified from gastric mucosa, in animals treated orally with dihydro-epideoxyarteannuin b and deoxyartemisinin, with and without previous indomethacin treatment. In these experimental conditions, only dihydro-epideoxyarteannuin b produced an increase on production of prostaglandins.

3. Introdução

3.1. A contribuição das espécies vegetais para a terapêutica medicamentosa

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é relatada há mais de cinco mil anos, em documentos escritos por civilizações antigas da China, Índia e Oriente Médio, porém esta importante atitude de buscar e descobrir novas formas de prevenção, tratamento e cura das mais diferentes patologias, a partir de fontes naturais, constitui indubitavelmente uma arte grandiosa, tão antiga quanto a própria humanidade. Após séculos de utilização empírica de preparações obtidas das próprias plantas medicinais ou de seus preparados brutos, o isolamento de alguns princípios ativos como a morfina, estricnina e quinina, no início do século XIX, marcou uma nova era e uma nova visão da comunidade científica em relação à utilização de plantas medicinais. Desta forma, foi iniciada a pesquisa sistemática, com o objetivo de identificar química e farmacologicamente os princípios ativos naturais (HAMBURGER e HOSTETMANN, 1991).

Ao longo do tempo, como resultado desta pesquisa, várias substâncias foram identificadas e forneceram grandes contribuições para a terapêutica, podendo ser citados alguns exemplos relevantes, como os glicosídeos cardiotônicos obtidos da *Digitalis*

purpurea L. e da *Digitalis lanata* Ehrh., utilizados até a atualidade, como fármacos de escolha no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. Além destes, são também importantes a atropina e a escopolamina, alcalóides tropânicos, obtidos de *Atropa belladonna* L., com atividade parassimpática e utilizados principalmente, como antiespasmódicos, os alcalóides de *Papaver somniferum* L., representados pela morfina e pela codeína, úteis como analgésicos de ação central e antitussígenos e ainda, os antimaláricos obtidos das cascas da *Cinchona calisaya* Weddell, representados pela quinina e pela quinidina, sendo que esta última substância, apresenta principalmente, uma atividade antidisrítica sobre o coração (PEZZUTTO, 1997).

O interesse por práticas terapêuticas não convencionais e por formas de tratamento que utilizam os produtos naturais, especialmente os derivados de espécies vegetais, tem crescido significativamente nos últimos anos. Este aumento de interesse pode ser explicado pela ineficácia e ocorrência de muitos efeitos colaterais decorrentes da utilização de recursos da medicina convencional e também, pela disseminação da informação, ainda que contestável, de que os produtos naturais são menos nocivos e mais seguros à saúde. Além disto, grande parte da população mundial, não tem acesso, por questões financeiras, aos medicamentos industrializados (BOULDIN et al., 1999, RATES, 2001). De acordo a Organização Mundial da Saúde, devido às condições econômicas desfavoráveis e consequente falta de acesso às práticas médicas convencionais e aos sistemas de saúde governamentais, entre 65 e 80% da população dos países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas medicinais para o cuidado primário à saúde (AKERELE, 1998).

Outro fator que tem também contribuído para este aumento de interesse é a grande eficácia clínica e consequente importância de algumas substâncias antitumorais obtidas de plantas, como os alcalóides da vinca, denominados vincristina e vinblastina, extraídos da espécie vegetal *Catharanthus roseus* G. Don e os compostos semi-sintéticos, denominados tenoposida e etoposida, que são derivados da epipodofilotoxina, obtida de *Podophyllum peltatum* L. e que possuem como mecanismo de ação antitumoral, a inibição da atividade da enzima topoisomerase II (GRAGG e NEWMAN, 1999). Além destes, também deve ser citado, como uma das principais descobertas científicas relacionadas ao tratamento do câncer até o momento, o diterpeno taxol, obtido das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. e *Taxus baccata* L. Atualmente, estão disponíveis dois de seus derivados semi-sintéticos, denominados paclitaxel e docetaxel, que são utilizados em vários tipos de câncer, com um

mecanismo de ação relacionado à estabilização de microtúbulos envolvidos na mitose celular. Adicionalmente, foram também descritos os compostos semi-sintéticos derivados do alcalóide camptotecina, obtido de *Camptotheca acuminata* Descne, denominados irinotecano e topotecano, cujo mecanismo de ação é relacionado à inibição da enzima topoisomerase I. Portanto, o reino vegetal assumiu uma inquestionável importância na terapêutica do câncer, sendo o responsável, juntamente com os microorganismos, por fornecer a maior parte dos fármacos disponíveis (TOPLISS et al., 2002). Há uma estimativa de que cerca de 25% de todos os medicamentos comercializados são direta ou indiretamente, derivados de espécies vegetais superiores. Em casos particulares, como os antitumorais e antimicrobianos, esta estimativa é incrementada, chegando a atingir 60% dos medicamentos disponíveis e a grande maioria, daqueles que estão sendo avaliados, nas últimas fases dos estudos clínicos (CALIXTO, 2000).

É importante ainda, citar a contribuição dos compostos que, apesar de possuírem um potencial terapêutico limitado, foram utilizados como modelos moleculares para a obtenção de outros compostos, com vantagens terapêuticas. Como exemplo, pode ser citado o desenvolvimento do atracúrio e de outros relaxantes musculares, a partir dos alcalóides do curare, obtidos de *Chondrodendron tomentosum* (WAIGH, 1988; PHARMACUEUTICALS..., 1994). A síntese dos anestésicos locais do tipo amida, utilizados na atualidade, também foi favorecida pela observação da relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica da cocaína, obtida de *Erythroxylum coca* Lam. (CALATAYUD e GONZALEZ, 2003).

Este renovado interesse mundial nos produtos naturais, teve algumas consequências importantes, sendo que várias empresas privadas e organizações governamentais, têm instituído projetos de pesquisas nesta área. Na década de 70, nenhuma das 250 maiores companhias do ramo farmacêutico do mundo, mantinham qualquer programa de pesquisa na área de produtos naturais. Já na década de 90, pelo menos metade delas já tinham introduzido este tipo de pesquisa como uma de suas prioridades (FELLOWS, 1995).

Desta forma, houve um crescimento nas pesquisas, evidenciado pelo grande avanço científico envolvendo os estudos agrônômicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos de plantas medicinais, que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Como consequência, ocorreu também um aumento dos trabalhos científicos publicados nesta área, tanto em congressos, como em periódicos nacionais e internacionais, além do

próprio surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais (CORDELL, 1995; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Apesar de toda a pesquisa realizada e dos resultados obtidos, é importante reconhecer que o potencial das plantas superiores como fonte de novas substâncias ativas permanece praticamente inexplorado. É estimada a presença de, entre 250000 e 500000 espécies de plantas superiores sobre o planeta, sendo que somente uma pequena porcentagem, entre 5 e 15%, já foi investigada cientificamente, sendo importante ressaltar a importante característica de multidisciplinaridade, necessária para o desenvolvimento deste tipo de atividade científica (HAMBURGER e HOSTETMANN, 1991; GRAGG et al., 1997). Estes dados demonstram que, as plantas medicinais ainda constituem uma enorme e rica fonte de novas moléculas a serem exploradas terapeuticamente no futuro ou ainda, como ferramentas em estudos biológicos, para a elucidação de aspectos etiológicos de determinadas patologias que ainda permanecem obscuros (LEWIS e HANSON, 1991).

Em relação à contribuição do reino vegetal para o tratamento das úlceras pépticas, vários princípios ativos tiveram sua atividade antiulcerogênica comprovada. Um dos mais importantes, pertencente à classe das saponinas, é a carbenoxolona, obtida principalmente dos rizomas de *Glycyrrhiza glabra* L. ou “alcaçuz” e estando presente também, em várias espécies do gênero *Abrus*. Seu mecanismo de ação foi muito estudado e além de inibir a secreção de pepsina, está relacionado ao aumento do conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica, por inibir as enzimas que promovem o seu catabolismo, denominadas 15-hidroxi-PG-dehidrogenase e Δ^{13} -PG-redutase (LEWIS et al., 1991). Esta substância também promove a proliferação e a inibição da exfoliação celulares, no sentido de manter a integridade da mucosa gástrica (BORRELLI e IZZO, 2000).

Em adição, praticamente todas as classes de princípios ativos naturais já foram estudadas química e farmacologicamente, tendo sido identificados vários representantes com atividade antiulcerogênica, por meio de mecanismos de ação bastante distintos. Para exemplificar, podem ser citados os flavonóides, com ações diversas que incluem a diminuição da liberação de histamina no estômago, o aumento de prostaglandinas, a inibição da histidina decarboxilase e até mesmo, a inibição do crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*. E ainda os taninos, que pela sua propriedade adstringente, em contato com a mucosa gástrica, promovem uma diminuição de sua permeabilidade e consequentemente, do contato com agentes agressores (BORRELLI e IZZO, 2000).

No CPQBA/UNICAMP, foram desenvolvidos nos últimos anos, diversos trabalhos multidisciplinares, que envolvem a atividade antiulcerogênica de espécies vegetais, com base em informações etnobotânicas. A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida popularmente como “alecrim”, tem a sua atividade antiulcerogênica provavelmente relacionada aos princípios ativos naturais com atividade antioxidante (DIAS et al., 2000). Além desta, também foram investigadas a *Maytenus ilicifolia* Martius, conhecida por “espinheira santa” (QUEIROGA et al., 2001), algumas espécies do gênero *Eremanthus*, conhecidas popularmente por “candeia”, cuja atividade antiulcerogênica parece ser devida à presença de alfa-bisabolol (NOGUEIRA, 2000), e *Mikania laevigata* Shultz Bip., ou “guaco”, cuja atividade parece estar relacionada à presença de cumarinas, que interferem com o controle da secreção ácida gástrica (BIGHETTI, 1999).

A *Artemisia annua* L., investigada neste trabalho, desenvolvido nos últimos dez anos, teve a sua atividade antiulcerogênica detectada, provavelmente devido à presença de lactonas sesquiterpênicas, que parecem aumentar o conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica (DIAS, 1997; DIAS et al., 2001; FOGLIO et al., 2002).

Outras espécies do gênero *Artemisia* têm sido estudadas e possuem indicações para a utilização em doenças gastrointestinais. Uma delas, a *Artemisia douglasiana* Besser, conhecida popularmente na Argentina como “matico”, é utilizada pela população local no tratamento de úlceras gástricas. O extrato aquoso obtido das partes aéreas, foi avaliado em alguns modelos experimentais, apresentando atividade antiulcerogênica, devido à presença de uma lactona sesquiterpênica do grupo das guaianolidas, denominada dehidroleucodina (GIORDANO et al., 1990). O mecanismo de ação antiulcerogênica desta substância parece estar relacionado com uma interferência sobre os fatores citoprotetores da mucosa gástrica, representados pelas prostaglandinas, que promovem um aumento da produção de muco gastroprotetor aderido à mucosa e pelas substâncias sulfidrilicas não proteicas, que possuem atividade antioxidante (GUARDIA et al., 1994). A própria dehidroleucodina e em maior intensidade, os extratos brutos da referida espécie vegetal, apresentam atividade antioxidante, que pode também justificar a ação antiulcerogênica observada quando a espécie é utilizada na sua forma bruta (REPETTO e LLESUY, 2002).

As lactonas sesquiterpênicas são metabólitos secundários produzidos por várias espécies vegetais, pertencentes a várias famílias, incluindo a Asteraceae. Vários compostos desta classe apresentam diferentes atividades biológicas, alguns dos quais são de grande

interesse para a terapêutica. Os efeitos das lactonas sesquiterpênicas são devidos principalmente à capacidade destes compostos em inibir a atividade de enzimas e outras proteínas funcionais em células vivas. Estes efeitos são mediados por meio de um mecanismo químico comum, que envolve a formação de ligações covalentes com resíduos livres de cisteinil. Muitas das lactonas sesquiterpênicas já estudadas reagem com tióis de baixo peso molecular presentes nas células, tais como a cisteína e a glutathione. Para isto, ocorre uma adição de Michael, do enxofre pertencente ao grupamento tiol, aos elementos estruturais α,β insaturados das lactonas sesquiterpênicas (TORNHAMRE et al., 2001).

Como exemplo desta classe de metabólitos vegetais ativos, a helenalina e seus compostos correlatos, presentes em espécies da família Asteraceae, incluindo a *Arnica montana* L., são capazes de reduzir o edema de pata provocado por carragenina e a artrite induzida em ratos. Além disto, inibem a migração leucocitária e a quimiotaxia, possivelmente por inibir a fosfolipase A_2 (SCHRÖDER, 1990) e também parecem inibir a síntese de leucotrienos em plaquetas, especialmente o leucotrieno C_4 , o que também pode influenciar na sua atividade antiinflamatória (TORNHAMRE et al., 2001).

Outras lactonas sesquiterpênicas, obtidas da espécie *Anthemis altissima* L., também pertencente à família Asteraceae, apresentaram atividade antimicrobiana sobre o *Helicobacter pylori*, bactéria que coloniza a mucosa gástrica, sendo a responsável pela maioria dos casos de gastrite e úlceras pépticas, que podem até mesmo, em casos mais extremos, evoluir para uma neoplasia (KONSTANTINOPOULOU et al., 2003).

Apesar do progresso científico atingido pela química farmacêutica e pela farmacologia, o que acarretou no desenvolvimento e na produção de fármacos efetivos e seguros para o tratamento dos distúrbios ácido-pépticos, o reino vegetal constitui certamente uma fonte importante de novos compostos químicos a serem utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos ou como fitofármacos isolados. Ainda existe a possibilidade, dos produtos naturais serem empregados de forma alternativa, como simples adjuntos na dieta, a serem utilizados conjuntamente com a terapia convencional, ou ainda de forma preventiva ao aparecimento dos distúrbios ácido-pépticos (BORRELI e IZZO, 2000).

3.2. A *Artemisia annua* L.

A *Artemisia annua* L., espécie vegetal pertencente à família Asteraceae, é nativa de da China, onde é conhecida por “qinghao”, ocorrendo naturalmente, como parte da vegetação do tipo estepe, na região norte das províncias de Chahar e Suiyan. Atualmente, está presente em vários países, como Austrália, Argentina, Bulgária, França, Hungria, Itália, Espanha e Estados Unidos (DHINGRA et al., 2000).

Esta espécie vegetal apresenta uma utilização terapêutica milenar pela medicina tradicional chinesa, sendo indicada para o tratamento de resfriados, febres e malária. O primeiro relato de utilização dos extratos de *Artemisia annua* L. datam do ano de 167 aC no documento intitulado “Recipes for Fifty Two Prescriptions”, encontrado nos túmulos da Dinastia Mawangdui Han, que recomendava seu uso para o tratamento de hemorróidas. Na sequência, o uso dos extratos para o tratamento de vários tipos de febres incluindo a malária, foi relatado em Zhouhou Beiji Fang, “The Handbook of Prescriptions for Emergencies”, editado no século IV por Ge Hong (DHINGRA et al., 1999).

A malária é uma doença que acomete principalmente as regiões tropicais e apresenta, como agentes etiológicos, quatro espécies diferentes de protozoários, que correspondem ao *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*, sendo que este último, possui maior relevância clínica. Estes parasitas são transmitidos ao ser humano por fêmeas de mosquitos anofelinos, que funcionam como vetores, pertencentes a mais de cinquenta espécies (KUMAR, 2002).

Cerca de 40% da população mundial apresenta risco significativo de contrair a malária. Anualmente, cerca de 250 milhões de pessoas contraem a doença e mais de 1,5 milhões delas, sendo a maioria composta por crianças africanas, morrem, vítimas desta doença. Em pacientes com malária grave e complicada, a mortalidade atinge entre 20 e 50% dos casos (BALINT, 2001). No Brasil, de acordo com o Anuário Estatístico de Saúde, editado pelo Ministério da Saúde, dentre as doenças de notificação compulsória, a malária atingiu valores de incidência bastante elevados, com 471.892, 637.472 e 615.245 casos notificados em 1998, 1999 e 2000, respectivamente, tornando-se portanto aquela de maior incidência, seguida pela dengue (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE SAÚDE DO BRASIL, 2001).

Além da alta incidência da doença, outra questão preocupante é referente à ocorrência de altos índices de resistência dos parasitas aos antimaláricos convencionais, havendo portanto, uma necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com alvos de ação diferentes, que sejam úteis nos casos de resistência (BALINT, 2001, OLLIARO, 2001).

Como resultado de uma pesquisa iniciada na década de 60 por pesquisadores chineses, a artemisinina ou “qinghaosu” (figura 1) responsável pela atividade antimalárica foi isolada em 1972 e em 1979, teve sua estrutura molecular definida (KLAYMAN, 1985). Esta substância é uma lactona sesquiterpênica, contendo um grupamento endoperóxido, que parece ser essencial à sua atividade contra o esquizontocida (CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 1982). A artemisinina faz parte de uma nova classe de antimaláricos que são efetivos contra o *Plasmodium* resistente a múltiplas drogas e por esta razão, é considerada de grande importância na abordagem terapêutica atual desta doença, sendo utilizada muitas vezes de forma combinada, principalmente com a mefloquina (BALINT, 2001).

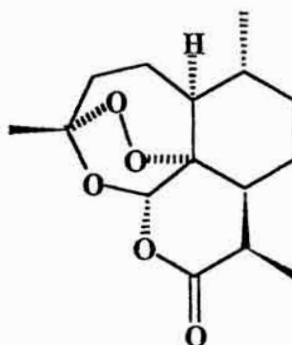


FIGURA 1: Estrutura molecular da artemisinina

A artemisinina e seus derivados apresentam atividade em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, promovendo uma rápida redução da parasitemia, logo após a administração. O mecanismo desta ação parece envolver duas etapas, sendo que a primeira compreende uma quebra dependente de ferro, da ponte endoperóxido para a geração de um radical livre instável e ou espécies eletrofílicas. A segunda etapa envolve a formação de aductos covalentes entre o fármaco e proteínas do parasita. Os *Plasmodium* são multiplicados dentro dos eritrócitos do hospedeiros, e que esta multiplicação é dependente de um grupamento heme presente na hemoglobina. A artemisinina age sobre estes

grupamentos heme formando complexos com o grupamento peróxido tornando-os indisponíveis para o parasita e interferindo, consequentemente de forma negativa, com seu ciclo de vida (DHINGRA et al.; 1999, BALINT, 2001).

Apesar da importância da artemisinina, foram desenvolvidos alguns derivados semi-sintéticos com a manutenção do grupamento endoperóxido, considerados de primeira geração, com a finalidade de alterar ou mesmo otimizar algumas características físico-químicas e farmacocinéticas. Estes compostos correspondem à dihidroartemisinina e aos profármacos arteméter, arteéter e artesunato de sódio, que são biotransformados em dihidroartemisinina. O ácido artelínico, demonstrou atingir maior concentração plasmática, maior capacidade de ligação com as hemácias e menor toxicidade que os outros derivados de primeira geração. Atualmente, estão sendo estudados outros derivados que vêm sendo considerados endoperóxidos semi-sintéticos de segunda geração, sempre com o objetivo de obtenção de vantagens, podendo ser citados como exemplos, os análogos da azaartemisinina, da classe das lactamas, mais estáveis em ambientes ácidos como o estômago e de acordo com alguns estudos preliminares, bem mais eficazes no tratamento da malária que aqueles considerados de primeira geração (BORSTNIK et al., 2002).

Segundo OLLIARO (2001), é importante ressaltar que não há relatos de resistência adquirida pelo parasita à artemisinina e seus derivados, nem de casos de falha terapêutica relacionada à diminuição da sensibilidade, ressaltando portanto, a necessidade da promoção de sua utilização estritamente racional.

Além da pesquisa direcionada para o tratamento da malária, a *Artemisia annua* L. também tem sido estudada em relação a outras atividades farmacológicas. O óleo essencial da espécie e o extrato bruto etanólico, apresentaram atividade depressora do sistema nervoso central, aumentando o tempo de latência para o aparecimento das convulsões induzidas por picrotoxina e pilocarpina e prevenindo, aquelas provocadas pelo pentilenotetrazol e pela estricnina em ratos (PERAZZO et al., 2003). Este óleo essencial, também produziu uma atividade antimicrobiana, sobre algumas bactérias e fungos e ainda, atividade antioxidante, avaliadas em modelos *in vitro* (JUTEAU et al., 2002). Ainda em relação à atividade antimicrobiana, frações semipurificadas, enriquecidas nos flavonóis crisosplenol-D e crisoplenetina, potencializaram a pequena atividade antimicrobiana da berberina contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, possivelmente por inibição da bomba que confere à bactéria, a resistência a múltiplas drogas. Estes dois flavonóis

parecem também, potencializar a atividade da artemisinina contra o *Plasmodium falciparum* (STERMITZ et al., 2002).

A artemisinina e alguns de seus derivados semi-sintéticos, como o artesunato de sódio e a dihidroartemisinina também apresentaram uma atividade antitumoral, inibindo o crescimento de células tumorais de pulmão, próstata, melanoma, rim, sistema nervoso central, incluindo diversos tipos de células resistentes às terapias convencionais, além de inibirem também o crescimento tumoral *in vivo*, em ratos e camundongos. Esta atividade pode estar relacionada com o efeito antiangiogênico, impedindo, portanto a proliferação de células endoteliais que resulta na formação de novos vasos sanguíneos, que são imprescindíveis para a nutrição e o crescimento tumorais (CHEN et al, 2003).

3.3. A Úlcera Péptica e seus Aspectos Fisiopatológicos

A camada mucosa do estômago e do duodeno é constantemente exposta à ação do ácido clorídrico e da pepsina. Em condições normais, esta mucosa possui mecanismos que a defendem da autodigestão causada por estes agentes, além de protegê-la também contra fatores agressivos exógenos, como o estresse, a hiperosmolaridade dos alimentos e ainda a ingestão de etanol e drogas antiinflamatórias (ALLEN et al. 1993).

A secreção ácida gástrica é controlada por mecanismos complexos e interativos que atuam no sistema nervoso central e também nos âmbitos periférico e celular. No sistema nervoso central, algumas regiões como o núcleo motor dorsal do nervo vago, o hipotálamo e o núcleo do trato solitário, são responsáveis por este processo. As fibras eferentes originadas no núcleo motor dorsal do nervo vago descem até o estômago e realizam sinapses com as células ganglionares do sistema nervoso entérico. O sistema nervoso central modula portanto, a atividade do sistema nervoso entérico, sendo a acetilcolina o seu principal neurotransmissor. Este sistema é considerado como o principal contribuinte para o início da secreção ácida, desencadeado pela denominada fase cefálica, que ocorre em resposta aos estímulos visuais, olfatórios e gustativos, relacionados à antecipação e ao contato propriamente dito com alimentos (HOOPERWERF e PASRICHA, 2003).

Ainda nas regiões do sistema nervoso central, existem grande número de receptores para substâncias pertencentes à família dos polipeptídeos pancreáticos, que agem estimulando a secreção ácida gástrica. Recentemente, foi demonstrada também, a participação do hormônio liberador de tirotropina, estimulando esta secreção, especificamente no núcleo motor dorsal do nervo vago. Existem outras substâncias endógenas de ação também central, que agem de maneira inibitória sobre a secreção ácida, como a interleucina 1, a neurotensina e a dopamina (SCHUBERT, 1994; AIHARA et al., 2003; SCHBERT, 2003).

Os principais agentes estimulantes periféricos da secreção ácida gástrica, são a histamina e a gastrina, como agentes parácrinos e endócrinos, respectivamente, e a acetilcolina, como neurotransmissor. O principal agente inibidor, corresponde à somatostatina (LEHMANN et al., 2003).

A histamina é considerada como a principal substância responsável pela estimulação da secreção ácida gástrica. No estômago, esta substância é estocada nas células símiles de enterocromafins, localizadas na vizinhança das células parietais. A histamina promove uma estimulação direta da célula parietal por meio da interação com receptores do tipo H_2 , presentes nestas células, que utilizam o AMP cíclico como segundo mensageiro intracelular e indiretamente, por meio do receptor do tipo H_3 , presente nas células D, cuja ativação, promove a inibição da secreção de somatostatina (SCHUBERT, 2000).

Já foi identificado também, o receptor H_4 , mas ainda não foi definido se existe ou não uma interferência deste receptor na regulação da secreção ácida, pois o mesmo interage também com os ligantes para H_3 , necessitando, para o entendimento exato de sua função, do desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos (SCHUBERT, 2003).

A acetilcolina, é liberada das terminações parassimpáticas pós sinápticas e age em receptores muscarínicos que utilizam o íon cálcio como segundo mensageiro intracelular. A ação estimulatória direta sobre as células parietais ocorre por meio da interação da acetilcolina com receptores do tipo M_3 . Este neurotransmissor atua também sobre receptores do tipo M_1 localizados nas células símiles de enterocromafins, promovendo a secreção de histamina e estimulando de forma indireta, a secreção ácida. Há evidências de que a acetilcolina também inibe a secreção de somatostatina, um dos principais agentes

inibitórios da secreção ácida gástrica (BAROCELLI e BALLABENI, 2003; LEHMANN et al., 2003).

A gastrina é liberada na corrente circulatória pelas células G, presentes no antro gástrico, por estímulos fisiológicos relacionados à ingestão de alimentos. Esta substância também estimula a secreção ácida por agir diretamente na célula parietal e ainda, por estimular a liberação de histamina das células símiles de enterocromafins. Esta última ação é decorrente da ação da gastrina na estimulação da enzima histidina decarboxilase, responsável pela síntese de histamina e também pelo aumento do RNA mensageiro, que carrega a mensagem desencadeadora da síntese desta enzima. Todas as ações mencionadas são mediadas por receptores da família gastrina/colecistocinina do tipo CCK₂, que também utilizam o íon cálcio como segundo mensageiro intracelular (SCHUBERT, 2000).

Além da gastrina, outros peptídeos podem influenciar a secreção ácida gástrica. A somatostatina, com ação inibitória sobre a secreção ácida, age sobre as células símiles de enterocromafins inibindo a liberação de histamina e também, de forma direta sobre a célula parietal, sendo ambas as ações, mediadas por receptores do tipo SST₂. A galanina, liberada pelos neurônios do sistema nervoso entérico, também inibe a liberação de histamina pelas células símiles de enterocromafins, diminuindo a secreção ácida gástrica. Outro peptídeo, denominado peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária ou PACAP, é liberado por neurônios do plexo mioentérico, interagindo com canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L, estimulando a síntese e secreção de histamina a partir das células símiles de enterocromafins por meio da interação com receptores seletivos do tipo PAC1 (SACHS et al., 2002, SCHUBERT, 2000).

O controle intracelular da secreção ácida é dado pela atividade da H⁺, K⁺ ATPase, presente nas células parietais. Esta enzima promove a troca de íons H⁺ e K⁺, resultando no maior gradiente iônico conhecido dentre os vertebrados, com pH intracelular de aproximadamente 7,3 e um pH intracanalicular de cerca de 0,8. A H⁺, K⁺ ATPase é composta pela subunidade α , responsável pela atividade catalítica e pela subunidade β , aparentemente com a função de estabilização da subunidade α (HIRSCHOWITZ et al., 1995). Nas células parietais em repouso, esta enzima é estocada em tubovesículas, que na ocorrência de estímulo por diferentes secretagogos, fundem com a membrana apical dos canalículos da célula parietal, iniciando a liberação do ácido clorídrico. Quando o estímulo

é cessado, as enzimas são recicladas novamente para o compartimento citoplasmático (SCHUBERT, 2003).

Ainda em relação ao processo secretório, é importante ressaltar a função das células principais, presentes no corpo e fundo do estômago e que secretam os pepsinogênios, proteínas classificadas como endopeptidases, pertencentes ao grupo das proteinases aspárticas. Estas proteínas consistem de uma única cadeia polipeptídica com peso molecular de aproximadamente 42000 Da. Nas células em repouso, os pepsinogênios são armazenados em grânulos, os quais inibem a síntese. Após estímulos fisiológicos ou químicos externos, os pepsinogênios são secretados no lúmen estomacal. Nesta situação, em valores de pH abaixo de 5, são convertidos pela ação do ácido clorídrico, na enzima correspondente, denominada pepsina, relacionada com a digestão de proteínas no estômago e também com a fisiopatologia da úlcera péptica. Os mecanismos estimuladores da secreção do pepsinogênio parecem incluir principalmente duas grandes vias, uma delas, considerada mais eficiente, envolvendo o aumento de AMP cíclico e a outra, modificações nas concentrações intracelulares do íon cálcio. A ativação da proteína quinase C também parece estar envolvida no processo regulatório (GRITTI et al., 2000).

Além do controle da secreção ácida, a integridade da mucosa gástrica requer a presença de prostaglandinas, principalmente a prostaglandina E₂ (PGE₂) e a prostaciclina (PGI₂). Estas substâncias são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, por todas células nucleadas do organismo, alcançando as maiores concentrações na mucosa gástrica. O ácido araquidônico é liberado das membranas celulares, podendo, dentre outras possibilidades, seguir a via da ciclooxygenase (COX, prostaglandina endoperóxido sintase) para ser transformado em prostaglandinas. Esta enzima ocorre no organismo em duas isoformas, sendo a COX-1 considerada constitutiva, participando de processos fisiológicos e a COX-2, considerada induzível, estando presente em tecidos que apresentam lesões inflamatórias (ATAY et al., 2000).

Estas substâncias são capazes de inibir a secreção ácida, além de estimular a secreção de bicarbonato e muco protetor aderido à mucosa gástrica. Promovem também uma inibição da migração e ativação leucocitárias e diminuição da adesão destas células ao endotélio e ainda, um aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, prevenindo a isquemia e otimizando, desta forma, a oferta de nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos para as células (ATAY ET al., 2000).

Os receptores específicos para as prostaglandinas, foram recentemente caracterizados, sendo que os mesmos apresentam sete domínios transmembrana comuns à família de receptores acoplados à proteína G. São divididos em subtipos de acordo com a especificidade que apresentam pelos diferentes tipos de prostaglandinas e são relacionados a diferentes vias de transdução de sinal (EBEHART e DÚBOIS, 1995).

Os receptores para a prostaglandina E_2 , de tão grande importância para a mucosa gástrica, são denominados EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4 , sendo que os receptores EP_1 promovem aumento da concentração do cálcio intracelular, EP_2 e EP_4 estimulam a adenilato ciclase, com consequente aumento da concentração de AMP cíclico e EP_3 , inibe esta mesma enzima (ICHIKAWA et al., 1996).

As prostaglandinas, de maneira geral, inibem a secreção ácida gástrica, mas seus principais efeitos protetores sobre a mucosa, envolvem fatores não relacionados ao controle secretório, que no seu conjunto são denominados citoprotetores (ROBERT, 1979).

Estas substâncias são capazes de aumentar a secreção de muco e bicarbonato e também, de aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa, o que tem como consequência, uma maior oferta de oxigênio e nutrientes e a mais rápida remoção de metabólitos ou produtos exógenos tóxicos na mucosa. Além disto, inibem a migração e a ativação de algumas células inflamatórias (ATAY et al., 2000).

O muco é um importante fator citoprotetor, que consiste numa camada de gel sobre a mucosa, viscoso e elástico, que é formada por 95% de água e 5% de glicoproteínas de alto peso molecular. Os componentes não proteicos incluem a imunoglobulina A (IgA), lisosima, lactoferrina, lipídeos, polissacarídeos e espécies iônicas. Sua função é basicamente, de conferir uma barreira física contra moléculas tóxicas e microorganismos. O muco também possui a capacidade de reter o bicarbonato liberado no lúmen, neutralizando o ácido clorídrico, antes que o mesmo seja difundido pela mucosa, além de funcionar também como antioxidante, impedindo a lesão causada pelos radicais livres. Todos estes efeitos dependem da constituição do muco e da quantidade ou espessura da camada que recobre a mucosa (PENISSI e PIEZZI, 1999; REPETTO e LLESUY, 2002).

A secreção de bicarbonato pela células epiteliais da superfície da mucosa gástrica é um dos principais mecanismos de defesa da mucosa contra o ácido clorídrico. O muco aderido à superfície luminal da mucosa proporciona uma zona de baixa turbulência, permitindo o desenvolvimento de gradiente para o bicarbonato a partir do lado luminal.

Pequenas quantidades de bicarbonato protegem a mucosa contra grandes quantidades de ácido clorídrico por neutralizar os íons H^+ que se difundem para dentro da mucosa, através da camada de muco. Apesar da secreção de bicarbonato ser regulada pelas prostaglandinas e por outros fatores neuro-humorais, as prostaglandinas endógenas são particularmente importantes no controle local desta secreção. Em experimentos realizados em animais, foi observado que a secreção de bicarbonato no estômago é estimulada pela PGE_2 via receptores do tipo EP_1 , enquanto que no ³duodeno, a estimulação é dada via receptores EP_3 (TAKEUCHI et al. 1999).

Além do controle fisiológico da integridade celular da mucosa, as prostaglandinas estão envolvidas na cura e na recorrência das úlceras pépticas. A deficiência de prostaglandinas retarda a cura dos processos ulcerosos, por interferir com a angiogênese, inibição da proliferação celular, da reconstrução da matriz extracelular e da produção de muco, e aumento do número de células inflamatórias no local da lesão (ARAKAWA et al., 1998).

A prostaglandina E_1 estimula a expressão genética do fator de crescimento transformador $\beta 1$ ($TGF\beta 1$), envolvido na reconstrução da matriz extracelular e aumenta a produção fator de crescimento de hepatócitos (HGF) em fibroblastos gástricos, um dos mais potentes agentes estimulantes do reparo epitelial (TAKAHASHI et al., 1996; ARAKAWA et al., 1998).

Em lesões ulcerativas induzidas experimentalmente, por etanol, fármacos antiinflamatórios não esteroidais e estresse, ocorre a participação de leucócitos ativados que liberam mediadores inflamatórios que causam danos à mucosa, como a elastase granulocítica, radicais livres e o fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$). As prostaglandinas E_1 e E_2 e a prostaciclina (PGI_2), inibem a produção do $TNF-\alpha$ em monócitos e mais especificamente a PGI_2 e seu análogo iloprost, inibem a ativação de neutrófilos. Ambas as ações são mediadas por meio de um aumento do AMP cíclico. (HARADA et al., 1999).

A síntese de prostaglandinas está aumentada nas margens das úlceras induzidas experimentalmente pelo ácido acético em animais e que estão em processo de cicatrização. Nestas regiões, foi verificado que, dentre as duas isoformas da ciclooxigenase, a $COX-2$ tem a sua expressão genética aumentada. O envolvimento da $COX-2$ na cura das úlceras é reforçado também pela observação de que os seus inibidores seletivos, como o rofecoxib e o celecoxib, retardam este processo (MIZUNO et al., 1997).

Outro elemento que contribui com a citoproteção da mucosa gástrica é o óxido nítrico, uma molécula simples, que desempenha diferentes funções no organismo e é produzido a partir da L-arginina pela ativação da NO sintase, que por sua vez, apresenta três isoformas. Duas delas são consideradas constitutivas, participando de respostas fisiológicas e são classificadas como NO sintase neuronal e endotelial, de acordo com a respectiva localização. A outra isoforma é considerada induzível, sendo produzida por macrófagos presentes em tecidos inflamados (XIE et al., 1992).

No trato gastrointestinal, o óxido nítrico é considerado o mais importante neurotransmissor não colinérgico e não adrenérgico (NANC). É liberado, por estimulação vagal, pelos neurônios do plexo mioentérico, promovendo o reflexo de acomodação, que permite ao estômago, receber um grande volume de alimento, com apenas um pequeno aumento da pressão interna. Este reflexo é diminuído em pacientes portadores de dispepsias (TAKAHASHI et al., 2003). Já o óxido nítrico formado no endotélio vascular é capaz de promover intensa vasodilatação, com consequente aumento do fluxo sanguíneo na mucosa, o que auxilia na manutenção de sua integridade, por permitir uma maior oferta de oxigênio e nutrientes e ainda, por facilitar a remoção de substâncias tóxicas (KONTUREK et al., 1995). Além destes efeitos, foi verificado em alguns ensaios *in vitro*, que o óxido nítrico é capaz de aumentar o conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica, por meio da estimulação da ciclooxigenase (ATAY et al., 2000).

A formação de radicais livres, decorrentes do metabolismo do ácido araquidônico, plaquetas, macrófagos e células musculares lisas, pode causar lesão tecidual. A mucosa gástrica possui uma alta concentração de tióis, como glutatona reduzida, o principal componente do grupo das substâncias sulfidrílicas não proteicas endógenas. Estas substâncias são capazes de efetuar ligações com estes radicais livres gerados, impedindo a sua ação nociva sobre a mucosa, funcionando portanto, como antioxidantes. Outra hipótese que também explica a ação citoprotetora destas substâncias, corresponde ao aumento da síntese de prostaglandinas e ainda, a diminuição da sua degradação (SZABO, 1981). A prevenção ao aumento da permeabilidade microvascular, fator patogênico inicial no desenvolvimento de úlceras induzidas por etanol e a inibição da motilidade gastrointestinal também parecem estar envolvidos (TAKEUCHI et al., 1989).

Em conclusão, são vários os mecanismos que controlam a secreção ácida e a integridade da mucosa gástrica, sendo que as úlceras pépticas são causadas pela quebra do balanço existente entre os mecanismos citoprotetores e os agentes agressivos. Na ocorrência de uma quebra do balanço existente entre os fatores agressivos endógenos, representados pelo ácido clorídrico e pela pepsina e exógenos, representados principalmente pelo uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais, pelo alcoolismo, tabagismo e pelo estresse, e os fatores de defesa da mucosa, pode ocorrer, dentre outras patologias, o aparecimento da úlcera gástrica, que é considerada como um dos distúrbios ácido-pépticos mais importantes (BORRELI e IZZO, 2000).

Vários fatores interferem na patogênese desta doença, incluindo o aumento da massa das células parietais, secreção ácida pós prandial e da liberação de gastrina, a hipersensibilidade aos secretagogos, fatores genéticos e ambientais, como o fumo, as bebidas alcoólicas, o estresse e as infecções bacterianas (GRAHAM, 1989).

A histórica descoberta sobre a presença da bactéria Gram negativa *Helicobacter pylori* no estômago de pacientes com gastrite crônica, foi considerada um importante evento em relação ao perfeito entendimento referente à patogênese da úlcera péptica (WARREN e MARSHALL, 1983)

Este agente é atualmente considerado como talvez, o mais importante fator agressivo no desenvolvimento da doença ulcerosa gástrica. Em grande parte dos estudos realizados, o *Helicobacter pylori* foi identificado em cerca de 70% dos pacientes com gastrite crônica e úlcera gástrica e em 90% daqueles com úlcera duodenal. E ainda, em 20% de pacientes sadios assintomáticos, podendo ocorrer variações. Este microorganismo é também considerado um dos principais responsáveis pela recorrência de úlceras gástricas já tratadas (PAKODI et al., 2000).

Esta bactéria ácido sensível, consegue sobreviver no ambiente gástrico por possuir a enzima urease, que catalisa a formação de amônia a partir da uréia captada da mucosa, o que confere um microambiente com pH próximo à neutralidade em seu redor (SCOTT et al., 2000).

O mecanismo de ulcerogênese utilizado pelo *Helicobacter pylori* não é totalmente conhecido. Este microorganismo é capaz de sintetizar várias enzimas, incluindo a urease, catalase, proteases, lipases, fosfolipases e desidrogenase alcoólica, que promovem danos à mucosa. Além disto, produzem também diversas citocinas, incluindo uma citocina

vacuolizante de 87 KDa, que é expressa em 65% das linhagens da bactéria e promove vacuolização em células eucarióticas (PAKODI et al., 2000).

Além disto, a infecção pela bactéria promove um aumento da síntese de diversos mediadores do processo inflamatório como o fator ativador de plaquetas, que promove agregação plaquetária junto à microcirculação gástrica, leucotrieno B₄ e interleucinas 6 e 8. Ocorre também, um aumento da ativação de neutrófilos com consequente geração de radicais livres, estimulação da secreção de pepsinogênio e de histamina das células similares de enterocromafins, uma redução da hidrofobicidade da mucosa e da produção do muco protetor (PAKODI et al., 2000).

Outro fator que pode estar associado às lesões gástricas produzidas pela infecção por *Helicobacter pylori*, é o aumento da secreção de gastrina das células G e a diminuição da somatostatina, que conjuntamente promovem uma hiperacidez gástrica (SCHUBERT, 1994).

A evolução da doença causada pelo *Helicobacter pylori* pode ter como consequência, o aparecimento de câncer gástrico, como indicado pela Organização Mundial da Saúde em 1994. Há um consenso de que, a gastrite atrófica crônica causada por este microorganismo é o maior precursor do câncer gástrico (FORMAN e GRAHAM, 2004). A inflamação crônica causada pelo *Helicobacter pylori* ativa o sistema imunológico, gerando radicais livres que podem causar danos ao DNA. Alterações nos mecanismos de reparo tecidual e a secreção de citocinas e fatores de crescimento, bem como moléculas efetoras da própria bactéria, causam distúrbios no balanço entre proliferação epitelial e apoptose, promovem o acúmulo de mutações genéticas potencialmente oncogênicas e ainda, auxiliam na neovascularização do tumor (NORMARK et al., 2003).

3.4 A Úlcera Péptica e seus Alvos Terapêuticos

A partir da segunda metade do século XX, o tratamento das úlceras pépticas passou por grandes modificações e progressos. Em tempos bastante remotos, os indivíduos acometidos por esta doença, ingeriam conchas marinhas moídas para o alívio dos sintomas. A presença do carbonato de cálcio, que neutraliza o ácido gástrico, justifica esta utilização popular. Na sequência, foram desenvolvidos alguns antiácidos como o bicarbonato de sódio e os hidróxidos de alumínio e magnésio, que aliviam os sintomas, mas são pouco utilizados na terapêutica atual, principalmente pela baixa duração de efeito. Para aumentar esta duração, foram administrados juntamente com os antiácidos, alguns agentes anticolinérgicos, que além de inibirem secreção ácida, são capazes de diminuir o peristaltismo, aumentando consequentemente, o tempo de retenção destes antiácidos no estômago. Esta utilização possui limitações devido aos efeitos colaterais que surgem devido à atividade parassimpática geral. Antagonistas seletivos dos receptores M_1 , como a pirenzepina, e a terenzepina, possuem ainda uma pequena utilização clínica, devido à diminuição da ocorrência destes efeitos colaterais (AIHARA et al., 2003).

Também como forma de tratamento, foram utilizados procedimentos cirúrgicos radicais envolvendo a gastrectomia parcial ou total. Em 1960, como um avanço surgiu a vagotomia seletiva, acompanhada de um esquema terapêutico que utilizava a dietoterapia e atropina como agente anti-secretor (SACHS et al., 2002).

Com a descoberta da atividade estimulatória da histamina sobre a secreção ácida, alguns esforços surgiram com o objetivo de desenvolver um antagonista específico para os receptores H_2 , resultando na síntese da burinamida, o primeiro destes antagonistas (BLACK et al., 1972). Na sequência, com algumas alterações, foi desenvolvida a cimetidina, bastante utilizada atualmente (BRIMBLECOMBE et al., 1975). Com modificações da molécula da cimetidina, surgiram a ranitidina, famotidina e nizatidina, com vantagens relacionadas ao aumento de eficácia e ainda, à menor capacidade de inibição das enzimas biotransformadoras do citocromo P450, particularmente CYP3A4, quando comparados com a cimetidina. Os antagonistas dos receptores H_2 constituem ainda uma classe terapêutica de primeira linha no tratamento dos distúrbios ácido pépticos, sendo considerados como um dos maiores avanços na terapêutica desta doença, melhorando a

qualidade devida dos indivíduos afetados e praticamente abolindo os procedimentos cirúrgicos agressivos, anteriormente utilizados (SACHS et al., 2002).

A atividade da bomba protônica, H^+ , K^+ ATPase, corresponde à etapa final da liberação de ácido clorídrico. Como inibidor desta enzima, surgiu inicialmente o omeprazol, que foi posteriormente modificado na sua estrutura molecular, fornecendo outros inibidores como o pantoprazol, lansoprazol e rabeprazol. Todos estes fármacos apresentam em comum, a presença de um anel benzimidazólico e funcionam como pró fármacos, que são convertidos na forma ativa, como cátions tiofílicos, no ambiente ácido presente nos canálculos das células parietais. Estas formas ativas são capazes de efetuar uma ligação covalente com resíduos de cisteína presentes na subunidade α da H^+ , K^+ ATPase, inibindo a sua atividade e portanto, sendo capazes de inibir a secreção promovida por diferentes secretagogos. É importante ressaltar que os inibidores da bomba protônica promovem uma diminuição da secreção ácida, mais duradoura que os antagonistas de receptores (LINDBERG et al., 1986; SACHS et al., 2002; AIHARA et al., 2003).

Além dos anti-secretores, as úlceras pépticas podem ser tratadas com uma outra classe de fármacos, que apresenta uma ação mais relacionada com os fatores citoprotetores da mucosa gástrica, podendo reduzir ou não, a secreção ácida. O misoprostol, análogo sintético da prostaglandina E_1 (PGE_1), é utilizado na prevenção e tratamento das úlceras pépticas, principalmente associadas ao uso de fármacos antiinflamatórios não esteroidais, que possuem como um de seus principais efeitos colaterais, a produção de gastrites e úlceras. Estes efeitos são devidos ao próprio mecanismo de ação desta classe de antiinflamatórios, que inibem a ciclooxigenase e consequentemente, reduzem a síntese de prostaglandinas na mucosa gástrica, que atuam como citoprotetores. O misoprostol é capaz de reduzir a secreção ácida, mas esta ação não é clinicamente superior aos antagonistas de H_2 ou aos inibidores da bomba protônica. Sua atividade antiulcerogênica ocorre, principalmente, por mimetizar os efeitos citoprotetores das prostaglandinas sobre a mucosa gástrica. Devido às suas ações também sobre o tônus uterino, o misoprostol teve seu uso disseminado para a realização de abortos e por isto, tem a sua comercialização controlada. Sua indicação na terapêutica na úlcera gástrica, é centralizada principalmente nos casos decorrentes da utilização de antiinflamatórios não esteroidais (SELLERS et al., 1986; ATAY et al., 2000; CHONG et al., 2004).

Outro alvo terapêutico importante diz respeito à erradicação da bactéria *Helicobacter pylori*. Vários esquemas terapêuticos têm sido propostos. Um deles preconiza o uso de inibidor da bomba prótonica, como o omeprazol associado ao antibiótico amoxicilina. Os outros, compreendem o uso do subcitrato de bismuto, metronidazol e um antibiótico que pode ser a tetraciclina ou a amoxicilina. Esta terapia tripla, alcança uma erradicação em 60 a 80% dos casos na maioria dos estudos. Um dos problemas que justificam o insucesso terapêutico deste esquema em cerca de 20% dos casos, corresponde à resistência adquirida ao metronidazol (PAKODI et al., 2000).

Novos alvos terapêuticos têm sido enfocados, como possíveis fontes de fármacos para o tratamento das úlceras pépticas. Um deles, é relacionado à inibição dos receptores de gastrina do tipo CCK₂. Inicialmente foram desenvolvidos antagonistas não seletivos, como o proglumide, com ação em CCK₁ e CCK₂. Posteriormente, foram desenvolvidos os antagonistas seletivos para CCK₂, como L-365260, YM-022, RP-73870, S-0509, espiroglumide e itriglumide. Estas substâncias não são tão eficazes quanto os antagonistas dos receptores H₂ e além disto, foi postulado que os receptores CCK₂ são localizados na margem da úlcera, adjacente à mucosa regenerativa, mediando também a proliferação celular. O uso de antagonistas pode interferir negativamente na regeneração celular, interferindo na cura da úlcera péptica, o que pode ser considerado um fator limitante para o uso destas substâncias na terapêutica (LEHMANN et al., 2003).

Recentemente, foram descritos os receptores para a histamina do tipo H₃, mas os efeitos mediados ainda não estão bem definidos, ocorrendo diferenças significativas nos resultados obtidos em testes com diferentes espécies de animais. Um dos possíveis efeitos destes receptores, observados em experimentos realizados em ratos, seria a estimulação da secreção ácida, por eliminar a influência inibitória da somatostatina e também por aumentar a liberação de histamina. Desta forma, com objetivo de inibir a secreção ácida, poderiam ser utilizados os antagonistas dos receptores H₃, como a tioperamida. Porém, os estudos em relação à esta classe de fármacos, que interagem os receptores H₃, ainda são muito inconsistentes e não há fármacos disponíveis para terapêutica humana (VUYYURU e SCHUBERT, 1997; LEHMANN, 2003).

Vários alvos terapêuticos, mais específicos, estão sendo investigados para subsidiar o desenvolvimento de novos fármacos que atuem sobre o *Helicobacter pylori*, além de estarem também sendo avaliadas, estratégias para o desenvolvimento de vacinas que previnam a infecção causada por este microorganismo (SUTTON e DOIDGE, 2003).

4. *Objetivos*

Os objetivos deste trabalho corresponderam:

- Ao isolamento e à identificação molecular do(s) princípio(s) ativo(s) natural(is) responsável(eis) pela atividade antiulcerogênica observada para os extratos brutos e frações semipurificadas de *Artemisia annua* L. e
- À identificação do mecanismo de ação antiulcerogênica por meio de modelos experimentais em laboratório.

5. Materiais e Métodos

5.1. Obtenção do Material Vegetal

Foram utilizadas as partes aéreas da espécie vegetal *Artemisia annua* L., pertencente à família Asteraceae, que foi cultivada pela Divisão de Agrotecnologia no campo experimental do CPQBA/UNICAMP. Os exemplares foram obtidos a partir de híbridos desenvolvidos em 1991. Estes híbridos foram resultantes da clonagem de sementes chinesas e vietnamitas, denominadas SI/FI e SII/FII, fornecidas ao CPQBA pela “Mediplant (Centre de Recherches sur les Plantes Médicinales et Aromatiques)”, órgão suíço, responsável pelo trabalho de melhoramento das sementes. Após a coleta, o material vegetal foi seco à sombra e posteriormente moído em triturador de facas, produzindo-se partículas de aproximadamente 0,35 mm. A figura 2, mostra um exemplar de *Artemisia annua* L. presente no campo de cultivo experimental da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA / UNICAMP, seguida da descrição botânica da referida espécie vegetal.



FIGURA 2: Exemplar de *Artemisia annua* L., cultivada no Campo de Cultivo Experimental da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/UNICAMP

5.2. Descrição Botânica da Espécie

A *Artemisia annua* L. é uma espécie vegetal pertencente à família Asteraceae, tribo Anthemidia, sub gênero Abrotanum. É uma planta herbácea, anual, ereta, de haste cilíndrica, longitudinalmente estriada, verde pálida, com pilosidade simples, curta, unicelular e alvotranslúcida.

As folhas são simples, profundamente partidas, pinatissectas e membranáceas; as inferiores rosuladas e as superiores alternadas, de dimensões progressivamente menores à medida que se aproximam do ápice da planta. Na face superior, verde claras, pilosas e com nervura principal proeminente. Pecíolo longo, verde claro, piloso, superiormente, levemente canaliculado.

As inflorescências são apresentadas em panícula de capítulos pequenos e multiflores, distribuídos ao longo de toda a haste. O involúcro é composto de brácteas em duas séries, sendo as inferiores, maiores, todas verdes, glabras e de bordos hialinos. O receptáculo floral é convexo, com em média, cinquenta a sessenta flores pediceladas. As flores marginais femininas, são férteis, tubuloso-liguladas e numa só série, glabras e de coloração verde amarelada, com gineceu de ovário ínfero, unilocular, uniovulado e também, com estilete simples, com estigma bifido. As flores centrais hermafroditas, são tubulosas, com cinco lobos triangulados, amarelas e glabras, com gineceu de ovário ínfero, unilocular, uniovulado, estilete simples, com estigma bifido, deflexo fimbriado e também, androceu formado por cinco estames sinanteros, inseridos no fundo da corola, com anteras brancacentas, glabras e apiculadas. Fruto do tipo aquênio, acastanhado quando da maturação. Reproduz-se exclusivamente por sementes (JAHN, 1988).

5.3. Fitoquímica

5.3.1. Obtenção dos extratos brutos

As partes aéreas de *Artemisia annua* L., secas e moídas, foram submetidas à maceração dinâmica por três períodos de quatro horas, com etanol a 70%, na proporção de um grama de droga para 4 mL de solvente, em reator, com pressão e temperatura controlados. Ao final de cada um dos períodos de quatro horas, foi realizada uma filtração em papel, sendo que após o terceiro período, o resíduo do material vegetal foi descartado e o filtrado resultante foi submetido à evaporação a vácuo, sob temperatura de 40° C, resultando no extrato bruto hidroetanólico.

5.3.2. Obtenção da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}) a partir do extrato bruto hidroetanólico

O filtrado resultante da maceração das partes aéreas com etanol a 70%, foi concentrado até aproximadamente um quinto do volume inicial. Posteriormente, foi adicionado o mesmo volume de solução de acetato de chumbo a 10% (LONERGAN et al., 1992). Após um período de 12 horas em geladeira, sob temperatura de 5° C, foi realizada uma filtração. O precipitado foi descartado e o filtrado foi extraído por três vezes sucessivas com igual volume de diclorometano. Após a separação das fases, a fração diclorometânica foi evaporada a vácuo, sob temperatura de 40° C, fornecendo uma fração semipurificada, enriquecida em lactonas sesquiterpênicas, denominada fração lactonas ou F_{LAC}.

5.3.3. Purificação da fração lactonas (F_{LAC})

A fração lactonas (F_{LAC}) foi submetida a um processo de purificação em coluna cromatográfica filtrante, com a utilização de silicagel 60 (Merck 0,063 – 0,200 mm), como fase estacionária. Esta coluna foi eluída com gradientes crescentes de hexano / acetato de etila. A massa da fase estacionária foi três vezes superior à massa de amostra e

o volume da fase móvel foi equivalente ao triplo do volume ocupado pela silicagel. As frações coletadas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e reunidas em quatro frações denominadas F1A_{LAC}, F1B_{LAC}, F1C_{LAC} e F1D_{LAC}, de acordo com seus perfis cromatográficos.

5.3.4. Isolamento da dihidro-epideoxiarteanuína b, a partir da fração F1C_{LAC}

A fração F1C_{LAC} foi purificada por meio de sucessivas colunas cromatográficas clássicas, utilizando a silicagel 60 (Merck 0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária e gradientes crescentes de hexano / acetato de etila como fase móvel. A massa da fase estacionária foi equivalente a 30 vezes a massa da amostra ou quando houve a necessidade de uma purificação mais refinada, a 100 vezes a massa da amostra. O volume da fase móvel foi equivalente ao volume ocupado pela silicagel na coluna.

As colunas foram eluídas, tendo várias subfrações coletadas, que foram sendo reunidas, de acordo com seus perfis cromatográficos em camada delgada, de forma a obter frações cada vez mais enriquecidas em dihidro-epideoxiarteanuína b.

Estes procedimentos foram repetidos até que ocorresse a obtenção da dihidro-epideoxiarteanuína b pura, em quantidade suficiente para a realização dos experimentos farmacológicos.

5.3.5. Isolamento da deoxiartemisinina a partir da fração F1D_{LAC}

A fração F1D_{LAC} foi submetida a sucessivos fracionamentos por cromatografia em coluna clássica utilizando silicagel 60 (Merck 0,063 – 0,200 mm), como fase estacionária e gradientes crescentes de hexano / acetato de etila como fase móvel. Com a eluição da coluna, várias subfrações foram coletadas e tiveram seus perfis acompanhados por cromatografia em camada delgada.

Desta forma, por meio da reunião de subfrações, foram obtidas frações enriquecidas em deoxiartemisinina, conjuntamente com a artemisinina

Estas frações, obtidas a partir das colunas cromatográficas clássicas, quando submetidas à eliminação de solvente presente, por meio de aquecimento brando e vácuo no

evaporador rotativo, apresentaram a cristalização da deoxiartemisinina e da artemisinina, simultaneamente.

A partir de então, os cristais obtidos foram tratados com hexano, para remover deles, as impurezas ou compostos sem interesse presentes

Para proceder a separação da deoxiartemisinina e da artemisinina, e isolar a deoxiartemisinina, foi realizada uma purificação por coluna cromatográfica seca, utilizando membranas de celulose como suporte, que foram preenchidas com silicagel 60 (Merck 0,063 – 0,200 mm), como fase estacionária e eluídas com diclorometano / metanol a 1%.

5.3.6. Análise cromatográfica

5.3.6.1. Cromatografia em camada delgada

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em silicagel G e PF₂₅₄ (Merck), na proporção 1:1, sobre suporte de vidro com espessura de 0,25 cm ou em cromatofolhas prontas (Merck artigo 5554). A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada UV a 254 nm, com posterior pulverização com solução ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5) seguida de aquecimento. A fase móvel utilizada foi diclorometano / metanol a 1%.

5.3.6.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

As frações e substâncias puras foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detetor de massas (CG Hewlett Packard 5890, série II, diretamente acoplado a um detetor seletivo de massa Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30 m x 0,25 mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições de análise para lactonas sesquiterpênicas foram: temperatura de injeção: 250°C; temperatura do detetor: 300°C; programa de temperatura: 40(2 min)-240°C, 2°C/min, 240-300°C, 10°C/min; com ou sem razão de split 1:100

(dependendo da concentração da amostra); gás de arraste He 0,7 bar, 1mL/min; volume da amostra 1-2 μ L.

EM (70ev) m/z (%) dihidro-epideoxiarteauína b: 234(M^+ , 12), 219(10), 190(77), 175(22), 161(100)

EM (70ev) m/z (%) deoxiartemisina: 266(M^+ , 7), 165(35)

5.3.7. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram registrados em espectrômetro INOVA 500 (MHz) com a utilização de clorofórmio deuterado como solvente e tendo como referência interna, o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J), em hertz (Hz).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 foram registrados em espectrômetro INOVA (125,7 MHz) com a utilização de clorofórmio deuterado como solvente e tendo como referência interna, o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J), em hertz (H).

Dihidro-epideoxiarteauína b 3: RMN 1H (500MHz, $CDCl_3$) δ 5,66(s, H_5), 3,16(m, H_{11}), 1,76(s, $3H_{15}$), 1,15(d, $J=0,74Hz$, H_{13}), 0,92(d, $J=0,74Hz$, H_{14}); RMN ^{13}C (125,7MHz, $CDCl_3$) δ 179,6(C_{12}), 142,5(C_4), 121,8(C_5), 83,5(C_6), 46,6(CH), 42,9(CH), 39,7(CH), 32,5(CH), 30,9(CH_2), 23,8(CH_2), 23,5(C_{15}), 19,6(C_{14}), 9,5(C_{13})

Deoxiartemisina: RMN 1H (500MHz, $CDCl_3$) δ 5,70(s, H_5), 3,21(m, H_{11}), 1,53(s, $3H_{15}$), 1,15(d, $J=0,74Hz$, H_{13})

5.4. Testes de atividade farmacológica

5.4.1. Animais

Para a realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal entre 250 e 350 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. Estes animais foram utilizados nos experimentos, após um período mínimo de

sete dias de adaptação em biotério, com ciclo de claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 20°C.

5.4.2 Úlcera induzida por indometacina

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 g. Após um período de 24 horas em jejum, com acesso livre à água, cada grupo de animais recebeu por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina (10 mL/kg) como controle negativo, cimetidina (100 mg/kg), como controle positivo e a amostra a ser testada em dose previamente determinada. Após 30 minutos, foi feita a administração subcutânea de indometacina na dose de 30 mg/kg, segundo a metodologia modificada de MORIMOTO et al., 1991. Decorridas quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9% para contagem e avaliação das lesões produzidas. O índice de lesões ulcerativas foi calculado por meio da somatória dos parâmetros abaixo, de acordo com o esquema descrito por GAMBERINI et al., 1991.

Perda de pregas da mucosa	1 ponto	
Descoloração da mucosa	1 ponto	
Edema	1 ponto	
Hemorragias	1 ponto	
Petéquias	Até 10 petéquias	02 pontos
	Mais de 10 petéquias	03 pontos
Úlceras até 1 mm	* n x 2 pontos	
Úlceras maiores que 1 mm	* n x 3 pontos	
Úlceras perfuradas	* n x 4 pontos	

* onde n refere-se ao número de lesões observadas.

Para a determinação da porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{média}_{\text{controle}} - \text{média}_{\text{tratado}}}{\text{média}_{\text{controle}}} \times 100$$

5.4.3. Úlcera induzida por etanol

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g. Após um período de 24 horas em jejum, com acesso livre à água, cada grupo de animais recebeu por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina (10 mL/kg) como controle negativo, carbenoxolona (200 mg/kg), como controle positivo e a amostra a ser testada em dose previamente determinada. Após 30 minutos, foi feita a administração oral de 1 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por ROBERT, 1979. Os animais foram sacrificados uma hora depois, por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9% para posterior contagem e avaliação das lesões ulcerativas. O índice de lesões ulcerativas foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema descrito por GAMBERINI et al., 1991.

5.4.4. Úlcera induzida por etanol absoluto em ratos previamente tratados com indometacina

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água. Após 30 minutos da administração intraperitoneal de indometacina (5 mg/kg), cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento, ou seja, solução salina 0,9% (10 mL/kg) e a amostra a ser testada, em dose previamente determinada. Após 30 minutos, cada animal recebeu por via oral, 1 mL de etanol absoluto (KONTUREK et al., 1995). Ao final de uma hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9%, para posterior contagem e avaliação das lesões produzidas. O índice de lesões ulcerativas foi calculado através da metodologia descrita por GAMBERINI et al., 1991.

5.4.5. Determinação quantitativa do muco gastroprotetor

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal entre 200 e 250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água. Estes animais foram divididos em grupos, de acordo com o respectivo tratamento, ou seja, solução salina 0,9% (10 mL/kg), carbenoxolona (200 mg/kg), como controle positivo e amostra a ser testada em dose previamente determinada.

Após 30 minutos do tratamento oral, os animais foram submetidos ao processo de indução de úlcera gástrica por administração de etanol absoluto (ROBERT, 1979).

Ao término de uma hora, os animais foram sacrificados e tiveram o estômago retirado e aberto ao longo da maior curvatura, tendo a região fúndica retirada e descartada.

A porção glandular resultante foi pesada e mergulhada em 10 mL de solução de Alcian Blue 0,1% por um período de 2 horas.

Após este período, os estômagos foram submetidos à lavagem com 10 mL de solução de sacarose 0,25 M por 2 vezes, sendo a primeira por 15 e a segunda, por 45 minutos.

Em seguida, os estômagos foram transferidos para tubos contendo 10 mL de solução de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 0,5 M por duas horas para a extração do corante complexado com o muco gástrico.

Com a solução obtida foi feita uma emulsão com 10 mL de éter etílico. Esta emulsão foi centrifugada por 15 minutos a 3600 rpm, sendo a fase etérea desprezada e a fase aquosa, submetida à leitura espectrofotométrica em 598 nm, conforme metodologia modificada de CORNE et al., 1974. Os dados obtidos foram extrapolados em uma curva padrão de Alcian Blue, contendo 5 concentrações conhecidas do corante (6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100 $\mu g/mL$).

5.4.6. Ligadura do piloro

Este experimento foi realizado segundo a metodologia de SHAY et al., 1945. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal entre 200 e 250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com acesso livre à água.

Os animais foram anestesiados e após tricotomia e incisão da parede abdominal, foi realizada a ligadura do piloro com linha cirúrgica de algodão. Em seguida da ligadura, cada grupo de animais recebeu por via intraduodenal, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina 0,9% (2 mL/kg), como controle negativo, cimetidina (100 mg/kg), como controle positivo e as amostras a serem testadas em doses previamente determinadas. O abdômen foi então suturado e após quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o abdômen foi reaberto para a retirada do estômago. Foi determinado o volume do conteúdo estomacal (mL) e a sua concentração hidrogeniônica (mEq / L / 4 h), por meio de titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M.

5.4.7. Determinação da atividade péptica

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal entre 200 e 250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água. Estes animais foram inicialmente submetidos ao modelo de ligadura do piloro (SHAY et al., 1945), para que fosse recolhido o suco gástrico, que constitui o material de análise para a medida da atividade péptica, segundo a metodologia modificada de ANSON, 1938.

O suco gástrico, recolhido após o sacrifício dos animais, em alíquotas de 0,2 mL, foi incubado com 1 mL de solução de albumina bovina fração V (Sigma®) na concentração de 5 mg/mL, em ácido clorídrico 0,06 M, por 10 minutos, a 37° C. Esta reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético a 10%, sendo então procedida a centrifugação a 1500 g por 20 minutos. Alíquotas de 1 mL do sobrenadante obtido a partir deste processo, foram alcalinizadas com 5 mL de solução de bicarbonato de sódio a 0,55 M. Na sequência, foram adicionados 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em cada um dos tubos, que foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foi determinada a absorbância de cada uma das amostras por leitura espectrofotométrica a 660 nm. Os resultados obtidos foram interpolados numa curva padrão determinada anteriormente, contendo cinco concentrações conhecidas de tirosina (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg / mL) e posteriormente, expressos como média ± erro padrão da média da quantidade de tirosina detectada.

5.4.8. Medida da agregação plaquetária

A primeira etapa para a realização deste experimento, foi a coleta de sangue humano, por punção venosa, de quatro voluntários sadios, sem a utilização de qualquer tipo de medicamento nos últimos dez dias. Este sangue foi coletado em tubos de vidro siliconizados, contendo tricitrato de sódio, como agente anticoagulante.

Após a centrifugação do sangue total, a 600 g por 7 minutos, foi obtido na parte superior dos tubos, o plasma enriquecido em plaquetas (PRP), que foi coletado e separado. O restante do material presente nos tubos foi novamente centrifugado a 2000 g por 10 minutos, para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

Para a realização dos experimentos, foi utilizado o PRP, com contagem de plaquetas, determinada em câmara de Neubauer, equivalente a $250000/\text{mm}^3$, ajustada, se necessário, com a adição do PPP.

O monitoramento da agregação plaquetária foi feito fotometricamente (PRADO-FRANCESCHI, J., e ANTUNES, E., 1989), frente à indução por ADP (difosfato de adenosina), em aparelho do tipo agregômetro da marca CHRONO LOG modelo 560-Ca, Havertown, PA, EUA).

Os tubos receberam 400 μL de PRP, já com a contagem de plaquetas ajustada, aos quais foram adicionados 10 μL de ADP (difosfato de adenosina) em concentração determinada por meio da realização de uma curva, na qual foram utilizadas as concentrações de 2, 3, 4 e 10 μM de ADP.

Em seguida foram adicionados 10 μL ou 20 μL das amostras a serem avaliadas, sendo que a amplitude de agregação plaquetária foi determinada, cinco minutos após a adição das amostras.

Numa outra sequência experimental, antes da aplicação das amostras, foram adicionados 10 μL de indometacina a 30 μM e logo a seguir, mais 10 μL das amostras a serem avaliadas. A amplitude de agregação também foi determinada, cinco minutos após a adição das amostras.

5.4.9. Determinação quantitativa do conteúdo de prostaglandina do tipo E₂ (PGE₂) na mucosa gástrica de ratos

5.4.9.1. Manipulação dos animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 g. Após um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água, estes animais foram divididos em grupos, sendo que cada um deles recebeu, inicialmente, o tratamento correspondente por via subcutânea, ou seja, solução salina (0,9%; 2,5 mL/kg) ou indometacina (30 mg/kg; 2,5 mL/kg).

Após uma latência de uma hora, cada grupo de animais recebeu um segundo tratamento, por via oral, com os controles negativo (solução salina 0,9%, 10 mL/Kg) e positivo (carbenoxolona 200 mg/kg) e as amostras a serem avaliadas neste modelo, em doses previamente estabelecidas. Após mais um período de uma hora, foi realizado o sacrifício dos animais por deslocamento cervical.

5.4.9.2. Manipulação dos estômagos e obtenção das amostras para análise

De acordo com a metodologia modificada de GUARALDO (2002), após o sacrifício, foi realizada a retirada imediata dos estômagos dos animais, que foram lavados em solução salina 0,9%. A porção fúndica foi removida e a porção glandular inteira, que constituiu o material de análise neste modelo, foi pesada e cortada em minúsculos fragmentos com o auxílio de tesoura e bisturi. Estes fragmentos foram imediatamente colocados em tubos de polipropileno contendo 6 mL de etanol gelado, mantido em congelador, contendo indometacina a 100 µM, substância utilizada para bloquear neste momento, a síntese de prostaglandinas. Os tubos foram agitados vigorosamente por cerca de um minuto e posteriormente, foram centrifugados a 2500 rpm por cinco minutos.

Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um outro tubo de polipropileno contendo 10 µL de ácido acético glacial. Estes tubos foram novamente centrifugados por três minutos a 2500 rpm e o sobrenadante obtido, foi utilizado como amostra contendo a prostaglandina E₂ (PGE₂) a ser quantificada após a purificação.

5.4.9.3. Purificação das amostras

Foram utilizadas para a purificação de cada uma das amostras obtidas na etapa anterior, uma minicoluna cromatográfica C18 AMPREP Amersham Pharmacia Biotech. Estas minicolunas foram inicialmente tratadas com 2 mL (volume de coluna = 1 mL) de etanol a 10%. Sequencialmente, 0,8 mL do sobrenadante obtido a partir dos tubos centrifugados na etapa anterior foram aplicados sobre as colunas, sempre com auxílio de um dispositivo que permite o encaixe de uma seringa, para que seja exercida pressão durante a aplicação das amostras. Após este procedimento, foi realizada a lavagem das minicolunas com 1 mL de água destilada e posteriormente, com 1 mL de hexano, tendo sido descartados estes solventes. A seguir, foi feita a eluição das minicolunas, para a obtenção da PGE₂, a ser quantificada, com dois volumes de 0,75 mL de acetato de etila, que foram coletados em novos tubos de polipropileno.

As amostras obtidas na etapa anterior, em acetato de etila, foram evaporadas até a secura em concentrador específico, a vácuo, sob uma temperatura de 30° C.

5.4.9.3. Ensaio imunoenzimático

Após a secura, o material presente nos tubos (PGE₂), foi ressuspendido no tampão do ensaio já diluído, fornecido pelo *kit* Amersham Pharmacia Biotech (RPN 222).

Este material ressuspendido no tampão foi utilizado na execução do ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as normas gerais do protocolo nº 1 do referido *kit* (Amersham Pharmacia Biotech RPN 222), utilizadas na determinação de prostaglandina E₂ a partir de tecidos.

5.5. Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico, $p < 0,05$ para que fosse considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguida do Teste de Duncan, considerando-se o mesmo nível crítico.

6. Resultados

6.1. Avaliação Farmacológica

6.1.1. Úlcera induzida por etanol absoluto em ratos

6.1.1.1. Frações F1A_{LAC}, F1B_{LAC}, F1C_{LAC}, e F1D_{LAC}, obtidas da purificação da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC})

Em trabalhos anteriores, foi avaliada a atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroetanólico obtido das partes aéreas de *Artemisia annua* L., administrado por via oral na dose de 500 mg/kg, no modelo de úlcera induzida por indometacina. Nestas condições, este extrato inibiu em 53,8%, o índice de lesões ulcerativas. A partir dele, foi obtida uma fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}), que também foi administrada por via oral nos modelos de úlcera induzida por indometacina e estresse em ratos, sendo capaz de inibir o índice de lesões ulcerativas em 86,1% e 29,4%, respectivamente. A fração F_{LAC} também foi administrada por via subcutânea, em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos, inibindo o índice de lesões ulcerativas em 59,8% (DIAS, 1997). A partir da fração (F_{LAC}), este trabalho teve prosseguimento, sendo procedido o trabalho fitoquímico para a

sua purificação, sendo obtidas quatro frações, denominadas F1A_{LAC}, F1B_{LAC}, F1C_{LAC}, e F1D_{LAC}, que administradas por via oral na dose de 100 mg/kg, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos, apresentaram 84,7, 91,7, 40,1 e 94,5% de inibição do índice de lesões ulcerativas, respectivamente. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 1 e no gráfico 1, como média $\pm$ erro padrão da média (epm) do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

TABELA 1: Efeito da administração oral da carbenoxolona e das frações F1A_{LAC}, F1B_{LAC}, F1C_{LAC} e F1D_{LAC}, obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}), no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média $\pm$ epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		6	32,7 $\pm$ 7,1	
Carbenoxolona	200	5	5,6 $\pm$ 2,1 **	82,9
F1A _{LAC}	100	3	5,0 $\pm$ 3,1 **	84,7
F1B _{LAC}	100	5	2,0 $\pm$ 0,6 **	91,7
F1C _{LAC}	100	5	19,6 $\pm$ 9,6 *	40,1
F1D _{LAC}	100	5	1,8 $\pm$ 0,5 **	94,5

ANOVA $F_{(5,23)} = 8,33$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

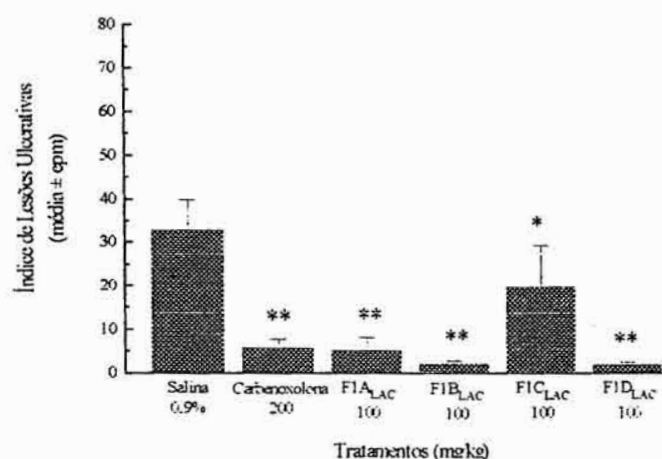


GRÁFICO 1: Efeito da administração oral da carbenoxolona e das frações F1A_{LAC}, F1B_{LAC}, F1C_{LAC} e F1D_{LAC}, obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}), no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos (ANOVA $F_{(5,23)} = 8,33$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$)

6.1.1.2. Dihidro-epideoxiarteauína b

A dihidro-epideoxiarteauína b, obtida a partir do processos de purificação da fração F1C_{LAC}, foi administrada por via oral em cinco doses diferentes (10, 25, 50, 125 e 250 mg/kg), para a determinação da curva dose-resposta, tendo sido observados valores de inibição do índice de lesões ulcerativas equivalentes a 34,4, 27,9, 88,7, 93,1 e 98,4%, respectivamente e ainda, um valor de dose efetiva 50% (DE₅₀), calculado por regressão linear, equivalente a 55,6 mg/kg. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 2 e no gráfico 2, como média $\pm$ erro padrão da média (epm) do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

TABELA 2: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da dihidro-epideoxiarteauína b em cinco doses diferentes, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média $\pm$ epm)	Inibição do ILU (%)
Salina 0,9%		10	49,4 $\pm$ 4,9	
Carbenoxolona	200	5	11,4 $\pm$ 4,7 **	76,9
Dihidro-epideoxiarteauína b	10	5	32,4 $\pm$ 3,8 *	34,4
Dihidro-epideoxiarteauína b	25	5	35,6 $\pm$ 4,9 **	27,9
Dihidro-epideoxiarteauína b	50	5	5,6 $\pm$ 2,6 **	88,7
Dihidro-epideoxiarteauína b	125	5	3,4 $\pm$ 0,7 **	93,1
Dihidro-epideoxiarteauína b	250	5	0,8 $\pm$ 0,5 **	98,4

ANOVA $F_{(6,33)} = 23,29$ $p < 0.001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

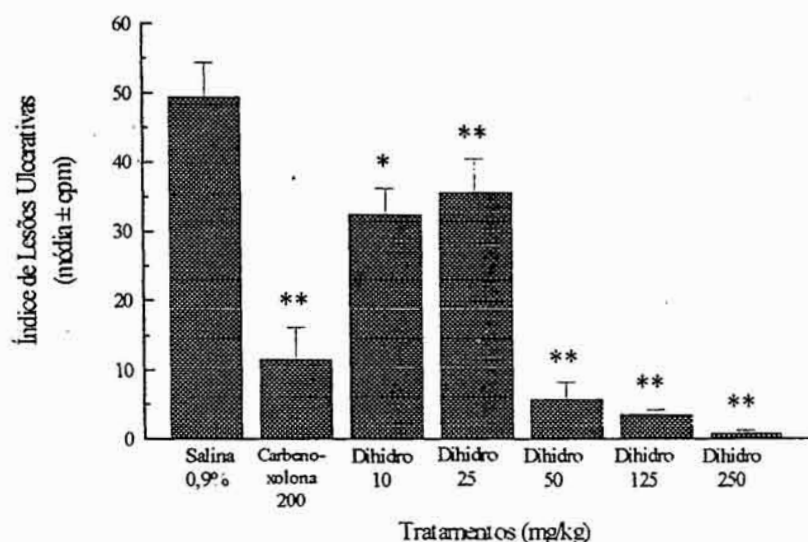


GRÁFICO 2: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da dihidro-epideoxiarteanaína b em cinco doses diferentes, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos (ANOVA $F_{(6,33)} = 23,29$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$)

6.1.1.3. Deoxiartemisinina

A deoxiartemisinina, obtida a partir da purificação da F1D_{LAC}, foi administrada por via oral em três doses (50, 100 e 200 mg/kg), para a determinação da curva dose-resposta, tendo reduzido o índice de lesões ulcerativas em 74,0, 49,7 e 76,5%, respectivamente e ainda, apresentado um valor de dose efetiva 50% (DE₅₀), calculado por regressão linear, equivalente a 88,7 mg/kg. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 3 e no gráfico 3, como média ± erro padrão da média (epm) do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

TABELA 3: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da deoxiartemisinina em três doses diferentes, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Salina 0,9%		6	59,7 ± 7,7	
Carbenoxolona	200	5	4,6 ± 1,2 **	92,3
Deoxiartemisinina	50	4	15,5 ± 2,8 **	74,0
Deoxiartemisinina	100	5	30,0 ± 8,3 *	49,7
Deoxiartemisinina	200	5	14,0 ± 4,3 **	76,5

ANOVA $F_{(4,20)} = 14,11$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

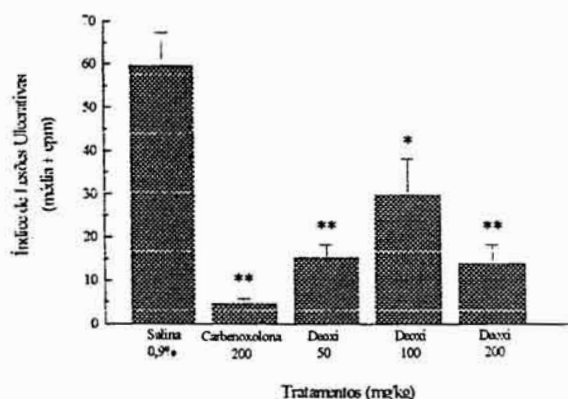


GRÁFICO 3: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da deoxiartemisinina em três doses diferentes, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos (ANOVA $F_{(4,20)} = 14,11$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$)

6.1.1.4. Fração AB_{LAC} e deoxiartemisinina

As frações A e B, obtidas da purificação cromatográfica da F_{LAC}, foram reunidas numa única fração denominada FAB_{LAC} e juntamente com a deoxiartemisinina, foram administradas por via intraperitoneal no modelo de úlcera induzida por etanol, apresentando inibições do índice de lesões ulcerativas, de 47,5 e 40,3%, respectivamente. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 4 e no gráfico 4, como média ± erro padrão da média (epm) do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

TABELA 4: Efeito da administração intraperitoneal da Fração FAB_{LAC}, obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}) e da deoxiartemisinina, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos

Tratamento	Dose (mg/kg)	N	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		4	53,3 ± 5,6	
FAB _{LAC}	100	5	28,0 ± 5,8 *	47,5
Deoxiartemisinina	100	4	31,8 ± 8,7 *	40,3

ANOVA $F_{(2,10)} = 4,03$ $p < 0,05$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$

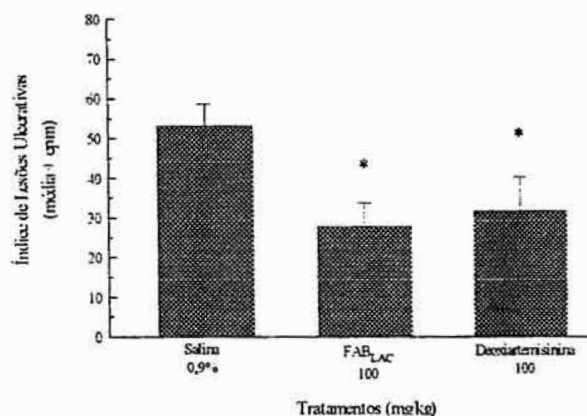


GRÁFICO 4: Efeito da administração intraperitoneal da Fração FAB_{LAC}, obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas (F_{LAC}) e da deoxiartemisinina, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos (ANOVA $F_{(2,10)} = 4,03$ $p < 0,05$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$)

6.1.1.5. Fracionamento da fração FAB_{LAC}

A fração FAB_{LAC}, formada pela junção das frações A e B, mencionada anteriormente, foi fracionada em coluna cromatográfica seca, fornecendo quatro frações denominadas F1A_{AB}, F1B_{AB}, F1C_{AB} e F1D_{AB}, que foram administradas pela via intraperitoneal em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos. Nestas condições experimentais, somente F1A_{AB} não apresentou atividade antiulcerogênica. As demais, F1B_{AB}, F1C_{AB} e F1D_{AB} reduziram o índice de lesões ulcerativas em 79,4, 86,6 e 72,1, respectivamente. Os resultados obtidos estão representados na tabela 5 e no gráfico 5,

como média $\pm$ erro padrão da média (epm), do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

TABELA 5: Efeito da administração intraperitoneal das frações F1A_{AB}, F1B_{AB}, F1C_{AB} e F1D_{AB}, obtidas a partir da purificação da Fração FAB_{LAC}, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média $\pm$ epm)	Inibição do ILU (%)
Salina 0,9%		5	49,4 $\pm$ 9,0	
F1A _{AB}	100	5	35,0 $\pm$ 5,0	29,1
F1B _{AB}	100	5	6,6 $\pm$ 3,1 *	79,4
F1C _{AB}	100	5	10,2 $\pm$ 3,6 *	86,6
F1D _{AB}	100	5	13,8 $\pm$ 5,8 *	72,1

ANOVA $F_{(4,20)} = 10,46$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$

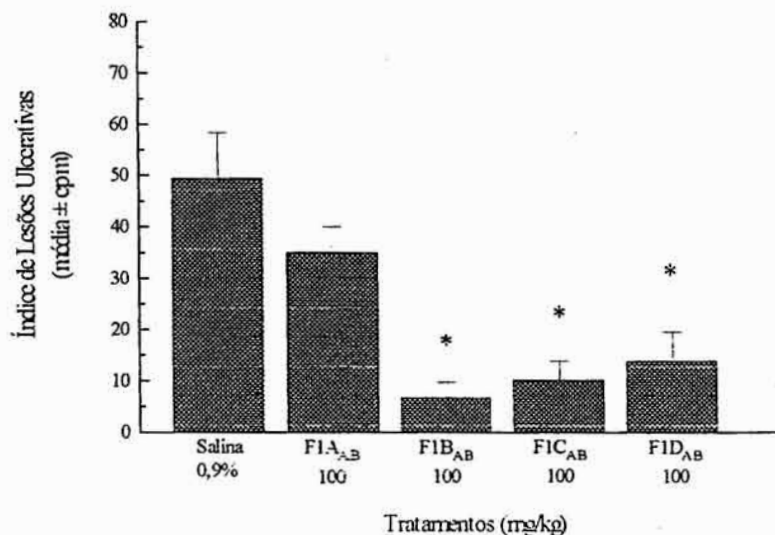


GRÁFICO 5: Efeito da administração intraperitoneal das frações F1A_{AB}, F1B_{AB}, F1C_{AB} e F1D_{AB}, obtidas a partir da purificação da Fração FAB_{LAC}, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos (ANOVA $F_{(4,20)} = 10,46$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$)

6.1.2. Úlcera induzida por indometacina

6.1.2.1. Dihidro-epideoxiarteauína b

A dihidro-epideoxiarteauína b, quando administrada por via oral na dose de 200 mg/kg, reduziu o índice de lesões ulcerativas em 62,7%, no modelo de úlcera induzida por indometacina. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 6 e no gráfico 6, como média $\pm$ erro padrão da média (epm) do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

TABELA 6: Efeito da administração oral da cimetidina e da dihidro-epideoxiarteauína b, no modelo de úlcera induzida por indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média $\pm$ epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		6	38,3 $\pm$ 6,2	
Cimetidina	100	4	3,0 $\pm$ 0,6 *	92,2
Dihidro-epideoxiarteauína b	200	6	14,3 $\pm$ 3,1 *	62,7

ANOVA $F_{(2,13)} = 15,04$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$

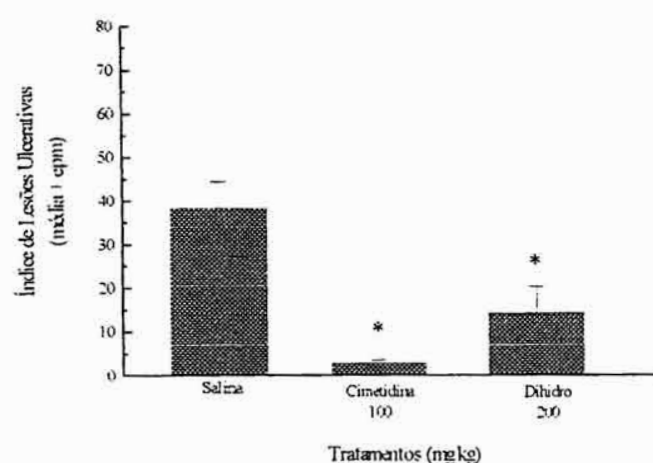


GRÁFICO 6: Efeito da administração oral da cimetidina e da dihidro-epideoxiarteauína b, no modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA $F_{(2,13)} = 15,04$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$)

6.1.3. Úlcera induzida por etanol em ratos previamente tratados com indometacina

6.1.3.1. Dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina

A dihidro-epideoxiarteauína b (50 mg/kg) e a deoxiartemisinina (100 mg/kg) foram administradas por via oral em animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, porém que haviam recebido um pré tratamento com indometacina. Nestas condições experimentais, as referidas substâncias não mais apresentaram a atividade antiulcerogênica anteriormente observada. Os resultados obtidos estão representados na tabela 7 e no gráfico 7, como média $\pm$ erro padrão da média (epm), do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

TABELA 7: Efeito da administração oral da carbenoxolona, da dihidro-epideoxiarteauína b e da deoxiartemisinina no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos previamente tratados com indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média $\pm$ epm)	Variação do ILU (%)
Salina 0,9%		5	43,6 $\pm$ 5,6	
Salina 0,9% + indometacina		5	69,6 $\pm$ 3,0 *	59,6
Carbenoxolona	200	3	7,0 $\pm$ 3,1 **	83,9
Dihidro-epideoxiarteauína b	50	5	52,2 $\pm$ 5,8	19,7
+ indometacina				
Deoxiartemisinina + indometacina	100	5	49,8 $\pm$ 6,0	14,2

ANOVA $F_{(4,18)} = 15,04$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

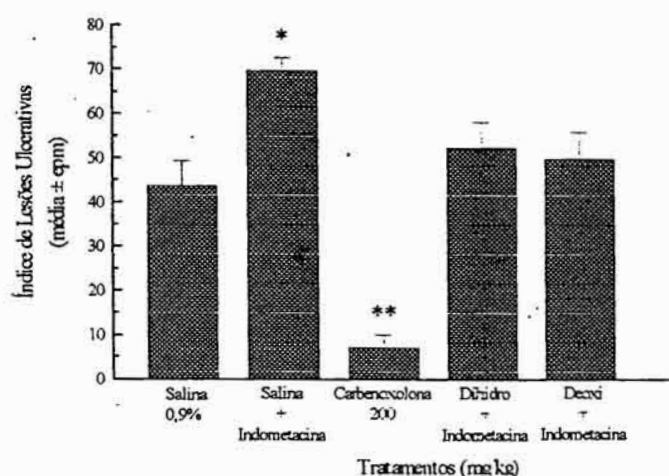


GRÁFICO 7: Efeito da administração oral da carbenoxolona, da dihidro-epideoxiarteauína b e da deoxiartemisinina no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos previamente tratados com indometacina (ANOVA $F_{(4,18)} = 15,04$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$)

6.1.4. Dosagem de muco protetor aderido à mucosa gástrica de ratos

6.1.4.1. Dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina

A quantidade de muco gastroprotetor aderido à mucosa gástrica foi determinada em animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, previamente tratados pela via oral com a dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina, que apresentaram um aumento na produção de muco de 23,2 e 34,9%, respectivamente, sendo que a carbenoxolona, a substância padrão utilizada neste experimento produziu um aumento de 55%. Os dados obtidos estão expressos na tabela 8 e no gráfico 8, como média $\pm$ erro padrão da média (epm), da quantidade de muco, expressa em μg de Alcian Blue / g tecido gástrico, para cada grupo de tratamento.

TABELA 8: Efeito da administração oral da carbenoxolona, da dihidro-epideoxiarteanaína b e da deoxiartemisinina sobre a produção de muco protetor aderido à mucosa gástrica, em animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	Quantidade de muco (µg Alcian Blue / g tecido)	Aumento do muco (%)
Controle		6	72,3 ± 3,0	---
Carbenoxolona	200	6	112,1 ± 5,7	55,0
Dihidro-epideoxiarteanaína b	50	6	89,1 ± 3,4	23,2
Deoxiartemisinina	100	6	97,5 ± 4,9	34,9

ANOVA $F_{(3,20)} = 14,15$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

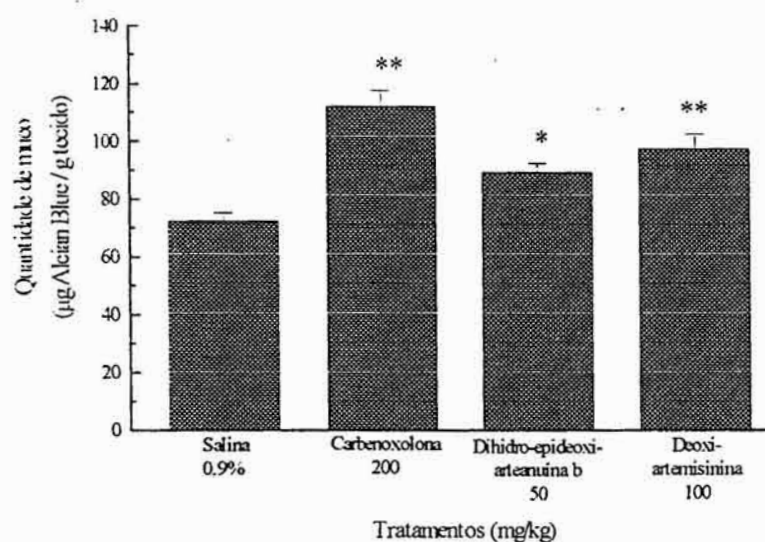


GRÁFICO 8: Efeito da administração oral da carbenoxolona, da dihidro-epideoxiarteanaína b e da deoxiartemisinina sobre a produção de muco protetor aderido à mucosa gástrica, em animais submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol absoluto (ANOVA $F_{(3,20)} = 14,15$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$)

6.1.4.2. Fração FAB_{LAC}

Em outro experimento, a fração FAB_{LAC} foi administrada também por via oral, na dose de 200 mg/Kg, porém sem nenhum indutor de ulceração, sendo avaliada a produção basal de muco aderido à mucosa gástrica. Foi observado um aumento de 80%, da quantidade de muco. Os dados obtidos estão expressos na tabela 9 e no gráfico 9, como média $\pm$ erro padrão da média (epm), da quantidade de muco, expressa em μ g de Alcian Blue / g tecido gástrico, para cada grupo de tratamento.

TABELA 9: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da fração FAB_{LAC} sobre a produção basal de muco protetor aderido à mucosa gástrica em ratos

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	Quantidade de muco (μ g Alcian Blue / g tecido)	Aumento do muco (%)
Controle		5	52,6 $\pm$ 3,5	---
Carbenoxolona	200	5	109,7 $\pm$ 13,3 **	108,8
FAB _{LAC}	200	5	94,6 $\pm$ 4,3 *	80,0

ANOVA $F_{(2,12)} = 12,67$ $p < 0,01$. Teste de Duncan * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$

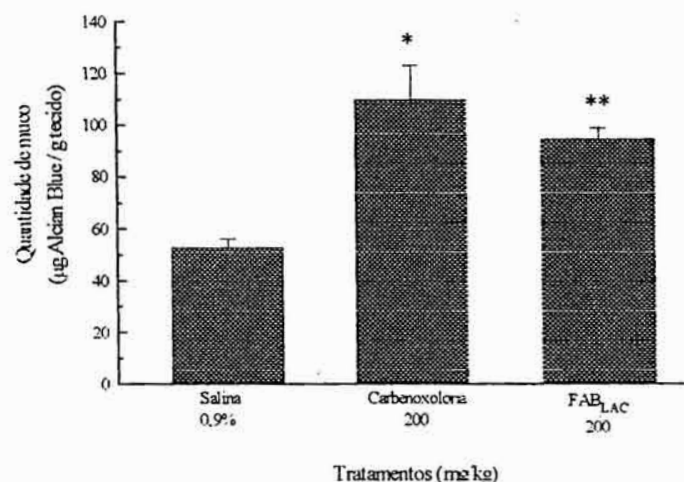


GRÁFICO 9: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da fração FAB_{LAC} sobre a produção basal de muco protetor aderido à mucosa gástrica em ratos (ANOVA $F_{(2,12)} = 12,67$ $p < 0,01$. Teste de Duncan * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$)

6.1.5. Ligadura do piloro: determinação do volume, concentração hidrogeniônica e atividade péptica do suco gástrico

6.1.5.1. Dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina

A administração intraduodenal da dihidro-epideoxiarteauína b (50 mg/kg) e da deoxiartemisinina (100 mg/kg) em ratos, com ligadura pilórica não reduziu o volume de secreção gástrica. Na avaliação da concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico coletado, foi observada uma redução, de 45,9%, somente no grupo de animais tratados com a deoxiartemisinina. Na determinação da atividade péptica do conteúdo gástrico, foi observado um aumento da concentração de tirosina detectada, equivalente a 80,8 e 40,7% nos grupos de animais tratados com a dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina, respectivamente. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 10, como média $\pm$ erro padrão da média (epm) do volume (mL), da concentração hidrogeniônica (mEq/L/4 h) e da atividade péptica (μ g tirosina / mL), para cada um dos grupos de tratamento e no gráfico 10, como porcentagem de variação dos parâmetros analisados em relação ao grupo controle negativo.

TABELA 10: Efeito da administração intraduodenal da cimetidina, da dihidro-epideoxiarteauína b e da deoxiartemisinina sobre o volume, a concentração hidrogeniônica e atividade péptica do conteúdo gástrico no modelo de ligadura do piloro

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	Volume de secreção (mL)	H ⁺ (mEq/L/4h)	Atividade péptica μ g tirosina / mL
Salina		4	3,2 $\pm$ 1,6	113,2 $\pm$ 9,6	58,3 $\pm$ 11,0
Cimetidina	100	5	1,4 $\pm$ 0,3	32,0 $\pm$ 7,2 **	22,3 $\pm$ 2,6 **
Dihidro-epideoxiarteauína b	50	5	1,7 $\pm$ 0,8	87,2 $\pm$ 19,2	105,4 $\pm$ 6,2 ***
Deoxiartemisinina	100	5	1,8 $\pm$ 0,7	61,2 $\pm$ 5,2 *	82,0 $\pm$ 4,0 *

Volume: ANOVA $F_{(3,15)} = 0,70$ $p > 0,05$.

H⁺ ANOVA $F_{(3,15)} = 8,20$ $p < 0,01$. Teste de Duncan * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Atividade péptica: ANOVA $F_{(3,15)} = 31,45$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

*** $p < 0,001$.

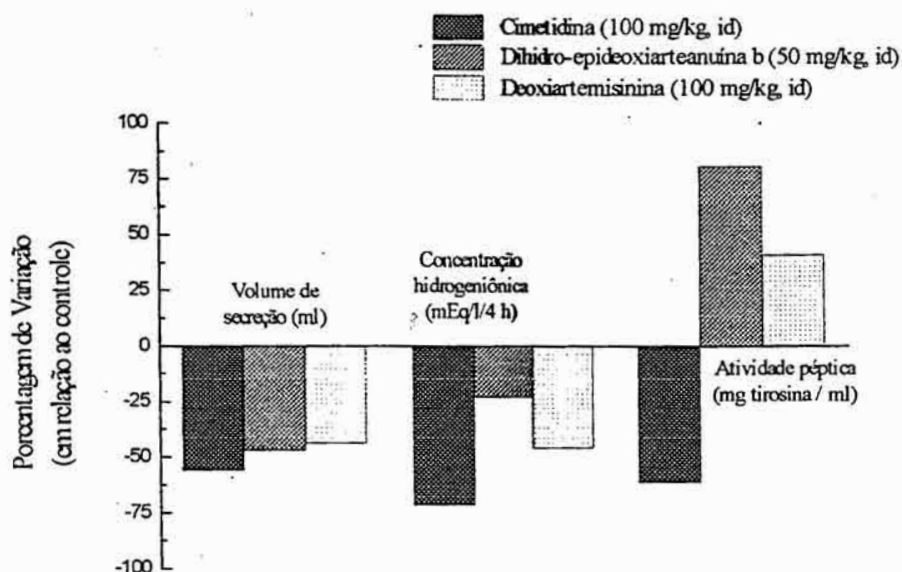


GRÁFICO 10: Efeito da administração intraduodenal da cimetidina, da dihidro-epideoxiarteauína b e da deoxiartemisinina sobre o volume, a concentração hidrogeniônica e atividade péptica do conteúdo gástrico no modelo de ligadura do piloro

6.1.6. Medida da agregação plaquetária

6.1.6.1. Dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina

A dihidro-epideoxiarteauína b teve a sua atividade avaliada sobre a agregação plaquetária, determinada fotometricamente e que foi induzida pelo ADP (10 μ L, 4 μ M) no PRP ou plasma rico em plaquetas (400 μ L).

Esta substância foi solubilizada e quando adicionada ao PRP + ADP, nos volumes de 10 e 20 μ L e na concentração de 40 μ M, apresentou valores de amplitude de agregação, equivalentes a 74 e 63%, respectivamente, comparados com um valor de 56%, quando foi adicionado somente o ADP. Foi observada portanto, uma atividade potencializadora da dihidro-epideoxiarteauína b, sobre a agregação plaquetária induzida pelo ADP.

Esta potencialização foi revertida quando a dihidro-epideoxiarteauína b foi adicionada (10 μ L, 40 μ M) no PRP previamente adicionado de ADP e indometacina, tendo

sido observado um valor de amplitude de agregação, que foi equivalente a 39%, muito próximos àquele observado, de 34%, quando a indometacina foi adicionada no PRP, somente em presença de ADP.

Os dados obtidos estão expressos na tabela 11, que relaciona os tratamentos e a amplitude de agregação (%).

TABELA 11: Efeito da adição da dihidro-epideoxiarteauína b sobre a agregação plaquetária induzida pelo ADP, na ausência e presença de indometacina

Tratamento	Concentrações (μ M)	Amplitude de agregação (%)
ADP	4	56
ADP + dihidro-epideoxiarteauína b	4 / 40	74
ADP + dihidro-epideoxiarteauína b	4 / 80	63
ADP + indometacina	4 / 30	34
ADP + indometacina + dihidro-epideoxiarteauína b	4 / 30 / 40	39

A deoxiartemisinina também teve a sua atividade avaliada sobre a agregação plaquetária, nas mesmas condições experimentais.

Esta substância foi solubilizada e quando adicionada ao PRP + ADP, nos volumes de 10 e 20 μ L e na concentração de 40 μ M, apresentou valores de amplitude de agregação, equivalentes a 48 e 66%, respectivamente, comparados com um valor de 45%, quando foi adicionado somente o ADP. Foi observada portanto, uma atividade potencializadora da deoxiartemisinina, sobre a agregação plaquetária induzida pelo ADP, quando foi adicionada no volume de 20 μ L.

Esta potencialização também revertida quando a deoxiartemisinina foi adicionada (20 μ L, 40 μ M) no PRP previamente adicionado de ADP e indometacina, tendo sido observado um valor de amplitude de agregação, que foi equivalente a 35%, muito próximos àquele observado, de 34%, quando a indometacina foi adicionada no PRP, somente em presença de ADP.

Os dados obtidos estão expressos na tabela 12, que relaciona os tratamentos e a amplitude de agregação (%).

TABELA 12: Efeito da adição da deoxiartemisinina a agregação plaquetária induzida pelo ADP, na ausência e presença de indometacina

Tratamento	Concentrações (μ M)	Amplitude de agregação (%)
ADP	4	45
ADP + deoxiartemisinina	4 / 40	48
ADP + deoxiartemisinina	4 / 80	63
ADP + indometacina	4 / 30	34
ADP+ indometacina + deoxiartemisinina	4 / 30 / 80	35

6.1.7. Determinação quantitativa do conteúdo de prostaglandina E₂ (PGE₂) da mucosa gástrica de ratos

6.1.7.1. Dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina

Neste modelo experimental, foram avaliados os efeitos da administração oral da dihidro-epideoxiarteauína b e da deoxiartemisinina, com e sem a administração prévia de indometacina. Somente a dihidro-epideoxiarteauína b foi capaz de promover um aumento do conteúdo de prostaglandinas E₂ na mucosa gástrica de 61,1%. Os resultados estão expressos na tabela 13, como média $\pm$ erro padrão da média da quantidade de PGE₂ por grama de tecido glandular gástrico.

TABELA 13: Efeito da administração oral da carbenoxolona, da dihidro-epideoxiarteauína b e da deoxiartemisinina, obtidos das partes aéreas de *Artemisia annua* L sobre a quantidade de prostaglandina do tipo E₂ (PGE₂) da mucosa gástrica de ratos

Tratamento sc + tratamento vo	Dose (mg/kg, vo)	N	PGE ₂ pg/g tecido (média ± epm)	Variação percentual da PGE ₂ (%)
Salina + salina	—	4	318,15 ± 79,21	—
Salina + carbenoxolona	200	5	423,86 ± 13,79*	33,2
Salina + dihidro- epideoxiarteauína b	50	5	512,59 ± 125,82 **	61,1
Salina + deoxiartemisinina	100	4	271,31 ± 87,39	—
Indometacina + salina		4	48,90 ± 2,12***	—
Indometacina + dihidro- epideoxiarteauína b	5	4	71,95 ± 15,91***	—
Indometacina + deoxiartemisinina	100	4	63,83 ± 6,61***	—

ANOVA $F_{(6,27)} = 34,11$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

6.2. Fitoquímica

A fração lactonas (F_{LAC}), obtida do extrato bruto hidroetanólico, foi purificada fornecendo as frações $F1A_{LAC}$, $F1B_{LAC}$, $F1C_{LAC}$ e $F1D_{LAC}$. A partir dos procedimentos de purificação da $F1C_{LAC}$ e $F1D_{LAC}$, foram isoladas as lactonas sesquiterpênicas identificadas como dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina, cujas estruturas químicas estão representadas na figura 3.

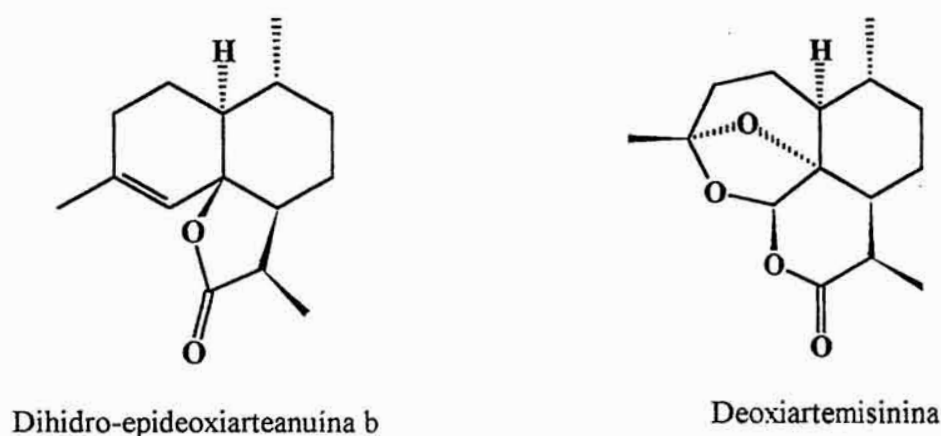


FIGURA 3: Estruturas químicas das lactonas sesquiterpênicas isoladas das frações $F1C_{LAC}$ e $F1D_{LAC}$

6.2.1. Deoxiartemisinina

A fração $F1D_{LAC}$, enriquecida em deoxiartemisinina, foi purificada inicialmente por cromatografia em coluna clássica. A figura 4 mostra perfil cromatográfico da fração $F1D_{LAC}$, indicando a presença da deoxiartemisinina.

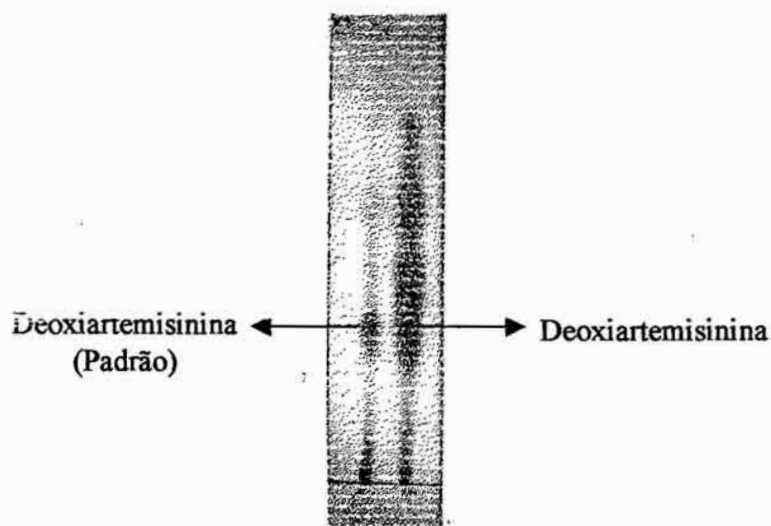


FIGURA 4: Perfil por cromatografia de camada delgada da FID_{LAC}, indicando a presença da deoxiartemisinina (Fase móvel: diclorometano / metanol 1%)

Na eluição da coluna clássica foram obtidas várias subfrações e por monitoramento em cromatografia de camada delgada, algumas delas foram reunidas, em duas frações enriquecidas em deoxiartemisinina, sendo que uma delas, apresentou também a presença da artemisinina. A figura 5 demonstra o perfil cromatográfico das subfrações coletadas da coluna clássica, indicando aquelas que foram reunidas para constituir as duas frações enriquecidas em deoxiartemisinina. Os perfis cromatográficos destas duas frações, estão representados na figura 6.

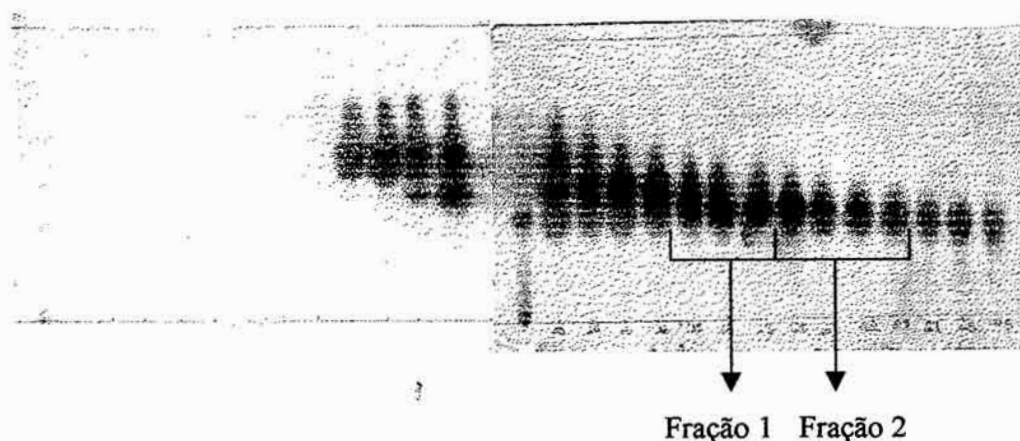


FIGURA 5: Perfil por cromatografia de camada delgada das subfrações coletadas das colunas clássicas, utilizadas na purificação da $F1D_{LAC}$, obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas F_{LAC} . Fração 1, isenta de artemisinina e Fração 2, contendo artemisinina. (Fase móvel: diclorometano / metanol 1%)



FIGURA 6: Perfil por cromatografia de camada delgada das frações 1 e 2, com ausência e presença de artemisinina, respectivamente, obtidas da reunião de subfrações coletadas a partir da eluição da coluna clássica, utilizada na purificação da $F1D_{LAC}$, obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas. (Fase Móvel: diclorometano / metanol 1%)

Para separar a artemisinina e isolar deoxiartemisinina, foi utilizada uma coluna cromatográfica seca. A figura 7 demonstra a cromatografia de camada delgada, utilizada como guia para o corte da coluna seca.

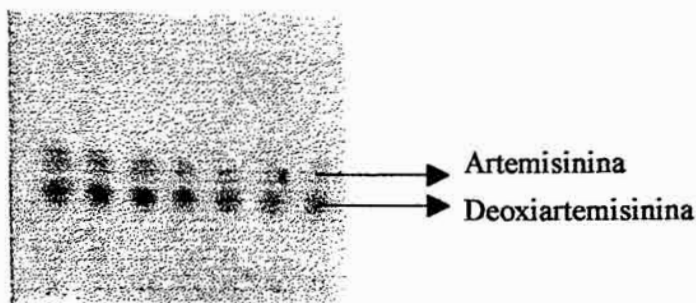


FIGURA 7: Cromatografia em camada delgada utilizada como guia para o corte da coluna cromatográfica seca, para a separação da deoxiartemisinina e artemisinina (Fase móvel: diclorometano / metanol 1%)

Após estes procedimentos, a deoxiartemisinina foi isolada em forma de cristal branco, com ponto de fusão de 109-111°C. No espectro de massas, apresentou um íon molecular em m/z 266. A rotação ótica específica (0,045 g/mL) em diclorometano, medida no equipamento Polamat com lâmpada de sódio, foi de -149° . No espectro de infravermelho, foi observada a carbonila da lactona em 1747,7 cm^{-1} . No espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, foram observadas as metilas em δ 1,53 e 1,15. Estes dados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (JUNG, 1986). A figura 8 apresenta o perfil cromatográfico e respectivo espectro de massas, obtido em CG/EM (HP 5980 / HP5970) e as figuras 9 e 10, os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN^1H) e carbono-13 (RMN^{13}C), da deoxiartemisinina, obtidos no equipamento INOVA 500.

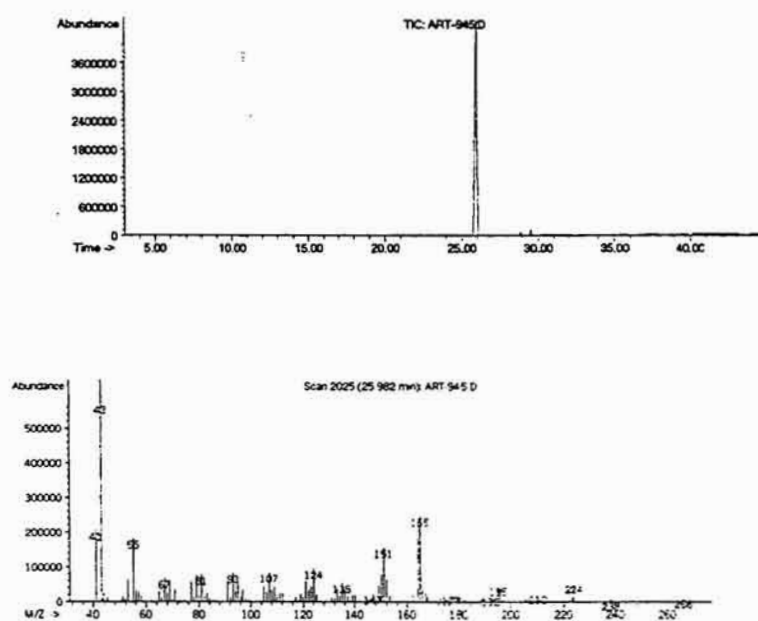


FIGURA 8: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas da deoxiartemisinina, obtido por CG/EM (HP5980 / HP 5870)

ral analitico AM0:42 mar96cent

* Sequence: s2pul

vent: CDCl3

lient temperature

NT-30000 "qamini"

SE SEQUENCE

ax. delay 2.000 sec

ise 45.4 degrees

g. time 0.800 sec

sub 20000.0 Hz

5 repetitions

ERVE C13, 75.4520029 MHz

CUPLE H1, 300.0689578 MHz

ver 41 dB

continuously on

1/2-16 modulated

A PROCESSING

de broadening 1.0 Hz

piso 32768

ol time 4 hr, 7 min, 4 sec

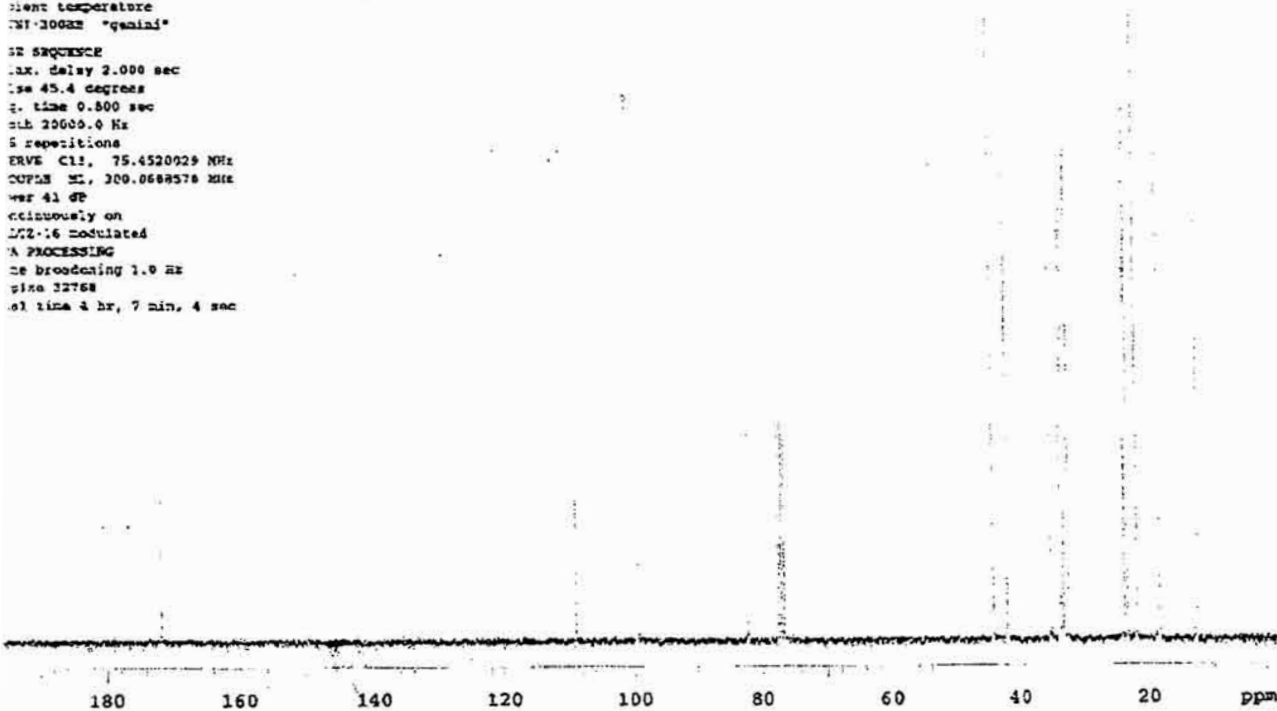


FIGURA 10: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (125,7 MHz) da deoxiartemisinina

6.2.2 Dihidro-epideoxiarteanuína b

A fração F1C_{LAC}, enriquecida em dihidro-epideoxiarteanuína b, foi purificada por cromatografia em coluna clássica. As figuras 11 e 12, demonstram o monitoramento feito em cromatografia em camada delgada, de algumas subfrações coletadas da coluna clássica, até o isolamento da dihidro-epideoxiarteanuína b pura.

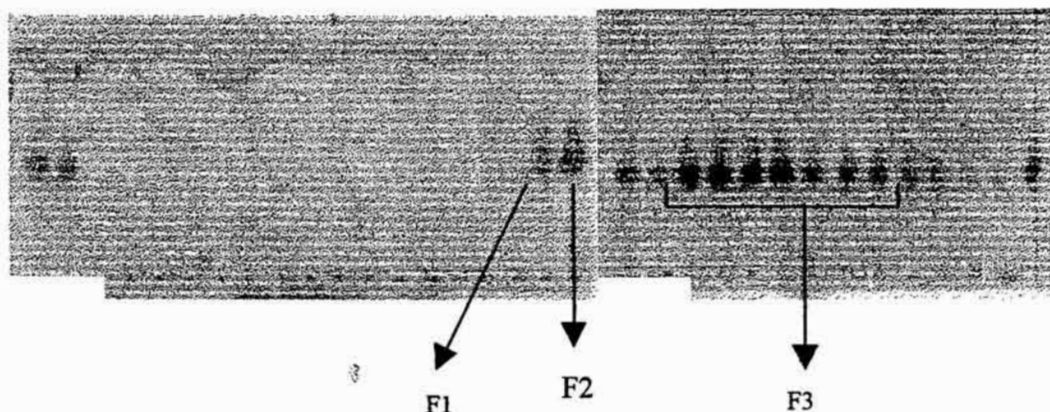


FIGURA 11: Cromatografia em camada delgada obtida no monitoramento da purificação da fração $F1C_{LAC}$ para a obtenção de uma subfração enriquecida em dihidro-epideoxiarteauína b (F3)

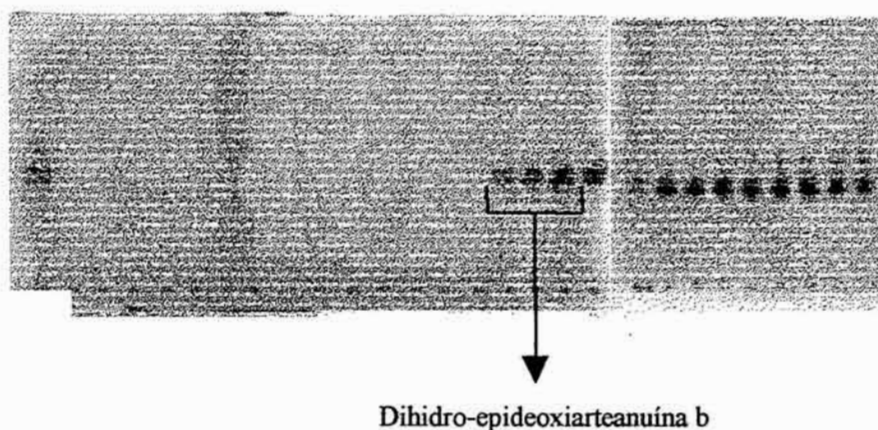


FIGURA 12: Cromatografia em camada delgada obtida no monitoramento da purificação da fração $F1C_{LAC}$ para a obtenção da dihidro-epideoxiarteauína b, a partir de subfrações enriquecidas em dihidro-epideoxiarteauína b (F3)

Com estes procedimentos, a dihidro-epideoxiarteauína b foi isolada numa forma oleosa e identificada pela comparação de seus de CG/MS, RMN 1H e RMN ^{13}C com os da literatura (BROWN, 1992). No espectro de massas, foi observado o íon molecular em m/z 234. No espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, foram observados a

metila em δ 1,15 e 1,75 relativas as metila ligada a dupla ligação e metila α a lactona respectivamente. A rotação ótica específica em clorofórmio (5mg/mL) foi 49,96°. A figura 13, demonstra o espectro de massas e as figuras 14 e 15 representam, respectivamente, os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13, da dihidro-epideoxiarteauína b.

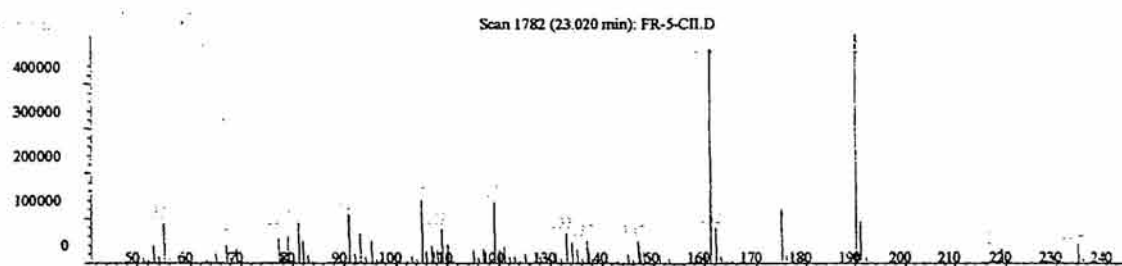


FIGURA 13: Espectro de massas da dihidro-epideoxiarteauína b, obtido por CG/EM (HP5980 / HP 5870)

MARTINA/CH06A "F1" C0C13/06% ASPIRIN

Solvent: CDCl3
Ambient temperature
INQVA-306 "Inova500"
Pulse sequence
Pulse 28.4 degrees
Acq. time 4.830 sec
Width 1000.6 Hz
128 repetitions
OBSERVE H1, 499.8826701 MHz
DATA PROCESSING
F1 size 85238
Total time 8 minutes

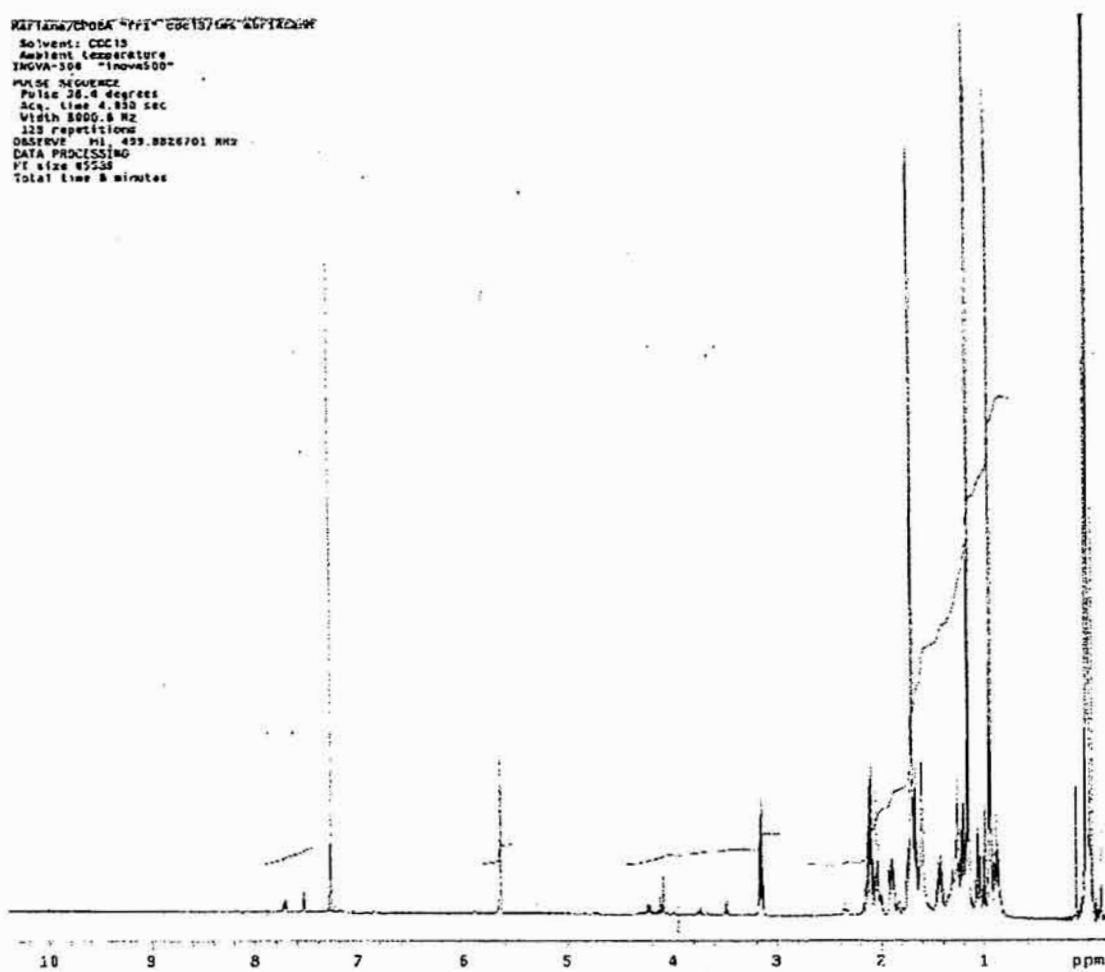


FIGURA 14: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (500 MHz) da dihidro-epideoxiarteauína b

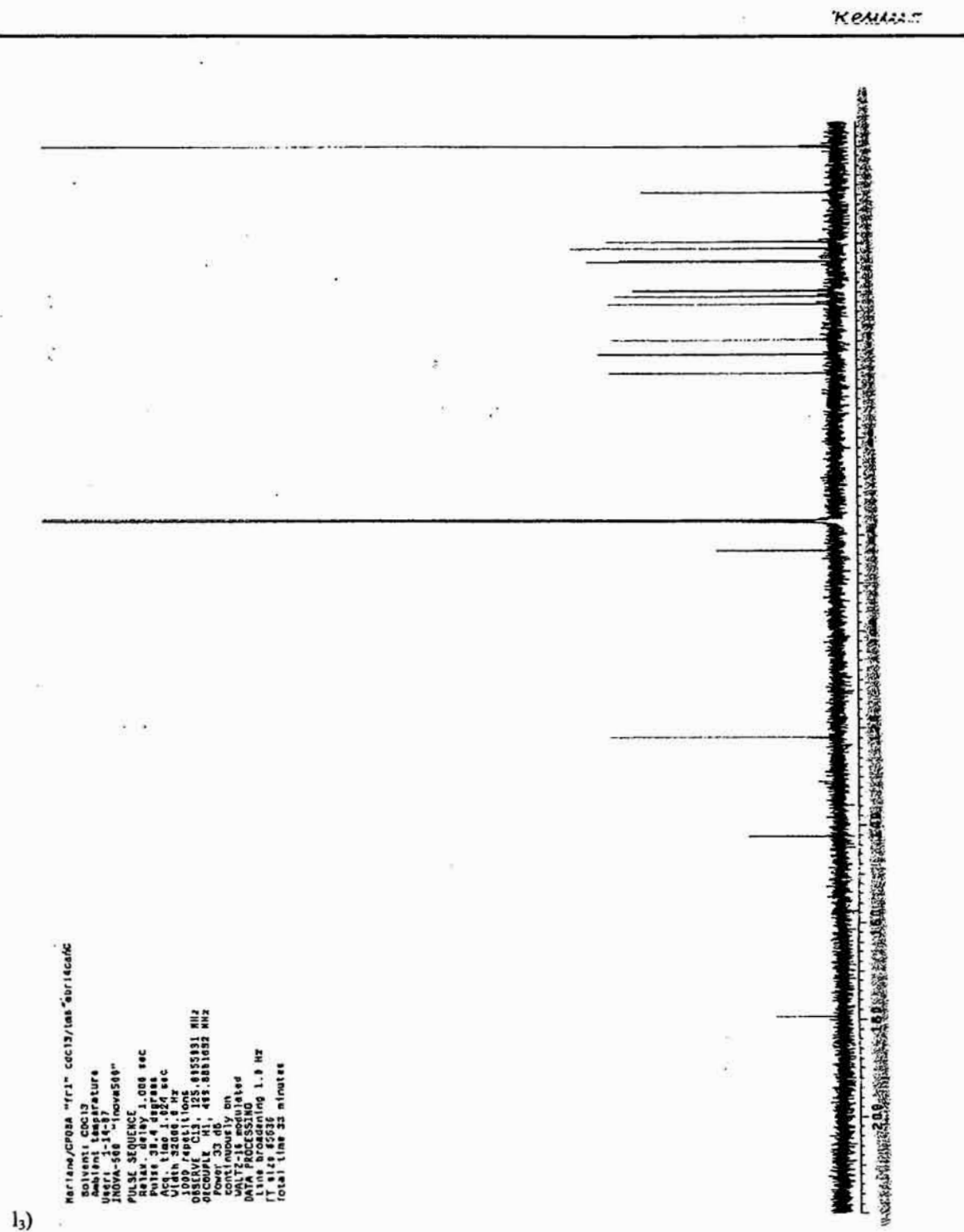


FIGURA 15: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (125,7 MHz), da dihidro-epideoxiarteauina b

7. Discussão

A *Artemisia annua* L., espécie vegetal que constitui o alvo de estudo deste trabalho, vem sendo estudada há mais de dez anos, no CPQBA/UNICAMP, de forma multidisciplinar, envolvendo profissionais das Divisões de Agrotecnologia, Fitoquímica, Farmacologia e Toxicologia e Microbiologia.

Estes estudos envolveram inicialmente o melhoramento genético da espécie, com a obtenção de um híbrido e ainda, a sua aclimação no campo de cultivo experimental da Divisão de Agrotecnologia, com o objetivo de otimizar, pela espécie vegetal, a produção de artemisinina, o princípio ativo com atividade antimalárica (MAGALHÃES et al., 1997). Adicionalmente, foram realizados alguns trabalhos para a verificação da interferência da nutrição mineral na produção de artemisinina, também com o objetivo da otimização da síntese deste composto pela planta (FIGUEIRA et al., 1996) e ainda, um amplo estudo sobre a variação sazonal da produção de algumas substâncias pela espécie (FOGLIO, 1996).

Na sequência da obtenção deste híbrido, foi obtido o registro de uma patente, devido ao desenvolvimento de um importante processo de otimização da extração e isolamento da artemisinina em grande escala e posterior transformação da mesma, em

derivados semi-sintéticos, que apresentam algumas vantagens farmacocinéticas (FOGLIO et al., 1998).

Portanto, os trabalhos agrônomo e fitoquímico em larga escala e a observação de que, outras espécies do gênero *Artemisia*, como a *Artemisia douglasiana* Besser, apresentam atividade antiulcerogênica gástrica devido à presença de lactonas sesquiterpênicas, motivaram este trabalho, que teve como objetivos iniciais, a investigação da atividade antiulcerogênica da *Artemisia annua* L. e a identificação inicial, de frações semipurificadas, que concentrassem os princípios ativos responsáveis por esta atividade.

Uma das primeiras etapas, foi a identificação da presença da atividade antiulcerogênica em extratos brutos da espécie (DIAS, 1997) e sequencialmente, a verificação da possibilidade de que, a própria artemisinina, o princípio ativo antimalárico, fosse também a responsável pela atividade antiulcerogênica observada nos extratos brutos. Quando a artemisinina foi administrada por via oral, no modelo de úlcera induzida por etanol, não foi observada nenhuma inibição das lesões ulcerativas produzidas, ocorrendo até mesmo um discreto aumento destas lesões. Este aumento pode ser justificado, pelo fato da artemisinina ser capaz de formar um radical livre a partir de seu grupamento endoperóxido, o que pode causar lesões às células vivas de uma maneira geral. (FOGLIO et al., 2002).

Esta informação impulsionou ainda mais a continuidade deste trabalho, devido à possibilidade de identificação de novos princípios ativos na espécie.

Os extratos brutos já mencionados anteriormente e algumas frações semipurificadas obtidos das partes aéreas de *Artemisia annua* L., demonstraram atividade antiulcerogênica em diferentes modelos experimentais. Estes extratos foram fracionados com o objetivo de obter frações semipurificadas que concentrassem os princípios ativos antiulcerogênicos. Com estas frações semipurificadas, foram realizados alguns experimentos que fornecessem um indicativo sobre o mecanismo de ação antiulcerogênica dos princípios ativos da espécie.

Basicamente, existem dois mecanismos de ação para as substâncias antiulcerogênicas. O primeiro deles, é relacionado ao controle da secreção ácida gástrica e o segundo, aos mecanismos que aumentam a resistência da mucosa contra fatores agressivos endógenos e exógenos, podendo interferir ou não, com o controle da secreção ácida (ALLEN, 1993).

Pelo fato das frações semipurificadas terem apresentado atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol, a primeira hipótese avaliada foi uma interferência das mesmas sobre os fatores citoprotetores, como o óxido nítrico, as substâncias sulfidrílicas não proteicas e as prostaglandinas. Este modelo experimental é de grande importância para a identificação de substâncias que possuem a sua atividade antiulcerogênica devido aos mecanismos citoprotetores, ou seja, aqueles que protegem a mucosa gástrica, sem necessariamente interferir com o controle da secreção ácida gástrica (ROBERT, 1979). De acordo com os resultados obtidos, foi levantada a hipótese de que o mecanismo de ação estivesse relacionado com uma interferência sobre a síntese de prostaglandinas (DIAS, 1997; DIAS et al., 2001).

A partir desta observação, este trabalho foi continuado com o objetivo de isolar e identificar química e farmacologicamente o(s) princípio(s) ativo(s) antiulcerogênico(s) da espécie e ainda, de determinar de uma forma mais específica, o mecanismo de ação envolvido por meio de modelos experimentais.

Uma fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas foi obtida do extrato bruto hidroetanólico, sendo posteriormente submetida aos procedimentos de purificação cromatográfica, fornecendo quatro frações denominadas F1A_{LAC}, F1B_{LAC}, F1C_{LAC} e F1D_{LAC}, que apresentaram atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.

As frações F1C_{LAC} e F1D_{LAC} foram repurificadas também por colunas cromatográficas até que foram isoladas respectivamente, as lactonas sesquiterpênicas denominadas dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina, que constituíam componentes majoritários nas referidas frações e que já tinham sido identificadas em outras frações ativas avaliadas anteriormente (DIAS, 1997).

Já as frações F1A_{LAC}, F1B_{LAC} foram avaliadas em seus perfis em cromatografia de camada delgada e reunidas numa única fração (FAB_{LAC}), sendo submetidas a alguns modelos experimentais em animais, sem que fosse até o momento, obtida alguma substância ativa isolada.

Na tentativa de estabelecer uma dose adequada para a realização dos experimentos em animais, dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina foram administradas por via oral em diferentes doses no modelo de úlcera induzida por etanol. Os valores de dose efetiva 50% (DE₅₀), calculados por regressão linear, foram equivalentes a 55,6 e 88,7

mg/Kg, respectivamente, sendo portanto, a dihidro-epideoxiarteauína b, a substância mais potente.

A fração FAB_{LAC}, obtida no processo de purificação cromatográfica da F_{LAC} e a deoxiartemisinina, foram administradas por via intraperitoneal no modelo de úlcera induzida por etanol, apresentando inibições do índice de lesões ulcerativas equivalentes a 47,5 e 40,3%, respectivamente. A fração FAB_{LAC} foi purificada em coluna cromatográfica, fornecendo quatro frações denominadas F1A_{AB}, F1B_{AB}, F1C_{AB} e F1D_{AB}, que foram administradas também pela via intraperitoneal em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos. Nestas condições experimentais, somente F1A_{AB} não apresentou atividade antiulcerogênica. As demais, F1B_{AB}, F1C_{AB} e F1D_{AB} reduziram o índice de lesões ulcerativas em 79,4, 86,6 e 72,1, respectivamente. A observação de que as frações FAB_{LAC} e suas derivadas e também a deoxiartemisinina terem apresentado atividade antiulcerogênica quando administradas por via intraperitoneal, indica a presença de princípios ativos que possuem uma atividade sistêmica importante, descartando a hipótese de que o efeito antiulcerogênico seja devido a uma citoproteção adaptativa, na qual algumas substâncias consideradas como irritantes suaves da mucosa gástrica, sendo administrados por via oral e desta forma, entrando em contato com a mesma, desencadeiam a produção de prostaglandinas, que são substâncias citoprotetoras endógenas (ROBERT et al., 1983).

Dihidro-epideoxiarteauína b e deoxiartemisinina também foram submetidas ao modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com prévio tratamento dos animais com indometacina, um antiinflamatório não esteroide, que inibe a atividade da ciclooxigenase constitutiva, uma das isoformas desta enzima, responsável pela etapa final da síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, liberado dos fosfolípidos da membrana celular (KONTUREK et al., 1995). Nestas condições experimentais, estas duas lactonas sesquiterpênicas não mais apresentaram a atividade antiulcerogênica anteriormente observada reforçando a hipótese levantada anteriormente ainda com frações semipurificadas, de que o mecanismo de ação antiulcerogênica está relacionado com o aumento da síntese de prostaglandinas na mucosa gástrica (DIAS, 1997; DIAS et al., 2001).

Para investigar mais profundamente esta possibilidade, foi realizada a determinação quantitativa do muco protetor. Na mucosa gástrica, existem dois tipos de muco, sendo que um deles é considerado luminal, sendo facilmente removido e por isto, não apresentando

propriedades citoprotetoras específicas. Este tipo de muco participa sobretudo como um lubrificante, protegendo a mucosa gástrica contra as forças mecânicas do processo de digestão. O outro, aderido à mucosa gástrica, é constituído por uma camada de glicoproteínas em forma de um gel, insolúvel em água, que protege a mucosa das agressões provocadas pelo ácido clorídrico e pela pepsina (SELLERS et al., 1986). A produção de muco em geral, principalmente aquele aderido à mucosa, é estimulada pelas prostaglandinas (DUBOIS et al., 1996).³ O ácido acetilsalicílico e outros antiinflamatórios não esteroidais, inibidores da ciclooxigenase e consequentemente da síntese de prostaglandinas, diminuem a quantidade de muco protetor e ainda, interferem sobre as características físico-químicas da camada glicoproteica (SCHEIMAN, 1996). Os grupos de animais tratados por via oral, com a dihidro-epideoxiarteanaína b e deoxiartemisinina, no modelo de úlcera induzida por etanol, apresentaram um aumento de 34,9% e de 23,2%, reforçando portanto, a possibilidade de interferência destes dois princípios ativos com o aumento da síntese de prostaglandinas pela mucosa gástrica. Adicionalmente, a Fração FAB_{LAC} também foi administrada por via oral em animais, porém sem nenhum indutor de ulceração, apresentando um aumento de 80%, da quantidade de muco.

De acordo com as observações anteriores, que indicavam que o mecanismo de ação antiulcerogênica da dihidro-epideoxiarteanaína b e da deoxiartemisinina estava relacionado com a síntese de prostaglandinas, foi realizada a avaliação da agregação plaquetária no plasma enriquecido em plaquetas, obtido de sangue humano. As duas lactonas sesquiterpênicas foram capazes de potencializar a agregação plaquetária induzida pelo ADP (difosfato de adenosina), sendo que esta potencialização foi revertida quando realizada a administração prévia de indometacina. As plaquetas possuem no seu aparato enzimático, a ciclooxigenase, na sua isoforma COX-1 ou constitutiva, que é a responsável, principalmente, pela síntese tromboxano A₂, um importante agente endógeno estimulador da agregação plaquetária (MORROW e ROBERTS, 2003). A potencialização observada pode portanto, ser devida à uma estimulação da COX-1 e consequente aumento da produção de tromboxano A₂. Este dado é reforçado pela observação da reversão desta atividade potencializadora, quando da administração prévia de indometacina, que bloqueia a ciclooxigenase, diminuindo a produção de tromboxano A₂ e consequentemente, a agregação plaquetária. Portanto, a dihidro-epideoxiarteanaína b e a deoxiartemisinina parecem estimular a atividade da ciclooxigenase. Desta forma, estas substâncias poderiam

então, proporcionar um aumento da produção de prostaglandinas no estômago, que possuem função citoprotetora.

Na determinação quantitativa, por meio de ensaio imunoenzimático, do conteúdo de prostaglandina do tipo E₂ (PGE₂) na mucosa gástrica de ratos, foi observado um aumento de 61,1% no conteúdo desta substância endógena na mucosa gástrica, somente no grupo de animais tratados com a dihidro-epideoxiarteauína b, quando comparados com o grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de tratamento prévio. Porém, quando foram avaliadas as produções de PGE₂ em grupos de animais que receberam um tratamento prévio com indometacina, um antiinflamatório não esteroide, que inibe a síntese de prostaglandinas, foi observado um aumento da produção de PGE₂, nos grupos de animais que receberam o tratamento oral tanto com a dihidro-epideoxiarteauína b, quanto com a deoxiartemisinina, equivalente a 47,1 e 30,5%, respectivamente. Desta forma, ainda foi possível considerar a interferência da deoxiartemisinina na síntese de prostaglandinas.

Além de todos estes modelos experimentais específicos para a identificação de substâncias citoprotetoras, foi também realizado o modelo de ligadura do piloro em ratos, para avaliar uma possível atividade das lactonas sesquiterpênicas isoladas da *Artemisia annua* L., sobre o controle da secreção ácida. No conteúdo gástrico coletado, não foi observada nenhuma alteração em relação ao volume de secreção nos grupos de animais tratados com a dihidro-epideoxiarteauína b e com a deoxiartemisinina. Somente o grupo de animais tratados com a deoxiartemisinina apresentou uma redução da concentração hidrogeniônica equivalente a 45,9%. Porém, quando foi avaliada a atividade péptica, foi observado um aumento significativo da quantidade tirosina detectada, equivalente a 80,8 e 40,7%, respectivamente nos grupos de animais tratados com a dihidro-epideoxiarteauína b e com a deoxiartemisinina. Este resultado também reforça a possibilidade de uma interferência destas substâncias com a síntese de prostaglandinas, pois fármacos que promovem o chamado fenômeno de citoproteção, podem proteger a mucosa gástrica, por diminuir ou não, a secreção ácida gástrica. Além disto, o aumento das prostaglandinas locais promovem aumento da atividade péptica (GRITTI et al., 2000), detectado nos grupos de animais tratados com a dihidro-epideoxiarteauína b e com a deoxiartemisinina.

O trabalho fitoquímico resultou no isolamento e na identificação, inicialmente, da dihidro-epideoxiarteanaína b e da deoxiartemisinina, podendo ainda ser identificados outros compostos ativos presentes na fração FAB_{LAC}. Os resultados obtidos nos experimentos farmacológicos indicaram que a espécie vegetal apresenta atividade antiulcerogênica, que envolvem várias substâncias químicas, podendo ser estabelecido um sinergismo de ação farmacológica, quando a planta é utilizada inteira ou na forma de preparados brutos. Porém é importante ressaltar a atividade antiulcerogênica observada quando dihidro-epideoxiarteanaína b e da deoxiartemisinina foram avaliadas isoladamente nos modelos experimentais de indução de úlcera gástrica.

Os resultados obtidos reforçaram a afirmação de que o reino vegetal constitui certamente, uma enorme fonte de novas substâncias ativas, que podem ser úteis para o desenvolvimento de novos medicamentos, depois de avaliadas as vantagens terapêuticas e toxicológicas, a partir de dados coletados nos testes pré clínicos e clínicos.

8. Conclusão

A *Artemisia annua* L., espécie vegetal pertencente à família Asteraceae, apresenta atividade antiulcerogênica gástrica devido à presença de vários princípios ativos, incluindo as lactonas sesquiterpênicas denominadas dihidro-epideoxiarteanaína b e deoxiartemisinina.

Estas substâncias possuem um mecanismo de ação antiulcerogênica possivelmente relacionado com a interferência com os mecanismo citoprotetores da mucosa gástrica, promovendo um aumento da síntese de prostaglandinas locais.

9. Referências Bibliográficas

AIHARA, T.; NNAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K.; OKABE, S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present and future. **Pharmacol Ther**, 98: 109-127, 2003.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, 28: 13-19, 1998.

ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G.; GARNER, A.; KIVILAAKSO, E. Gastroduodenal mucosal protection. **Physiol Rev**, 73: 823-857, 1993.

ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. **J. Gen Physiol**, 22: 78-89, 1938.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE SAÚDE NO BRASIL: Banco de dados. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em: 30 nov. 2003.

ARAKAWA, T.; FUKUDA, T.; FUKUDA, K. Prostaglandins in the stomach: an update. **J Clin Gastroenterol**, 27 sup. 1: S1-S11, 1998.

BALINT, G.A. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. **Pharmacol Ther**, 90: 261-265, 2001.

BAROCELLI, E.; BALLABENI, V. Histamine in the control of gastric acid secretion. **Pharmacol Res**, 47: 299-304, 2003.

BAUER, R.F.; BIANCHI, R.G.; CASLER, J.; GOLDSTIN, B. Comparative mucosal protective properties of misoprostol, cimetidine and sucralfate. **Dig Dis Sci**, 31(2): 81S-85S, 1986.

BIGHETTI, A.E. **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico e da cumarina obtidos da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** – Campinas, 1999. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).

BLACK, J. W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, C.J.; GANELLIN, C.R.; PARSONS, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. **Nature**, 236: 385-390, 1972.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of antiulcer remedies. **Phytother Res**, 14: 581-591, 2000.

BORSTNIK, K.; PAIK, I.; SHAPIRO, T.A.; POSNER, G.H. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. **Int J Parasitol**, 32: 1661-1667, 2002.

BOULDIN, A.S.; SMITH, M.C.; GARNER, D.D.; SZEINBACH, S.L.; FRATE, D.A.; CROOM, E.M. Pharmacy and herbal medicine in the US. **Soc Sci Med**, 49: 279-289, 1999.

BRIMBLECOMBE, R.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, D.J.; GANELLIN, C.R.; PARSONS, E.M. Cimetidine, a non-thiourea H₂-receptors. **J Int Med Res**, 3: 8692, 1975.

Brown, G.D. **J Nat Prod**, 55: 1756-1760, 1992.

CALATAYUD, J.; GONZALEZ, A. History of the development and evolution of local anesthesia since the coca leaf. **Anesthesiology**, 98(6): 1503-1508, 2003.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agentes). **Braz J Med Biol Res**, 33(2): 179-189, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21(1): 99-104, 1998.

CHEN, H.H.; ZHOU, H.J.; FANG, X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. **Pharmacol Res**, 48: 231-236, 2003.

CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP. On qinhaosu and its derivatives as anti-malarials. **Trad Chin Med**, 2: 3-8, 1982.

CHONG, Y.S.; SU, L.L.; ARULKUMARAN, S. Misoprostol: a quarter century of use, abuse and creative misuse. **Obstet Gynecol Surv**, 59(2): 128-140, 2004.

CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, 40(6): 1585-1612, 1995.

CORNE, S.J.; MORRISSEY, S.M.; WOODS, R.J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol. Lond.** 242: 116-117P, 1974.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agentes from natural sources. **Cancer Invest**, 17(2): 153-163, 1999

CRAGG, G.M.; NEWMANN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and devepment. **J Nat Prod**, 60: 52-60, 1997.

CRAGG, G.M.; SCHEPARTZ, S.A.; SUFFNESS, M.; GREVER, M.R. The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **J Nat Prod**, 56: 1657-1668, 1993.

DHINGRA, V.; RAO, K.V.; NARASU, M.L. Artemisinin, present status and perspectives. **Biochemical Education**, 27: 105-109, 1999.

DHINGRA, V.; RAO, K.V.; NARASU, M.L. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. **Life Sci**, 66(4): 279-300, 2000.

Dias, P.C. **Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e das frações semipurificadas de *Artemisia annua* L.** – Campinas, 1997. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).

DIAS, P.C.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of crude ethanol extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Phytother Res**, 15: 670-675, 2001.

DIAS, P.C.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; NOGUEIRA, D.C.F.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. **J Ethnopharmacol**, 69, 57-62, 2000.

DING, G.S. Recent studies on antimalaricals in China: A review of literature since 1980. **International J Exp Clin Chemother**, 1 (2): 9-22, 1988.

DING, M.; KINOSHITA, Y.; KISHI, K.; NAKATA, H.; HASSAN, S.; KAWANAMI, C.; SUGIMOTO, Y.; KATSUYAMA, M.; NEGISHI, M.; MARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A.; CHIBA, T. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**, 43: 199-216, 1997.

DUBOIS, R.N.; EBERHART, C.E.; Williams, C.S. Introduction to eicosanoids and the gastroenteric tract. **Gastroenterol Clin North America**, 25(2): 267-277, 1996.

EBERHART, C.E.; DUBOIS, R.N. Eicosanoides and gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, 109: 285-301, 1995.

ELLIOT, S.N.; MSKNIGHT, W.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, 109: 524-530, 1995.

FELIX, W.L.; MILLER, J.C.; GUTH, P.H. Dissociated effects of misoprostol on gastric acid secretion and mucosal blood flow. **Dig Dis Sci.** 31 (2): Suppl. Feb. 86S-90S, 1986.

FELLOWS, L.E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: Future prospects. In: Coombes, JD. **New drugs from natural sources**. London: IBC Technical Services, 1992.

FIGUEIRA, G.M. Mineral nutrition, production and artemisinin content in *Artemisia annua* L. **Acta Horticulturae**, 425: 573-577, 1996.

FOGLIO, M.A. **Um estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil.** . – Campinas, 1996. (Tese – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).

FOGLIO, M.A.; REHDER, V.L.G.; NOGUEIRA, C.; RODRIGUES, R.A.F.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA, S. **Tecnologia de produção da artemisinina e seus derivados**. Patente, 1998.

FOGLIO, M.A.; DIAS, P.C.; ANTÔNIO, M.A.; POSSENTI, A.; RODRIGUES, R.A.F.; SILVA, E.F.; REHDER, V.L.G.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of some sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua*. **Planta Med**, 68: 515-518, 2002.

FORMAN, D.; GRAHAM, D.Y. Review article: impact of *Helicobacter pylori* on society – role for a strategy of “search and eradicate”. **Aliment Pharmacol Ther**, 19. Sup. 1: 17-21, 2004.

GAMBERINI, M.T.; SKORUPA, L.A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 86: Supl. II, 137-139, 1991.

GIORDANO, O.S.; GUERREIRO, E.; PESTCHANKER, M.J.; GUZMAN, J.A.; PASTOR, D.; GUARDIA, T. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. **J Nat Prod**, 53: 4: 803-809, 1990.

GRAHAM, D.Y. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. **Gastroenterology**, 96: 615-625, 1989.

GRITTI, I.; BANFI, G.; ROI, G.S. Pepsinogens: physiology, pharmacology, pathophysiology and exercise. **Pharmacol Res**, 41 (3), 265-281, 2000.

GUARALDO, L. **Atividade antiúlcera gástrica do extrato aquoso e frações isoladas de *Davilla rugosa* Poiret: Avaliação dos mecanismos envolvidos** - São Paulo, 2002. (Tese – Doutorado – Universidade Federal de São Paulo).

GUARDIA, T.; GUZMAN, J.A.; PSTCHANKER, M.J.; GUERREIRO, E.; GIORDANO, O.S. Mucus synthesis and sulfhydryl groups in cytoprotection mediated by dehydroleucodine, a sesquiterpene lactone. **J Nat Prod**, 57 (4): 507-509, 1994.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, 30(12): 3864-3874, 1991.

HARADA, N.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; ISOBE, H.; LIU, W. Gastric prostacilin PGI₂ prevents stress-induced gastric mucosal injury in rats primarily by inhibiting leucocyte activation. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, 57: 291-303, 1999.

HIRSCHOWITZ, B.I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K.; WALLMARK, B.; SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Dig Dis Sci**, 40(2): 3S-23S, 1995.

HOOGERWERF, W.A.; PASRICHA, P.J. Agentes utilizados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e na doença do refluxo gastroesofágico. In: Hardman, J.G., Limbird L.E.: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10^a ed., São Paulo: Mc Graw Hill, 2003. p. 757-768.

ICHIKAWA, A.; SUGIMOTO, Y.; NEGISHI, M. Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, 14: 83-87, 1996.

INADA, I.; SATOH, H. Capsaicin-sensitive sensory neurons are involved in bicarbonate secretion induced by lansoprazole, a proton pump inhibitor, in rats. **Dig Dis Sci**, 41(4): 785-790, 1996.

JAHN, C.A. **Estudo Botânico da *Artemisia anua* L.**, 1988. (Dissertação – Mestrado).

- JUTEAU, F.; MASOTTI, V.; BESSIÈRE, J.M.; DHERBOMEZ, M.; VIANO, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. **Fitoterapia**, 73: 532-535, 2002.
- KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, 228: 1049-1055.
- KONSTANTINOPOULOU, M.; KARIOTI, A.; SKALTSAS, S.; SKALTSAS, H. Sesquiterpene lactones from *Anthemis altissima* and their anti-*Helicobacter pylori* activity. **J Nat Prod**, 66: 609-702, 2003.
- KONTUREK, S.J.; BROZOWSKY, T.; PYTKO-POLONCZYK, J.; DROZDOWICZ, D. Comparison of cholecystokinin, pentagastrin and duodenal oleate in gastroprotection in rats. **Scand J Gastroenterol**, 30(7): 620-630, 1995.
- KUMAR, N. Malaria: problems and plans in the genomic era. **Int J Parasitol**, 32: 1537-1538, 2002.
- LEHMANN, F.S.; HILDEBRAND, P.; BEGLINGER, C. New molecular targets for treatment of peptic ulcer disease. **Drugs**, 63(17): 1785-1797, 2003.
- LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: G.P. Ellis and G.B. West, ed.. *Progress in Medicinal Chemistry* - vol. 28, Elsevier Science Publishers, B.V., pp. 201-231, 1991.
- LINDBERG, U.P.; NORDBERG, U.P.; ALMINGER, T.; BRÄNDSTRÖM, A.; WALLMARK, B. The mechanism of action of the gastric acid secretion inhibitor, omeprazole. **J Med Chem**, 29: 1327-1329, 1986.
- LONERGAN, G.; Routsis, E.; GEORGIADIS, T.; AGELIS, G.; HONDRELIS, J.; MATSOUKAS, J.; LARSEN, L.K.; CAPLAN, F.R. Isolation. NMR studies and biological activities of onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*. **J Nat Prod**, 55(2): 225-228, 1992.
- MAGALHÃES, P.M.; DELABAYS, N.; SARTORATTO, A. New hybrid of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. **Ciência e Cultura**, 49(5/6): 413-415, 1997.

MESHNICK, S.R.; YANG, Y.; LIMA, V.; KUYPERS, F.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; YUTHAVONG, Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (Qinghaosu). **Antimicrob Agents Chemother**, 37(5): 1108-1114, 1993.

MIZUNO, H.; SAKAMOTO, C.; MATSUDA K. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. **Gastroenterology**, 112: 387-397, 1997.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; TAKAYUKI, S. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japan J Pharmacol**, 57: 495-505, 1991.

MORROW, J.D.; ROBERTS II, J. Autacóides derivados dos lipídeos. In: Hardman, J.G., Limbird L.E.: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed., São Paulo: Mc Graw Hill, 2003. p. 503-515.

NOGUEIRA, D.C.F. **Atividade antiulcerogênica do óleo essencial e da fração rica em alfa-bisabolol, obtidos de espécies do gênero *Eremanthus*** – Campinas, 2000. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).

NORMARK, S.; NILSSON, C.; NORMARK, B.H.; HORNEF, M.W. Persistent infection with *Helicobacter pylori* and the development of gastric cancer. **Adv Cancer Res**, 90: 63-89, 2003.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharmacol Ther**, 89: 207-219, 2001.

PAKODI, F.; ABDEL-SALAM, M.E.; DEBRECENI, A.; MÓZSIK, G. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease! An overview. **J. Physiol**, 94, 139-152, 2000.

PENISSI, A.; PIEZZI, R. Effect of dehydroleucodine on mucus production: a quantitative study. **Dig Dis Sci**, 44(4): 708-712, 1999.

PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.; CARVALHO, J.E.; REHDER, V.L.G. Central properties of the essential and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Pharmacol Res**, 48(5): 497-502, 2003.

PEZZUTO, J.M. Plant derived anticancer agents. **Biochemical Pharmacology**, 53: 121-133, 1997.

PHARMACEUTICALS from plants: great potential, few funds. **The Lancet**, 343(8912): 1513-1515, 1994.

PRADO-FRANCESCHI, J.; ANTUNES, E. Effect of metronidazole on platelet aggregation. **Braz J Med Biol Res**, 22: 1497-1500, 1989.

RATES, S.M.K. Plants as sources of drugs. **Toxicon**, 39: 603-613, 2001.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res**, 35(5): 523-534, 2002.

ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, 77: 761-767, 1979.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; DAVIS, J.P.; FIELD, S.O.; HANCHAR, A.J. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. **Am J Physiol**, 245: G113-G121, 1983.

SACHS, G.; CARLSSON, E.; LONDBERG, P.; WALLMARK, B. Gastric H⁺, K⁺-ATPase as therapeutic target. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 28: 269-284, 1988.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; VAGIN, O.; MUNSON, K.; WEEKS, D.; SCOTT, D.R.; VOLAND, P. Current trends in the treatment of upper gastrointestinal disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, 16(6): 835-849, 2002.

SCHEIMAN, J.M. Nsaids, gastrointestinal injury and cytoprotection. **Gastroenterol Clin North America**, 25(2): 279-298, 1996.

SCHRÖDER, H. Helenalin, and 11- α , 13-dihydro-helenalin, two constituents from *Arnica montana* L., inhibited human platelet function via thiol-dependent pathways. **Thrombosis Research**, 57: 839-845, 1990.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, 16: 463-468, 2000.

SCHUBERT, M.L. Regulation of gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, 10: 575-588, 1994.

SCOTT, D.R.; MARCUS, E.A.; WEEKS, D.L. Expressio of the *Helicobacter pylori urel* gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. **Infection and Imunity**, 68: 470-477, 2000.

SELLERS, L.A.; CARROLL, N.J.H.; ALLEN, A. Misoprostol-induced increases in adherent gastric mucus thickness and luminal mucus output. **Dig Dis Sci**, 31(2): 91S-95S, 1986.

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, 5: 43-61, 1945.

SCHEIMAN, J.M. Nsaids, gastrointestinal injury and cytoprotection. **Gastroenterol Clin North America**, 25(2): 279-298, 1996.

SILVERSTEIN, R.M.; BASDLER, G.C.; MORRIL, T.C. Espectrometria de massas. In __: - **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ed. Guanabara II, 4-64, 1979.

SMEDFORS, B.; JOHANSSON, C. Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by misoprostol. **Dig Dis Sci**, 31(2): 96S-100S, 1986.

STERMITZ, F.R.; SCRIVEN, L.N.; TEGOS, G.; LEWIS, K. Two flavonols from *Artemisia annua* wich potentiate the activity of berberine and norfloxacin against a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Planta Med**, 68(12): 1140-1141, 2002.

SUTTON, P.; DOIDGE, C. *Helicobacter pylori* vaccines spiral into the new millenium. **Dig Liver Dis**, 35(10): 675-687, 2003.

SZABO, S. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, 214: 201-202, 1981.

TAKAHASHI, M.; OTA, S.; HATA, Y. Hepatocyte growth factor as a key to modulate anti-ulcer action of prostaglandins in stomach. **J Clin Invest**, 98: 2604-2611, 1996.

TAKAHASHI, T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. **J Gastroenterol**, 38: 421-430, 2003.

TAKEUCHI, K.; OKADA, M.; NIIDA, H.; OKABE, S. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **J Pharmacol Exp Ther**, 248(2): 836-841, 1989.

TAKEUCHI, K.; URUKAWA, H.; FURUKAWA, S.; KAWAUCHI, H.; ARAKI, H.; SUGIMOTO, Y.; ISHIKAWA, A.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptor subtypes involved in stimulation of gastroduodenal bicarbonate secretion in rats and mice. **J Physiol Pharmacol**, 50(2): 155-167, 1999.

TOPLISS, J.G.; CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; JOHNSTON, G.A.R.; RIMOLDI, J.M.; WEIMANN, B.J. Natural and synthetic substances related to human health. **Pure Applied Chemistry**, 74(10): 1957-1985, 2002.

TORNHAMRE, S.; SCHMIDT, T.J.; NASMAN-GLASER, B.; ERICSSON, I.; LINDGREN, J.A. Inhibitory effects of helenalin and related compounds on 5-lipoxygenase and leucotriene C₄ synthase in human blood cells. **Biochem Pharmacol**, 62: 903-911, 2001.

VUYYURU, L.; SCHUBERT, M.L. Histamin, acting via H₃ receptors, inhibits somatostatin and stimulates acid secretion in isolated mouse stomach. **Gastroenterology**, 113: 1545-1552, 1997.

WAIGH, R.D. The chemistry behind atracurium. **Chem Britain**, 24: 1209-1212, 1988.

WARREN, J.R.; MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, 1273-1275, 1983.

XIE, Q.W.; CHO, H.J.; CALYCAJ, J.; MUMFORD, R.A.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, 256: 225-228, 1992.

10. Apêndices

Antiulcerogenic Activity of Crude Ethanol Extract and Some Fractions Obtained from Aerial Parts of *Artemisia annua* L.

Patrícia Corrêa Dias^{1,2*}, Mary Ann Foglio¹, Ana Possenti¹, Débora Christian Fachim Nozueira¹ and João Ernesto de Carvalho^{1,2}

¹Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6171 CEP 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil

²Departamento de Farmacologia/Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6111 CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil

The resulting enriched sesquiterpene lactone fraction and the crude ethanol extract of *Artemisia annua* L. aerial parts, showed antiulcerogenic activity when administered orally, on the indomethacin induced ulcer in rats. The sesquiterpene lactone fraction yielded three different polarity fractions on column chromatography as follows: non-polar, medium polarity and polar fraction. When submitted to the same indomethacin-induced ulcer in rats they resulted in different levels of inhibition of the ulcerative lesion index. The participation of nitric oxide was evaluated on an ethanol-induced ulcer model which had a previous administration of L-NAME, a NO-synthase inhibitor. Under these conditions, the medium polarity fraction maintained the antiulcerogenic activity, suggesting that nitric oxide could not be involved in the antiulcerogenic activity. When the animal groups were treated with N-ethylmaleimide, an alkylator of sulphhydryl groups, using the same experimental model, the medium polarity fraction maintained its antiulcerogenic activity, suggesting that the pharmacological mechanism is not related to non-protein sulphhydryl compounds. On the ethanol-induced ulcer with previous indomethacin treatment, the medium polarity fraction lost its antiulcerogenic activity indicating that the active compounds of *Artemisia annua* L. increase the prostaglandin levels in the gastric mucosa. This hypothesis was reinforced by an increase of adherent mucus production by the gastric mucosa, produced by the medium polarity fraction on the hypothermic restraint stress induced ulcer model. Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Artemisia annua*; antiulcer activity; medicinal plant.

Introduction

Artemisia annua L. has been used in Chinese folk medicine for many centuries to treat malaria. The plant's activity was attributed to artemisinin, a sesquiterpene lactone with an endoperoxide group (Klayman, 1985).

The crude plant extracts of *Artemisia douglasiana* L. significantly prevented the formation of gastric lesions induced by necrotizing agents. The sesquiterpene lactone, dehydroleucodine, present in the species is believed to be responsible for the cytoprotective effect observed. Two different pathways, an increase of prostaglandin levels and of non-protein sulphhydryl compounds in the gastric mucosa were shown to be involved in this protective mechanism (Guardia *et al.*, 1994).

With this information in mind we proposed to study the antiulcer activity of crude ethanol extract and purified fractions of *Artemisia annua* L.

Material and methods

Plant material. The aerial parts of *Artemisia annua* L.

* Correspondence to: Dr P. C. Dias, CPQBA-UNICAMP, Caixa Postal 6171 CEP 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil.
E-mail: patricia@cpqba.unicamp.br

were collected from the experimental fields of CPQBA/UNICAMP. A voucher specimen is deposited at CPQBA/UNICAMP under registration number 229. The plant material was allowed to dry under air circulation (40°C) and ground prior to use.

Preparation of crude ethanol extract. Dried ground plant material (500 g) was extracted with three portions of ethanol (700 mL). After filtration, the ethanol solution was evaporated at 40°C under vacuum, to give the crude ethanol extract.

Extraction and isolation of active fractions. Dried ground plant material (500 g) was extracted with three portions of ethanol (700 mL). The ethanol solution was evaporated and concentrated to a reduced volume (100 mL), which was added to a 10% solution of lead acetate. This mixture was stood at room temperature for 30 min and filtered. The filtrate was extracted with chloroform (3 × 30 mL), dried over MgSO₄ and evaporated to dryness to give the sesquiterpene lactone fraction (SLF), according to the method of Lonergan *et al.* (1992).

The sesquiterpene lactone fraction was purified by column chromatography over silica gel 60 (Merck 7734) using a hexane/ethyl acetate gradient into three fractions. The non-polar fraction (NP), medium polar fraction

(MPF) and polar fraction (PF) were submitted to gas chromatography and biological assays.

Chromatographic analysis. The GC/MS analysis was carried out using a HP-5890/5970 system equipped with a J&W Scientific DB-5 fused capillary column (25 m $\times$ 0.2 mm $\times$ 0.33 μ m). The temperature programme was 40°C (5°C/min)–300°C (10 min). The injector was equal to 250°C and the detector temperature was equal to 300°C. Helium was used as a carrier gas (0.7 bar, 1 mL/min). The MS were taken at 70 eV. The scanning speed was 0.84 scans/s from 40 to 550. The sample volume was 1 μ L.

Animals. Male Wistar rats weighing 200–300 g were fasted for 24 h before each experiment, and had free access to water. These animals were maintained under standard conditions of light (12 h light, 12 dark) and temperature (20°C), for at least 7 days before the experiments.

Indomethacin induced ulcer. The animals were divided in groups according to the respective treatment. After 30 min of oral treatment, indomethacin (30 mg/kg) was administered subcutaneously to all groups of animals. After 4 h, the animals were killed, their stomachs removed and opened along the greater curvature (Dias *et al.*, 2000). The ulcerative lesion index (ULI) of each animal was calculated by adding the following values, according to the method described by Gamberini *et al.* (1991).

Loss of normal morphology	1 point
Discoloration of mucosa	1 point
Mucosal edema	1 point
Haemorrhages	1 point
Petechial points (≤ 9)	2 points
Petechial points (> 10)	3 points
Ulcers (≤ 1 mm)	$n \times 2$ points
Ulcers (≥ 1 mm)	$n \times 3$ points
Perforated ulcers	$n \times 4$ points
*number of ulcers found	

Absolute ethanol induced ulcer. The animals were divided in groups according to the respective treatment. After 30 min of oral treatment, each animal received 1 mL of absolute ethanol orally, according to method described by Robert (1979). After a lapse of 1 h, the animals were killed and their stomachs removed and opened along the greater curvature. The ulcerative lesion index was determined by the method described by Gamberini *et al.* (1991).

Hypothermic restraint stress induced ulcers. The animals were divided in groups according to the respective treatment. After 30 min of oral treatment, the animal's front and hind paws were immobilized with tape and put into boxes. Afterwards they were introduced to a refrigerated room at 4°C for a period of 2 h. After 2 h, the animals were killed, their stomachs removed and opened along the greater curvature (Levine, 1971). The ulcerative lesion index of each animal was calculated, according to the method described by Gamberini *et al.* (1991).

Determination of the role of nitric oxide in the

cytoprotection afforded by *Artemisia annua* L. The animals were divided in groups according to the respective treatment. The control group received an intravenous injection of saline solution, and the others an injection of L-NAME (N ω -L-arginine methyl ester), by the same route, at a dose of 5 mg/kg. After 30 min, all animal groups received orally the respective treatment. After 1 h, the animals were orally administered 1 mL of absolute ethanol (Konturek *et al.*, 1995). These animals were killed 1 h later and their stomachs removed and opened along the greater curvature. The lesions were evaluated and the ulcerative index lesion (ULI) was calculated according to the method described by Gamberini *et al.* (1991).

Determination of the role of mucosa non-protein sulphhydryl (SH) compounds in the cytoprotection afforded by *Artemisia annua* L. The animals were divided in groups according to the respective treatment. The control group received a subcutaneous injection of saline solution, and the others an injection of NEM (N-ethylmaleimide), by the same route, at dose of 10 mg/kg. After 30 min, all the animal groups received, the respective treatment orally. After 1 h, the animals were orally administered 1 mL of absolute ethanol. These animals were killed after 1 h, their stomachs removed and opened along the greater curvature (Konturek *et al.*, 1995). The lesions were evaluated and the ulcerative index lesion was calculated according to the method described by Gamberini *et al.* (1991).

Determination of the role of prostaglandins in the cytoprotection afforded by *Artemisia annua* L. The animals were divided in groups according to the respective treatment. The control group received an intraperitoneal injection of saline solution, and the others an injection of indomethacin (5 mg/kg) by the same route. After 30 min, all animal groups received the respective treatment orally. After 1 h, the animals were orally administered 1 mL of absolute ethanol. These animals were killed 1 h later and their stomachs were removed and opened along the greater curvature (Konturek *et al.*, 1995). The lesions were evaluated and the ulcerative lesion index (ULI) was calculated according to the method described by Gamberini *et al.* (1991).

Quantitative determination of the adherent mucus thickness of the gastric mucosa. The animals were divided in groups according to the oral treatment employed. Thirty minutes after the oral treatment, all the groups were submitted to a hypothermic restraint stress induced ulcer model (Levine, 1971). The glandular segments from the stomachs which had been opened along the greater curvature were removed and weighed. Each segment was transferred immediately to 10 mL of 0.1% Alcian Blue solution (in 0.16M sucrose solution, buffered with 0.05M sodium acetate pH 5). After immersion for 2 h, excess dye was removed by two successive rinses with 10 mL of 0.25M of sucrose, first for 15 and then for 45 min. Dye complexed with the gastric wall mucus was extracted with 10 mL of 0.5M magnesium chloride by shaking intermittently for 1 min at 30 min intervals for 2 h. Four millilitres of blue extract was then shaken vigorously with an equal volume of diethyl ether. The resulting emulsion was centrifuged at 3600 rpm for 10 min and the absorbance of the aqueous

Table 1. Effect of oral administration of cimetidine and the crude ethanol extract (CEE), obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L., on indomethacin induced ulcer model

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline		6	51.0 $\pm$ 3.8	
Cimetidine	100	6	6.6 $\pm$ 1.4 ^a	88.8
CEE	500	6	24.2 $\pm$ 4.2 ^a	53.8

ANOVA $F_{(2,15)} = 43.48$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.001$.

layer was recorded at 580 nm, according to the modified method described by Corne *et al.* (1974). The quantity of Alcian Blue extracted per gram of wet glandular tissue was then calculated.

Statistical analysis. The results were expressed as mean $\pm$ SEM and the individual data were submitted to one-way variance analysis with critical range at $p \leq 0.05$ and afterwards to Duncan's test with the same critical range.

RESULTS

The CEE (500 mg/kg) inhibited the ulcerative lesion index by 53.8%, when administered orally to an indomethacin-induced ulcer model. The data are expressed in Table 1, as mean $\pm$ SEM.

Purification of CEE supplied an enriched sesquiterpene lactone fraction (SLF), that on the same experimental model inhibited the ulcerative lesion index by 86.1%. The data are expressed in Table 2, as mean $\pm$ SEM. The same dose of SLF was administered subcutaneously to an ethanol-induced ulcer model, presenting 59.8% ULI inhibition. The data are expressed in Table 3, as mean $\pm$ SEM.

The SLF was separated in to three fractions, NP, MPF and PF that when administered orally to an indomethacin-induced ulcer model, inhibited the ULI by 88.3%, 57.7% and 31.1%, respectively. The data are expressed in Table 4, as mean $\pm$ SEM. Analysis by CG/MS of the three fractions demonstrated that the sesquiterpene lactones were concentrated in the NP and MPF. Six different doses of the MPF were tested to evaluate the dose-response effect on an ethanol-induced ulcer model. Inhibition values of 98.0%, 98.4%, 93.1%, 88.7%, 27.9% and 34.4% of ULI were observed for doses of 500, 250, 125, 50, 25 and 10 mg/kg, respectively. The ED₅₀ value,

Table 2. Effect of oral administration of cimetidine and the sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF), obtained from the crude ethanol extract of aerial parts of *Artemisia annua* L., on indomethacin induced ulcer model

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline		6	43.2 $\pm$ 7.9	
Cimetidine	100	6	6.7 $\pm$ 1.6 ^a	84.5
SLF	500	6	6.0 $\pm$ 1.8 ^a	86.1

ANOVA $F_{(2,15)} = 19.07$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.001$.**Table 3.** Effect of subcutaneous administration of the carbenoxolone and the sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF), obtained from the crude ethanol extract of aerial parts of *Artemisia annua* L., on ethanol induced ulcer model

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline			43.8 $\pm$ 5.1	
Carbenoxolone	200	4	25.3 $\pm$ 4.7 ^a	42.2
SLF	500	5	17.6 $\pm$ 3.1 ^b	59.8

ANOVA $F_{(2,11)} = 10.19$, $p < 0.01$. Duncan's test: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$.**Table 4.** Effect of oral administration of cimetidine and the non-polar (NP), medium polarity (MPF) and polar (PF) fractions, obtained from sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF) of aerial parts of *Artemisia annua* L., on indomethacin induced ulcer model

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline		6	53.7 $\pm$ 7.7	
Cimetidine	100	6	6.3 $\pm$ 1.0 ^c	88.3
UF	500	5	6.4 $\pm$ 2.9 ^c	88.1
MPF	500	6	22.7 $\pm$ 6.2 ^b	57.7
PF	500	5	37.0 $\pm$ 14.4 ^a	31.1

ANOVA $F_{(4,23)} = 15.61$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$.

calculated by linear regression, was 45.91 mg/kg. The data are expressed in Table 5, as mean $\pm$ SEM.

The MPF on ethanol-induced ulcer, with previous L-NAME treatment maintained the antiulcerogenic activity, inhibiting the ULI by 87.1%. The data are expressed in Table 6, as mean $\pm$ SEM.

The MPF on ethanol induced ulcer, with previous N-ethylmaleimide treatment maintained the antiulcerogenic activity, inhibiting the ULI by 96.3%. The data are expressed in Table 7, as mean $\pm$ SEM.

In the ethanol induced ulcer model, with previous

Table 5. Effect of oral administration of MPF obtained from sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF) of aerial parts of *Artemisia annua* L., in six different dose levels on ethanol induced ulcer model

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline		10	49.4 $\pm$ 4.9	
Carbenoxolone	200	10	7.3 $\pm$ 2.6 ^c	85.2
MPF	500	4	1.0 $\pm$ 0.0 ^c	98.0
MPF	250	5	0.8 $\pm$ 0.5 ^c	98.4
MPF	125	5	3.4 $\pm$ 0.7 ^c	93.1
MPF	50	5	5.6 $\pm$ 2.6 ^c	88.7
MPF	25	5	35.6 $\pm$ 4.9 ^b	27.9
MPF	10	5	32.4 $\pm$ 3.8 ^c	34.4

ANOVA $F_{(7,41)} = 28.66$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$.

Table 6. Effect of oral administration of the medium polarity fraction (MPF), obtained from sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF) of aerial parts of *Artemisia annua* L., on absolute ethanol induced ulcer model, with previous administration of L-NAME

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline		4	32.5 $\pm$ 4.9	
MPF + L-NAME	100	6	4.2 $\pm$ 0.3 ^b	87.1
Saline + L-NAME		4	46.8 $\pm$ 3.7 ^a	

ANOVA $F_{(2,11)} = 41.32$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.01$; ^b $p < 0.001$.

Table 7. Effect of oral administration of the medium polarity fraction (MPF), obtained from sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF) of aerial parts of *Artemisia annua* L., on absolute ethanol induced ulcer model, with previous administration of N-ethylmaleimide

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline		5	33.0 $\pm$ 4.6	
MPF + NEM	100	5	5.4 $\pm$ 2.2 ^b	96.3
Saline + NEM		4	51.0 $\pm$ 7.7 ^a	

ANOVA $F_{(2,11)} = 21.62$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$.

Table 8. Effect of oral administration of the medium polarity fraction (MPF), obtained from sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF) of aerial parts of *Artemisia annua* L., on absolute ethanol induced ulcer model, with and without previous administration of indomethacin

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline		6	39.5 $\pm$ 10.0	
Saline + indomethacin		11	69.3 $\pm$ 6.2 ^a	
MPF	100	4	16.0 $\pm$ 6.2 ^a	59.4
MPF + indomethacin	100	5	46.0 $\pm$ 11.1	

ANOVA $F_{(3,22)} = 8.12$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.05$.

indomethacin administration, MPF lost its antiulcerogenic activity. Without indomethacin treatment, in the same experimental model, MPF inhibited the ULI by 59.4%. The data are expressed in Table 8, as mean $\pm$ SEM.

On the hypothermic restraint stress-induced ulcer model, oral administration of MPF inhibited the ULI by 29.4% and increased by 46.7% the production of gastric mucosa adherent mucus. The data are expressed in Tables 9 and 10, respectively, as mean $\pm$ SEM.

DISCUSSION

Artemisia annua L. crude ethanol extract reduced the ulcerative lesion index (ULI) on an indomethacin-induced ulcer model. The crude ethanol extract was purified with the intention of having an enriched fraction of sesquiterpene lactones, since previous work had indicated the presence of this chemical group (Foglio, 1996). The resulting fraction was more efficient in

decreasing the ULI when administered under the same conditions as the CEE. The sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF) was partitioned on a chromatographic filtration column containing silica gel as the stationary phase. This column was eluted with a gradient system of hexane/ethyl acetate resulting in three

Table 9. Effect of oral administration of the carbenoxolone and the medium polarity fraction (MPF), obtained from sesquiterpene lactone enriched fraction of aerial parts of *Artemisia annua* L., on hypothermic restraint stress induced ulcer model

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI inhibition (%)
Saline		6	22.8 $\pm$ 1.9	
Carbenoxolone	200	6	10.0 $\pm$ 2.5 ^b	56.1
MPF	100	6	16.1 $\pm$ 1.9 ^a	29.4

ANOVA $F_{(2,17)} = 6.42$, $p < 0.01$. Duncan's test: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$.

Table 10. Effect of the oral administration of the carbenoxolone and the medium polarity fraction (MPF), obtained from sesquiterpene lactone enriched fraction (SLF) of the aerial parts of *Artemisia annua* L., on gastric mucosa adherent mucus production

Treatment	Dose (mg/kg)	n	Mucus (μ g Alcian Blue/g wet tissue)	Mucus increase (%)
Saline		5	370.0 $\pm$ 16.0	
Carbenoxolone	200	4	581.8 $\pm$ 61.0 ^a	57.2
MPF	100	6	542.8 $\pm$ 48.0 ^a	46.7

ANOVA $F_{(2,12)} = 5.19$, $p < 0.05$. Duncan's test: ^a $p < 0.05$.

fractions, labelled as non-polar (NF), medium polar (MPF) and polar (PF). When these fractions were administered orally in the indomethacin-induced ulcer, the NF and MPF were more efficient in reducing ULI. Since the amount of MPF available was more abundant than NF, and since the gas chromatography profiles were very similar, MPF was chosen to evaluate the dose-response effect on the ethanol induced ulcer model, as well as to determine the pharmacological mechanism.

The SLF fraction was administered subcutaneously (500 mg/kg) to an ethanol-induced ulcer model prior to the determination of the pharmacological mechanism. Under these conditions an ULI inhibition of 59.8% was observed. This result proves that the active compounds do not act by a local and unspecific mechanism termed adaptative cytoprotection. This takes place as a result of the capacity that some compounds have in inducing prostaglandin production that is fundamental for cytoprotection. On the ethanol induced ulcer model, some studies have shown that previous treatment with mild irritants of the gastric mucosa, protects the mucosa against damage by this substance (Robert *et al.*, 1983). The fact that SLF presented antiulcerogenic activity when administered subcutaneously reinforces the hypothesis that antiulcerogenic substances from *Artemisia annua* act throughout a specific systemic mechanism.

Nitric oxide is an endogenous substance that enhances the mechanisms of cytoprotection of the mucosa by increasing the mucosal blood flow and inhibiting the release of oxygenated metabolites and proteases from leukocytes under gastric microcirculation. Nitric oxide also modulates the secretion of some cellular growth factors, mainly the epidermal growth factor (Elliot *et al.*, 1995). The participation of nitric oxide was evaluated in the ethanol-induced ulcer model which had been

previously administered of L-NAME, a NO-synthase inhibitor. Under these conditions, MPF maintained the antiulcerogenic activity, suggesting that nitric oxide could not be involved in the antiulcerogenic activity.

Non-protein sulphhydryl compounds of the gastric mucosa, represented basically by reduced glutathione, also participate in mucosal defence by mechanisms that are not yet clear. These substances seem to inhibit the action of free-radicals on the gastric mucosa (Szabo, 1981) or to avoid the increase of microvessel permeability on ulcers induced by ethanol (Takeuchi *et al.*, 1989). To verify the involvement of sulphhydryl groups in cytoprotection, the ethanol-induced ulcer model, previously treated with N-ethylmaleimide, a known alkylator of sulphhydryl groups, was employed. Under these conditions, the antiulcerogenic activity was maintained, suggesting that the MPF does not interfere with non-protein sulphhydryl compounds.

Prostaglandins protect the gastric mucosa through many mechanisms, such as a decrease of acid secretion; bicarbonate and mucus production; and increasing the mucosa blood flow (Felix *et al.*, 1986). On the ethanol-induced ulcer with and without previous treatment with indomethacin, a drug that inhibits the cyclooxygenase, an enzyme involved in prostaglandin synthesis, the MPF lost its antiulcerogenic activity indicating that the active compounds increase prostaglandin levels in the gastric mucosa. This hypothesis was reinforced by the increase of adherent mucus on the gastric mucosa produced by MPF on hypothermic restraint stress induced ulcer model. Since the mucus synthesis is promoted by the active compounds of the MPF, they could be acting by inhibition of the prostaglandin degradation enzyme, in the same way as carbenoxolone (Lewis and Hanson, 1991) or by stimulating synthesis of these autacoids.

REFERENCES

- Corne, S. J., Morrissey, S. M., and Woods, R. J. (1974). A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J. Physiol.* **242**, 116-117.
- Dias, P. C., Foglio, M. A., Possenti, A., and Carvalho, J. E. (2000). Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Ethnopharmacol.* **69**, 57-62.
- Elliot, S. N., McKnight, W., Cirino, G., and Wallace, J. L. (1995). A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* **109**, 524-530.
- Felix, W. L., Miller, J. C., and Guth, P. H. (1986). Dissociated effects of misoprostol on gastric acid secretion and mucosal blood flow. *Dig. Dis. Sci.* **31** (2), Suppl: 86S-90S.
- Foglio, M. A. (1996). *Doctor Thesis*. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Gamberini, M. T., Skorupa, L. A., Souccar, C., and Lapa, A. J. (1991). Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **86**, Suppl. II: 137-139.
- Guardia, T., Guzman, J. A., Pestchanker, M. J., Guerreiro, E., and Giordano, O. S. (1994). Mucus synthesis and sulphhydryl groups in cytoprotection mediated by dehydro-

- leucodine, a sesquiterpene lactone. *J. Nat. Prod.* **57**, 507–509.
- Klayman, D. L. (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **228**, 1049–1055.
- Konturek, S. J., Brozowosky, T., Pytko-Polonczyk, J., and Drozdowicz, D. (1995). Comparison of cholecystokinin, pentagastrin and duodenal oleate in gastroprotection in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* **30**, 620–630.
- Levine, R. J. (1971). A method for rapid production of stress ulcers in rats. In *Peptic ulcer*, Pfeiffer, C. J. (ed.). Munksgaard: Copenhagen, 92–97.
- Lewis, D. A., and Hanson, P. J. (1991). Anti-ulcer drugs of plant origin. In *Progress in Medicinal Chemistry* (28), Ellis, G. P., West, G. B. (eds). Elsevier Science Publishers, London, UK: B.V., 201–231.
- Lonergan, G., Routsis, E., Georgiadis, T., et al. (1992). Isolation and NMR studies in biological activities of onopordopicroline from *Centaurea sonchifolia*. *J. Nat. Prod.* **55**, 225–228.
- Robert, A. (1979). Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* **77**, 761–767.
- Robert, A., Nezamis, J. E., Lancaster, C., Davis, J. P., Field, S. O., and Hancher, A. J. (1983). Mild irritants prevent gastric necrosis through 'adaptive cytoprotection' mediated by prostaglandins. *Am. J. Physiol.* **24**, G113–G121.
- Szabo, S. (1981). Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* **214**, 201–202.
- Takeuchi, K., Okada, M., Niida, H., and Okabe, S. (1989). Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. *T. J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**, 836–841.

Mary Ann Foglio¹
Patrícia Corrêa Dias^{1,2}
Marcia Aparecida Antônio^{1,2}
Ana Possenti¹
Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues¹
Érica Ferreira da Silva¹
Vera Lúcia García Rehder¹
João Ernesto de Carvalho^{1,2}

Antiulcerogenic Activity of Some Sesquiterpene Lactones Isolated from *Artemisia annua*

Abstract

Artemisinin 1, dihydro-epideoxyarteannuin B 2 and deoxyartemisinin 3 were isolated from the sesquiterpene lactone-enriched fraction obtained from the crude ethanolic extract of *Artemisia annua* L. These compounds were tested on ethanol and indomethacin-induced ulcer models. Compound 1 did not afford cytoprotection under the experimental models tested. Only compounds 2 and 3 decreased the ulcerative lesion index produced

by ethanol and indomethacin in rats. These compounds did not demonstrate antiulcerogenic activity when tested on the ethanol-induced ulcer model, with previous administration of indomethacin, suggesting that the antiulcerogenic activity is a consequence of prostaglandin synthesis increase.

Key words

Artemisia annua · Asteraceae · antiulcer activity · sesquiterpenes

Introduction

Artemisia annua L. (Asteraceae) has received much attention due to the antimalarial activity of artemisinin 1 (Fig. 1), a sesquiterpene lactone with an endoperoxide group [1]. Sesquiterpene lactones are common in most tribes of Asteraceae, with more than 4000 known structures. A diversity of bioactivities has been reported for this class of compounds, such as anti-inflammatory, antitumor, antiulcerogenic, cytotoxic, diuretic and cardiotonic, among others [2]. The genus *Artemisia* is widely known for its sesquiterpene lactone contents which have been mentioned as cytoprotective agents against the development of peptic ulcers [3]. The antiulcerogenic activity of many sesquiterpene lactones has been attributed to their α -methylene- γ -lactone moiety (3). The guaianolide dehydroleucodine isolated from *Artemisia douglasiana* Besser (Asteraceae) demonstrated cytoprotective activity by two different pathways, involvement of SH-compounds as well as the mucus synthesis [4].

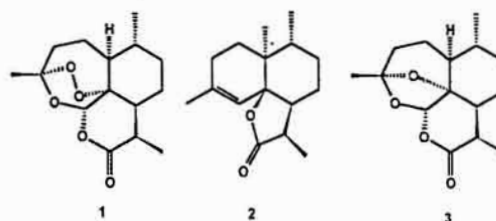


Fig. 1 Artemisinin 1, dihydro-epideoxyarteannuin B 2 and deoxyartemisinin 3.

The present study was undertaken to evaluate the antiulcerogenic activity and to determine the probable pharmacological mechanism of three sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua* L.

¹ Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Correspondence

Dr. Mary Ann Foglio · Caixa Postal 6171 · CEP 13081-970 Campinas · São Paulo · Brazil · Phone: +(005519) 3884-7500 · Fax: -(005519) 3884-7811 · E-Mail: foglioma@cpqba.unicamp.br

Received August 24, 2001 · Accepted March 23, 2002

Bibliography

Planta Med 2002; 68: 515–518 · © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

Materials and Methods

Plant material and fractionation

Artemisia annua L. leaves (hybrid CPQBA 2/39 x PL5) were collected from the experimental field of CPQBA/UNICAMP. Voucher specimen is deposited at CPQBA/UNICAMP under registration number 229. This material was allowed to dry under air circulation (40 °C) and ground for use. The resulting powder (500 g) was submitted to dynamic maceration with ethanol during 4 hours (this procedure was repeated three times). Concentration of the extracts under reduced pressure gave 108 g of crude ethanolic extract (22% yield).

A 10% lead acetate solution (1 L) was added to the crude ethanolic extract (108 g) dissolved in ethanol (100 mL). This mixture was allowed to stand at room temperature for 30 minutes and filtered. The filtrate was extracted with chloroform (3 × 350 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and dried under vacuum affording the sesquiterpene lactone enriched fraction (10 g–9.3% yield) [5].

The sesquiterpene enriched fraction (10 g) was purified on successive column chromatography using silica gel (Merck 7734) (5 × 60 cm) with hexane/ethyl acetate (99:1), R_f 2: 0.65 between 500–950 mL, [α_D^{20}]: +49.96° (c 0.025 g/mL, $CHCl_3$); hexane/ethyl acetate (99:2), R_f 3: 0.61 between 1000–1700 mL, [hexane/ethyl acetate (99:3), [α_D^{20}]: -149.8° c 0.045 g/mL, $CHCl_3$]; R_f 1: 0.57 between 1750–2550 mL, [α_D^{20}]: +80.93° (c 0.025 g/mL, $CHCl_3$).

Fractions were monitored by thin layer chromatography, eluent hexane/dichloromethane/methanol (20:79:1), detection anisaldehyde reagent. The physical and spectral data (mass, 1H -NMR, ^{13}C -NMR) of compounds 1–3 were consistent with those of artemisinin [6], deoxyartemisinin [6] and dihydro-epideoxyartemisinin B [7].

Chromatographic analysis

The GC/MS analysis was carried out using a HP-5890/5970 system equipped with a J&W Scientific DB-5 fused capillary column (25 m × 0.2 mm × 0.33 μ m). Temperature program was 40 °C (5 °C/min) – 300 °C (10 min). Injector 250 °C, detector 300 °C. Helium was used as carrier gas (0.7 bar, 1 mL/min). The MS were taken at 70 eV. Scanning speed was 0.84 scans/s from 40 to 550. Sample volume was 1 μ L. Split: 1:40.

Animals

Male Wistar rats (200–300 g), purchased from Animal Experimental Care Center of Campinas State University, were employed in all pharmacological experiments. These animals were maintained under standard conditions of light cycle (12 hours light, 12 dark) and temperature (23 ± 2 °C), for at least 7 days before the experiments. Animal's welfare guidelines were adopted during maintenance period and experimentation [8], [9].

Indomethacin-induced ulcer

Male Wistar rats (200–250 g), fasted for 24 hours, with free access to water, were divided in at least three groups, containing 4–7 animals, according to the respective treatment employed.

After 30 minutes of oral treatment, indomethacin (30 mg/kg) was administrated subcutaneously to all groups. After four

hours, the animals were sacrificed, their stomachs were removed, and opened along the greater curvature [10]. The ulcerative lesion index of each animal was calculated by adding the following values [11]:

Loss of normal morphology	1 point
Discoloration of mucosa	1 point
Mucosal edema	1 point
Hemorrhages	1 point
Petechial points (until 9)	2 points
Petechial points (more than 10)	3 points
Ulcers up to 1 mm	number of ulcers × 2 points
Ulcers greater than 1 mm	number of ulcers × 3 points
Perforated ulcers	number of ulcers × 4 points

Ethanol-induced ulcer

Male Wistar rats (200–250 g), fasted for 24 hours, with free access to water, were divided in groups of 5–6 animals, according to the respective treatment employed.

After 30 minutes of oral treatment with saline, carbenoxolone, and compounds 1–3, each animal received, 1 mL of absolute ethanol orally. After one hour, the animals were sacrificed and their stomachs were removed and opened along the greater curvature [12]. Ulcers were evaluated as above [11].

Determination of the role of prostaglandins in cytoprotection

The animals were divided in groups of 3–5 animals, according to the respective treatment. The control group received an intraperitoneal injection of saline solution, and the others an injection of indomethacin (5 mg/kg). After thirty minutes, all animal groups received the respective treatment orally. After one hour, the animals were orally administrated with 1 mL of absolute ethanol. These animals were sacrificed one hour later and their stomachs were removed, and opened along the greater curvature [13]. Ulcers were evaluated as above [11].

Statistical analysis

The results were expressed as mean ± SEM and the individual data were submitted to one way variance analysis with critical range at $p < 0.05$ and afterwards to Duncan's test with the same critical range.

Results and Discussion

Previously we demonstrated that the resulting enriched sesquiterpene fraction from *Artemisia annua* L. crude ethanolic extract inhibited the ulcerative lesion index in all experimental models tested, in rats. The results mentioned therein suggested that the antiulcerogenic properties were afforded by cytoprotective mechanisms as result of active principles that increase the gastric mucosa prostaglandin level [14]. Prostaglandins released in the stomach protect the gastric mucosa by acid secretion decrease, mucosa blood flow, bicarbonate, and mucus production increase [15].

In previous work we determined that the enriched sesquiterpene fraction had ulcer inhibition maximized at dose levels between 50 and 125 mg/kg [14]. Therefore, a dose of 100 mg/kg for compounds 1–3 would ensure an effect if the antiulcer activity re-

Table 1 Effect of oral administration of cimetidine, compound 1 and compound 2 on indomethacin induced ulcer model and effect of oral administration of carbenoxolone and compound 1, on ethanol induced ulcer model

Treatment	Dose (mg/kg)	n	Ulcer Model	ULI inhibition (%)	ULI (mean $\pm$ SEM)	
					Negative Control	Test Group
Cimetidine ^A	100	5	Indomethacin	92.7	52.4 $\pm$ 5.3	3.8 $\pm$ 0.5 ^b
Compound 1 ^A	100	7	Indomethacin	21.0	52.4 $\pm$ 5.3	41.4 $\pm$ 8.4
Carbenoxolone ^B	100	6	Ethanol	66.8	38.3 $\pm$ 6.2	12.7 $\pm$ 3.5 ^a
Compound 1 ^B	100	6	Ethanol	—	38.3 $\pm$ 6.2	50.2 $\pm$ 4.1
Cimetidine ^C	100	4	Indomethacin	92.2	38.3 $\pm$ 6.2	3.0 $\pm$ 0.6 ^a
Compound 2 ^C	200	6	Indomethacin	62.7	38.3 $\pm$ 6.2	14.3 $\pm$ 3.1 ^a

^A ANOVA $F_{(2,16)} = 14.04$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^b $p < 0.001$.

^B ANOVA $F_{(2,15)} = 16.51$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.01$.

^C ANOVA $F_{(2,13)} = 15.04$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.01$.

Table 2 Effect of oral administration of carbenoxolone (100 mg/kg), compound 2 and compound 3, in different doses, on ethanol induced ulcer model

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI inhibition (%)	ULI (mean $\pm$ SEM)	
				Negative Control	Test Group
Carbenoxolone ^A	100	5	76.9	49.4 $\pm$ 4.9	11.4 $\pm$ 4.7 ^c
Compound 2 ^A	10	5	34.4	49.4 $\pm$ 4.9	32.4 $\pm$ 3.8 ^a
Compound 2 ^A	25	5	27.9	49.4 $\pm$ 4.9	35.6 $\pm$ 4.9 ^a
Compound 2 ^A	50	5	88.7	49.4 $\pm$ 4.9	5.6 $\pm$ 2.6 ^c
Compound 2 ^A	125	5	93.1	49.4 $\pm$ 4.9	3.4 $\pm$ 0.7 ^c
Compound 2 ^A	250	5	98.4	49.4 $\pm$ 4.9	0.8 $\pm$ 0.5 ^c
Carbenoxolone ^B	100	5	92.3	59.7 $\pm$ 7.7	4.6 $\pm$ 1.2 ^c
Compound 3 ^B	200	5	76.5	59.7 $\pm$ 7.7	14.0 $\pm$ 4.3 ^c
Compound 3 ^B	100	5	74.0	59.7 $\pm$ 7.7	15.5 $\pm$ 2.8 ^c
Compound 3 ^B	50	5	49.7	59.7 $\pm$ 7.7	30.0 $\pm$ 8.3 ^b

^A ANOVA $F_{(4,20)} = 23.29$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^a $p < 0.05$; ^c $p < 0.001$.

^B ANOVA $F_{(4,20)} = 14.11$, $p < 0.001$. Duncan's test: ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$.

sults from one of the mentioned compounds, since they were obtained by chromatographic purification of the enriched sesquiterpene lactone fraction. Further bioassays were undertaken to evaluate the cytoprotective activity of these substances. On indomethacin and ethanol-induced ulcer model the, artemisinin 1 (100 mg/kg), did not inhibit the ulcerative lesion index, when administrated orally (Table 1). When evaluated on the ethanol-induced model, artemisinin 1 (100 mg/kg) slightly increased the ulcerative lesion index. This can probably be explained due to the endoperoxide group present in the molecule which generates active oxygen species, one of the major causes for microcirculatory disturbance [16]. Otherwise compounds 2 and 3 inhibited the ulcerative lesion index on both experimental ulcer models. Dihydro-epideoxyarteannuin B 2 administrated orally (100 mg/kg) on the indomethacin ulcer model, inhibited the ulcerative lesion index by 62.7% (Table 1). On the ethanol ulcer model, compound 2, presented dose-dependent inhibition of the ulcerative lesion index, with an ED₅₀ value of 55.6 mg/kg (Table 2). Analogously, deoxyartemisinin 3 afforded an ED₅₀ value of 87.5 mg/kg (Table 2).

The dose-response evaluation on the ethanol-induced ulcer model demonstrated that compound 2 was more potent than

compound 3. This is the first mention of a pharmacological activity for dihydro-epideoxyarteannuin B 2 since it was first isolated and identified [7].

The previous treatment with indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, blocked the antiulcerogenic activity of compounds 2

Table 3 Effect of oral administration of compound 2 and compound 3, on ethanol induced ulcer model, with previous administration of indomethacin

Treatment	Dose (mg/kg)	n	ULI (mean $\pm$ SEM)	ULI Inhibition (%)
Saline		5	43.6 $\pm$ 5.6	
Carbenoxolone	100	3	7.0 $\pm$ 3.1 ^c	83.9
Saline + indomethacin		5	69.6 $\pm$ 3.0 ^a	—
Compound 2 + indomethacin	50	5	52.2 $\pm$ 5.8	—
Compound 3 + indomethacin	100	5	49.8 $\pm$ 6.0	—

ANOVA $F_{(4,2)} = 15.04$, $p < 0.01$. Duncan's test: ^a $p < 0.01$; ^b $p < 0.001$.

and 3 on ethanol ulcer model. (Table 3). These results suggest that the antiulcerogenic activity of compounds 2 and 3 have a straight relationship with an increase of prostaglandin synthesis [14].

References

- Acton N, Klayman BL. Artemisinin, a new sesquiterpene lactone endoperoxide from *Artemisia annua*. *Planta Medica* 1985; 47: 442–5
- Marles RJ, Pazos-Sanou L, Compadre CM, Pezzuto JM, Bloszyk E, Arnason JT. Sesquiterpene lactones revisited, 13. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. In: Arnason JT, Mota R, Romero JT, editors. New York: Plenum Press, 1995: 333–56
- Giordano OS, Guerreiro E, Pestchanker MJ, Guzman J, Pastor D, Guardia T. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *Journal of Natural Products* 1990; 53: 803–9
- Guardia T, Guzman JA, Pestchanker MJ, Guerreiro E, Giordano OS. Mucus synthesis and sulfhydryl groups in cytoprotection mediated by dehydroleucodione, a sesquiterpene lactone. *Journal of Natural Products* 1994; 57: 507–9
- Loneragan G, Routsi E, Georgiadis T, Agelis G, Hondrelis J, Matsoukas J, Larsen LK, Caplan FR. Isolation and NMR studies in biological activities of onopordopicrine from *Centaurea sonchifolia*. *Journal of Natural Products* 1992; 55: 225–8
- Roth RJ, Acton N. The isolation of sesquiterpenes from *Artemisia annua*. *Journal of Chemical Education* 1989; 66: 349–50
- Brown GD. Two new compounds from *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products* 1992; 55: 156–76
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1996. NIH Publication n° 82–23 revised
- International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS). Geneva: 1985
- Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Takayuki S. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Japanese Journal of Pharmacology* 1991; 57: 495–505
- Gamberini MT, Skorupa LA, Souccar C, Lapa AJ. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1991 Supplement II; 86: 137–9
- Robert A. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 1979; 77: 761–7
- Konturek SJ, Brozozowski T, Pytko-Polonczyk J, Drozdowicz D. Comparison of cholecystokinin, pentagastrin and duodenal oleate in gastroprotection in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1995; 30: 620–30
- Dias PC, Foglio MA, Possenti A, Nogueira DCF, Carvalho JE. Antiulcerogenic activity of crude ethanolic extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Phytotherapy Research* 2001; 15: 670–5
- Felix WL, Miller JC, Guth PH. Dissociated effects of misoprostol on gastric acid secretion and mucosal blood flow. *Digestive Diseases and Sciences* 1986 (Supplement Feb); 31 (2): 865–90S
- Yoshida M, Kitahara T, Wakabayashi G, Hirokazu T, Ono H, Otani Y, Shimazu M, Kubota T, Kumai K, Kitajima M. Active oxygen species in formation of acute gastric mucosal lesions induced by thermal injury in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 1995; 40: 1306–10