

APARECIDA ÉRICA BIGHETTI

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA, ISOLAMENTO
E IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DA
Mikania laevigata Schultz. Bip.**

**CAMPINAS
2004**

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

APARECIDA ÉRICA BIGHETTI

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA, ISOLAMENTO
E IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DA
Mikania laevigata Schultz. Bip.**

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 Clínica Médica
na Área de Ciências Básicas.

Orientação
Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
CPQBA / UNICAMP

**CAMPINAS
2004**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	B484a
V	EX
TOMBO BC	64167
PROC.	16-00066-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	10/06/03
Nº CPD	0022351554

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

B484a Bighetti, Aparecida Érica
 Atividade antulcerogênica, isolamento e identificação dos
 princípios ativos da *Mikania laevigata* Schultz.Bip. / Aparecida Érica
 Bighetti. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : João Ernesto de Carvalho
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

1. Plantas medicinais. 2. Úlceras gástricas. I. João Ernesto de
 Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.

SLP

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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

Carvalho

Membros:

1. Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho

Carvalho

2. Profa. Dra. Iara Lucia Tescarolo Dias

Tescarolo

3. Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Mary Ann Foglio

4. Profa. Dra. Cláudia Steckelberg

Steckelberg

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

Data: 02/07/2004

ÍNDICE

1. Resumo.....	07
2. Abstract.....	10
3. Introdução.....	13
4. Revisão Bibliográfica.....	17
5. Objetivos.....	31
6. Material e Métodos.....	39
7. Resultados.....	62
8. Discussão.....	114
9. Conclusão.....	130
10. Referências Bibliográficas.....	133

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1: Exemplar de <i>Mikania laevigata</i> cultivada ao sol no CPQBA/UNICAMP	16
2. Figura 2: Exsicata de <i>M. laevigata</i>	35
3. Figura 3: CCD do EB e EBm	64
4. Figura 4: Análise por CG/EM do EB e do EBm	65
5. Figura 5: Espectro de massas do composto com tempo de retenção 11,46 mim, diidrocumarina (M^+ 148)	66
6. Figura 6: Espectro de massas do composto com tempo de retenção 12,87mim	66
7. Figura 7: Espectro de massas do ácido cupressênico metilado t_R = 29,18mim	67
8. Figura 8: Espectro de massas do ácido caurenóico metilado t_R = 31,27mim	67
9. Figura 9: Cromatograma obtido da fração isenta de cumarina (FIC) de <i>M. laevigata</i>	69
10. Figura 10: Cromatograma obtido da fração rica de cumarina (FRC) de <i>M. laevigata</i>	70
11. Figura 11: Cromatograma da FRA metilada	71
12. Figura 12: CCD-NP dos ácidos caurenóico e cupressênico	72
13. Figura 13: Cromatograma do ácido caurenóico metilado	73

14. Figura 14: Cromatograma do ácido cupressênico metilado	73
15. Figura 15: Cromatograma da fração MLCS3 metilada enriquecida em ácidos e ésteres diterpênicos	74
16. Figura 16: Espectro de massas do éster diterpênico metilado com MM = 402	75
17. Figura 17: Espectro de massas do éster diterpênico metilado com MM = 416	75
18. Figura 18: Cromatograma da FRE, contendo os ésteres diterpênicos de MM = 388/402 e 402/416 metilados	76
19. Figura 19: Espectro de massas do ácido grandiflórico metilado com MM = 332	76
20. Figura 20: Perfil por CCD da purificação da FRE por coluna <i>flash</i> (Hexano:AcOEt 70:30)	77
21. Figura 21: Análise por CCD do EBA, FA e FO	79
22. Figura 22: Cromatografia da FO	80
23. Figura 23: Efeito da administração oral das frações: rica em cumarina (FRC) e isenta da cumarina (FIC) da <i>Mikania laevigata</i> e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	81
24. Figura 24: Efeito da administração oral das frações: rica em cumarina (FRC) e isenta da cumarina (FIC) da <i>Mikania laevigata</i> e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol	83

25. Figura 25: Efeito da administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	85
26. Figura 26: Efeito da administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> e da atropina, em modelo de úlcera induzida por reserpina	87
27. Figura 27: Efeito da administração oral do EB e da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> e da atropina, em modelo de transito intestinal	93
28. Figura 28: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	95
29. Figura 29: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol	96
30. Figura 30: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> , após tratamento prévio com L-Name, em modelo de úlcera induzida por etanol	99
31. Figura 31: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> , após tratamento prévio com indometacina, em modelo de úlcera induzida por etanol	101

32. Figura 32: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> , após tratamento prévio com NEM, em modelo de úlcera induzida por etanol	103
33. Figura 33: Efeito da administração oral de EBA de <i>Mikania laevigata</i> e de cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	105
34. Figura 34: Efeito da administração oral de EBA de <i>Mikania laevigata</i> e de carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol	106
35. Figura 35: Efeito da administração oral da FA e FO obtidas do EBH de <i>Mikania laevigata</i> e de cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	108
36. Figura 36: Efeito da administração oral da FA e FO obtidas do EBH de <i>Mikania laevigata</i> e de carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol	109
37. Figura 37: Curva concentração resposta da atividade antiprolifetativa de EBH de <i>Mikania laevigata</i> Schult Bip. sobre o crescimento de linhagens celulares tumorais humanas, após 48h de exposição.	111
38. Figura 38: Curva concentração resposta da atividade antiprolifetativa de FRA de <i>Mikania laevigata</i> Schult Bip. Sobre o crescimento de linhagens celulares tumorais humanas, após 48h de exposição	111
39. Figura 39: Curva concentração resposta da atividade antiprolifetativa de FRE de <i>Mikania laevigata</i> Schult Bip. Sobre o crescimento de linhagens celulares tumorais humanas, após 48h de exposição	112

40. Figura 40: Curva concentração resposta da atividade citotóxica de EB de <i>Mikania laevigata</i> Schult Bip. sobre o crescimento de linhagens celulares normais (fibroblastos), após 48h de exposição	112
41. Figura 41: Curva concentração resposta da atividade citotóxica de FRA de <i>Mikania laevigata</i> Schult Bip. sobre o crescimento de linhagens celulares normais (fibroblastos), após 48h de exposição	113
42. Figura 42: Curva concentração resposta da atividade citotóxica de FRE de <i>Mikania laevigata</i> Schult Bip. sobre o crescimento de linhagens celulares normais (fibroblastos), após 48h de exposição	113

LISTA DE FLUXOGRAMAS

1. Fluxograma 1: Obtenção do extrato bruto hidro-alcoólico de <i>M. laevigata</i>	37
2. Fluxograma 2: Obtenção da fração rica em cumarina (FRC) e da fração isenta de cumarina (FIC)	39
3. Fluxograma 3: Obtenção da fração rica em ácidos diterpênicos (FRA) e fração rica em ésteres diterpênicos (FRE)	42
4. Fluxograma 4: Obtenção dos ácidos caurenóico e cupressênico	44
5. Fluxograma 5: Obtenção do EBA e suas frações	47

LISTA DE TABELAS

1. Tabela 1: Efeito da administração oral da FRC e da FIC da <i>Mikania laevigata</i> e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	82
2. Tabela 2: Efeito da administração oral da FRC e da FIC da <i>Mikania laevigata</i> e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol	83
3. Tabela 3: Efeito da administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	85
4. Tabela 4: Curva dose-efeito da administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	86
5. Tabela 5: Efeito da administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> e da atropina, em modelo de úlcera induzida por reserpina	88
6. Tabela 6: Efeito da administração intraduodenal da cumarina em modelo da ligadura do piloro de ratos	89
7. Tabela 7: Efeito da administração intraduodenal da cumarina em modelo da ligadura do piloro em ratos tratados previamente com histamina	90
8. Tabela 8: Efeito da administração intraduodenal da cumarina em modelo da ligadura do piloro em ratos tratados previamente com pentagastrina	91
9. Tabela 9: Efeito da administração intraduodenal da cumarina em modelo da ligadura do piloro em ratos tratados previamente com betanecol	92

10. Tabela 10: Efeito da administração oral do EB e da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> e da atropina, em modelo de transito intestinal	94
11. Tabela 11: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	95
12. Tabela 12: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol	97
13. Tabela 13: Atividade antiulcerogênica da fração FRA obtida do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> , em modelo de úlcera induzida por etanol	98
14. Tabela 14: Atividade antiulcerogênica da fração FRE obtida do EB das folhas secas e moídas da <i>Mikania laevigata</i> , em modelo de úlcera induzida por etanol	98
15. Tabela 15: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> , após tratamento prévio com L-Name, em modelo de úlcera induzida por etanol	100
16. Tabela 16: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> , após tratamento prévio com indometacina, em modelo de úlcera induzida por etanol	102

17. Tabela 17: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de <i>Mikania laevigata</i> , após tratamento prévio com NEM, em modelo de úlcera induzida por etanol	104
18. Tabela 18: Efeito da administração oral de EBA de <i>Mikania laevigata</i> e de cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	105
19. Tabela 19: Efeito da administração oral de EBA de <i>Mikania laevigata</i> e de carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol	107
20. Tabela 20: Efeito da administração oral da FA e FO obtidas do EBH de <i>Mikania laevigata</i> e de cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina	108
21. Tabela 21: Efeito da administração oral da FA e FO obtidas do EBH de <i>Mikania laevigata</i> e de carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol	110

LISTA DE QUADROS

1. Quadro 1: Principais substâncias do EBm de <i>Mikania laevigata</i> identificadas por CG-EM	68
--	----

A Deus pelo dom da vida e por me
iluminar a cada instante.

Aos meus pais, Márcia e Clóvis, que proporcionaram
a minha chegada até mais esta etapa e que
estão ao meu lado em todos os momentos.
AMO VOCÊS!

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho,
Pela amizade conquistada ao longo destes anos e
muito mais pelo profissionalismo
demonstrado. A você mestre, todo
meu carinho e admiração!

“Oh! Imensa é a graça poderosa que reside nas ervas e em suas raras qualidades, porque na terra não existe nada tão vil que não preste à terra algum benefício especial... Dentro do cálice da débil flor residem o veneno e o poder medicinal.”

(William Shakespeare, Romeu e Julieta)

“Veja.....
Não diga que a canção está perdida.....
Tenha em fé em Deus, tenha fé na vida.....
Tente outra vez.....
Beba.....
Pois a água viva ainda está na fonte.....
Você tem dois pés para cruzar a ponte.....
Nada acabou, não não não não.....
Tente.....
Levante sua mão sedenta e recomece a andar.....
Não pense que a cabeça agüenta se você parar, não não não não.....
Há uma voz que canta, uma voz que dança, uma voz que gira.....
Bailando no ar.....
Queira.....
Basta ser sincero e desejar profundo.....
Você será capaz de sacudir o mundo, vai.....
Tente outra vez.....
Tente.....
E não diga que a vitória está perdida.....
Se é de batalhas que se vive a vida.....
Tente outra vez.....”

RAUL SEIXAS

Agradecimentos Especiais

A Dra. Vera L. G. Rehder, pela orientação no processo de isolamento e identificação das frações e princípios ativos e pela amizade, apoio e dedicação.

A Dra. Mary Ann Foglio pelo carinho, compreensão e palavras de conforto e estímulo.

A Dra. Márcia Aparecida Antônio, pela amizade, companheirismo e por acreditar que juntas chegaríamos até aqui.

A Ana Possenti, pela colaboração na realização dos experimentos e pelo carinho indispensável nos momentos difíceis.

A Sirlene Valério Tinti, por todo auxílio prestado, alegrias e claro, pela amizade.

A Ms. Luciana Konecny Kohn, pela longa amizade e parceria, indispensáveis para a realização de todo o trabalho.

A Dra. Patrícia Corrêa Dias pela convivência e amizade destes anos todos.

A Ms. Carina Denny sempre com sua mansidão e carinho.

A Karin Maia Monteiro Ciampi, pela amizade conquistada e palavras de entusiasmo quando tudo parecia perdido.

A Orlando Alves Júnior pela amizade e pelo cuidado aos animais que participaram deste trabalho.

Agradeço ainda aos amigos Alik Teixeira Fernandes, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Bruno Guena Fiorentini, Cristina Madjarof, Juliana Lessa Sacoman, Luciana Jankowsky, Luiz Augusto dos Santos, Maria Carolina Bayeux Leme Oliveira, Marina Guimarães Siqueira, Mário Sérgio pela agradável convivência do dia a dia.

A amiga Caroline Rosaneli que mesmo distante torceu para que este trabalho se realizasse.

A Profa. Dra M. Carmo E. do Amaral e Prof. Dr. Volker Bittrich, botânicos do Instituto de Biologia / UNICAMP, pela coleta e identificação botânica da espécie vegetal.

A equipe da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA, pela colaboração fitoquímica e amizade.

Aos colegas do CPQBA / UNICAMP pela convivência tão agradável e pela amizade a mim dedicada.

Aos professores e funcionários do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que de alguma forma colaboraram para obtenção deste título.

A todos os meus familiares, irmão, tias, tios, primas, primos, avós, sobrinhas, que tanto torceram e vibraram com a obtenção deste título. Amo vocês todos.

1. RESUMO

RESUMO

As folhas de *Mikania* (Asteraceae) são utilizadas popularmente como broncodilatadora, antiulcerogênica e anti-reumática. A triagem fitoquímica do Extrato Bruto Hidroalcoólico 70% (EB) de *Mikania laevigata* Schultz Bip. revelou a presença de cumarina, compostos terpênicos e ácidos orgânicos. A cumarina isolada apresentou atividade antiulcerogênica em diferentes modelos experimentais de úlcera em ratos. Em modelo de ligadura do piloro em ratos, a cumarina reduziu a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico, sugerindo um mecanismo de ação relacionado com a secreção ácida gástrica. O mecanismo anti-secretor da cumarina foi investigado através do modelo de ligadura do piloro em ratos tratados previamente com os secretagogos histamina, pentagastrina ou betanecol. Neste modelo experimental, a cumarina só foi capaz de reduzir a concentração hidrogeniônica de forma significativa de ratos previamente

tratados com betanecol, sugerindo um efeito anticolinérgico. Com relação às frações enriquecidas em ácidos e ésteres diterpênicos, FRA e FRE, foi observada uma redução do índice de lesões ulcerativas (ILU) nos modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol. Estas frações, em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com L-NAME e indometacina, mantiveram a inibição do ILU. Já em modelo de úlcera induzida por etanol, em ratos tratados previamente com N-etilmaleimida, a FRA e a FRE não inibiram de forma significativa o ILU, sugerindo uma atividade antioxidante. Porém quando estas frações foram submetidas a testes de atividade antiproliferativa em culturas de células tumorais humanas e células murinas normais, produziram morte celular das linhagens tumorais e humanas sem qualquer seletividade, sugerindo efeitos citotóxicos inespecíficos. Portanto, é possível sugerir que a FRA e a FRE, desenvolvam seu mecanismo de ação antiulcerogênico em consequência de uma citoproteção adaptativa, através da formação de elevada concentração de glutathione.

2. ABSTRACT

ABSTRACT

The leaves of *Mikania* (Asteraceae) species are used in folk medicine as antispasmodic, antiulcerogenic and antireumatic. Phytochemical screening of the 70% crude hydroalcoholic extract (CHE) of *Mikania laevigata* Shultz Bip. revealed coumarins, terpenes and organic acids. The antiulcerogenic activity of coumarin was evaluated through different experimental models in rats. On pyloric ligation model, the decrease of gastric hydrogenionic concentration observed indicated a pharmacological mechanism of action related to the gastric acid secretion. The antisecretory mechanisms of coumarin were confirmed on acid hipersecretion induced by histamine, pentagastrin and bethanechol. Duodenal administration of coumarin inhibited the gastric acid secretion produced only by bethanechol. These results suggest that coumarin may influence the secretion control mediated by the parasympathetic system. The fractions enriched with

diterpenic acids and diterpenic steres, FRA and FRE, decreased the ulcerative lesion index induced by indomethacin and ethanol. On ethanol induced ulcer with previous L-NAME and Indomethacin treatments, FRA and FRE maintained the antiulcerogenic activity. However, with previous N-ethylmaleimide administration, FRA and FRE lost the antiulcerogenic activity, indicating that the active fractions obtained from *M. laevigata* increase the mucosal nonprotein sulfhydryl groups content.

3. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O uso medicinal de plantas tem sido relatado nos registros mais antigos da história da humanidade. No Papiro de Ebers, um texto egípcio datado de 2000 anos antes do aparecimento dos médicos gregos, existe uma compilação de prescrições de mais de 480 substâncias naturais, com predominância das vegetais, sobretudo aquelas utilizadas como purgantes (o rícino e o sene) ou como vermífugos (o meimendo, o absinto, o junípero (zimbros), a mostarda, a terebintina e a albarrã). Acredita-se que a informação contida neste papiro provenha de 3330-2600 a.C. (DE PASQUALE, 1984; ODY, 1995).

No século XVI, Paracelso, médico suíço foi o primeiro a propor a extração de drogas a partir do todo vegetal, originando a noção de princípio ativo. Porém, foi apenas no século XVIII que teve início o processo de identificação dos princípios ativos vegetais e, com isso, a transição entre plantas medicinais e produtos farmacêuticos modernos.

A morfina (analgésico) foi uma das primeiras drogas isoladas de plantas; seguiram-na a aconitina e a emetina (amebicida / emético), a atropina (anticolinérgico), a digitoxina e a digoxina (cardiotônicos), a vincristina (antitumoral), a reserpina (anti-hipertensivo), a quinina e a artemisinina (antimaláricos), citando apenas alguns exemplos clássicos. Muitas destas substâncias são hoje sintetizadas e comercializadas em grande escala (HAMBURGER et al,1991).

Atualmente estima-se que substâncias derivadas de plantas constituem aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados, relação que deve aumentar com o interesse das grandes indústrias farmacêuticas nas plantas superiores como fonte de novos princípios ativos de origem vegetal. O culto à ecologia e o aumento na demanda de terapias não convencionais também têm motivado o aumento no consumo e o interesse na pesquisa de espécies tidas como medicinais. Na Europa, o consumo de fitoterápicos dobrou nas últimas décadas, demonstrando o grande interesse em plantas medicinais. No entanto, das aproximadamente 250.000 espécies vegetais conhecidas, somente uma pequena

percentagem tem sido submetida a estudos farmacológicos e fitoquímicos sistemáticos (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; FELLOWS, 1992).

O processo de estudo de uma planta é longo e multidisciplinar, envolvendo botânicos, farmacologistas, químicos, toxicologistas e médicos, desde a obtenção dos primeiros dados com o extrato bruto, até o isolamento e identificação de um composto puro e biologicamente ativo. Este estudo inicia-se com a seleção da espécie, sendo esta uma etapa crucial no sucesso da investigação. A escolha pode ser baseada em considerações quimiotaxonômicas ou em informações etnofarmacológicas. Dados da literatura apontam para uma estreita correlação entre a atividade anticancerígena e plantas usadas pela medicina popular com esta finalidade. Assim, as plantas selecionadas pelo uso na medicina popular apresentam grande chance de conter compostos biologicamente ativos (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; HAMBURGER et al., 1991).

Segundo FARNSWORTH et al. (1989) existe uma grande correlação entre o uso de uma planta na medicina tradicional e a presença de ações farmacológicas nos derivados das mesmas. Aproximadamente 74% dos medicamentos de origem vegetal foram descobertos com base no seu uso tradicional. Além disso, as plantas medicinais são fontes inesgotáveis de inspiração para a síntese de novos compostos utilizados terapeuticamente ou como ferramentas de pesquisa básica.

A verificação de que aproximadamente 80% da população mundial recorre à medicina tradicional como tratamento primário de saúde (FARNSWORTH et al., 1985) levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a reconhecer a medicina tradicional, e com isso o uso de plantas medicinais, como alternativa terapêutica válida. Desde então, países da Comunidade Européia, da Ásia, do Japão, dos Estados Unidos e países sul-americanos como Argentina, Chile e o Brasil, preocupados com o emprego de espécies vegetais com finalidades terapêuticas, elaboraram estratégias para a regulamentação de seu uso. Estas exigências visam a utilização racional das plantas medicinais, procurando garantir a segurança e a eficácia das mesmas. Desta forma, as plantas medicinais cuja eficácia terapêutica e toxicidade foram bem determinadas, podem ser utilizadas com segurança pela população, desempenhando um papel social, cultural, político e econômico importante.

As plantas do gênero *Mikania* (Asteraceae) distribuem-se pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (Argentina, Paraguai e Uruguai). No Brasil, ocorrem principalmente nas regiões sul e sudeste. São conhecidas popularmente como “guaco” ou “guaco cheiroso” e desenvolvem-se como trepadeira arbustiva, lenhosa, apresentando caule cilíndrico e ramoso. Floresce de agosto a outubro, sendo suas flores visitadas por *Apis mellifera* e várias espécies de *Lepidoptera*. Para o gênero *Mikania* cerca de 450 espécies são mencionadas, sendo que 150 destas espécies são encontradas no Brasil (NUNEZ et al., 2004).

As folhas das espécies deste gênero são muito utilizadas pela medicina popular como antiasmáticas, cicatrizantes, anti-reumáticas, antiulcerogênica e antiofídicas (PIO CORRÊA, 1942; RUPPELT et al., 1991, GUPTA, 1994; PEREIRA et al., 1994, BISHAYEE & CHATTERJEE, 1994, MOSADDIK & ALAM, 2000, PAUL et al. 2000, AHMED, et al., 2001).

Os metabólitos secundários mais comuns neste gênero são cumarinas (LEITE et al., 1992, CELEGHINI et al., 2001, CABRAL et al., 2001), diterpenos do tipo cauranos (MATHUR et al., 1973, KNUDSEN et al., 1986; REIS et al., 2003, NUNEZ et al., 2004, OHKOSHI et al., 2004), lactonas sesquiterpênicas (HERZ et al., 1970; DIAZ et al., 1992; CUENCA et al., 1992; CUENCA et al., 1993; NUNEZ et al., 2004, HUANG et al., 2004), triterpenos (KIANG et al., 1965) e flavonóides (HERZ & SANTHANAM, 1969), dentre outros.

Alguns diterpenos do tipo caurano, como o ácido caurenóico, apresentam atividade antimicrobiana (DAVINO et al., 1989, YATSUDA et al., 2001, HOLETZ et al., 2002), que pode estar relacionada com a indicação popular do “guaco” no tratamento de afecções respiratórias (OLIVEIRA et al., 1992, MOURA et al., 2002). Das partes aéreas da *M. glomerata* Sprengel e da *M. laevigata* Shultz Bip. foram isolados compostos como cumarina, ácido caurenóico, ácido cinamoilgrandiflórico e estigmasten-22-en-3-ol (OLIVEIRA et al., 1984; VILEGAS et al., 1997, MOURA et al., 2002). Já dos óleos essenciais de *M. micrantha* (THOMPSON & NICOLHER, 1991); *M. banisterieae*

(LOBITZ et al., 1997), *M. congesta* e *M. amara* (MAIA et al., 1984), são constituídos principalmente por mono e sesquiterpenos.

No Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA / UNICAMP), existem diversas espécies de *Mikania*, incluindo a *Mikania laevigata*. Esta espécie vem sendo estudada agronomicamente a cerca de cinco anos e o cultivo vem de uma população clonada nas condições de sol e sombra.

A *M. laevigata* Schult. Bip. desenvolve-se como um arbusto lenhoso e cheio de ramos. Cresce como trepadeira e como não tem garras para prender-se precisa de um arrimo. As lianas apresentam ramos estriados, glabros. As folhas são opostas, pecioladas, lanceolada e estreitamente ovada, às vezes levemente lobada, com base obtusa, ápice agudo a atenuado, trinervadas, glabras em ambas as faces, de 6,5 a 12,5 cm de comprimento e 2 a 5 cm de largura. O pecíolo tem de 1,5 a 4,2 cm de comprimento. Os ramos e folhas têm odor característico de "guaco" (cumarina). A inflorescência apresenta panícula de capítulos sésseis, densamente aglomerados; involúcro de 4,7 a 5 mm, bráctea subinvolucral de 2 mm, lanceolada, ciliada, ápice agudo e brácteas involucrais com base dilatada e ápice obtuso. A corola é glabra, o tubo tem de 1,2 a 1,3 mm, o limbo de 3 a 3,4 mm, com lobos de 1 mm, ciliados, ápice pontuado de glândulas. Os aquênios são glabros, de 3 a 3,3 mm, ápice esparsamente piloso e papus de 4 a 4,7 mm (PIO CORRÊA, 1942).

Uma exsicata da *Mikania laevigata* está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob número UEC-102.046. Exemplar desta espécie, cultivada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), está apresentado na figura 1.

Estudos anteriores (dissertação de mestrado) demonstraram que o extrato bruto hidroalcoólico (EB) de *M. laevigata* apresenta atividade antiulcerogênica, envolvida com o mecanismo de secreção ácida gástrica. A partir do EB, foi realizado um fracionamento em meio básico clorofórmico, quando na porção orgânica obteve-se uma fração rica em cumarina (FRC) e, na porção aquosa, uma fração isenta de cumarina (FIC). Estas frações foram testadas em modelo de úlcera induzida por Indometacina e observou-se que a FRC inibiu o ILU de forma significativa, ao passo que, a FIC não reduziu o ILU de forma significativa. A partir destes resultados, os estudos foram direcionados no sentido da purificação da FRC através de cristalização com metanol à 0°C, fornecendo, após filtração e secagem, cristais brancos amorfos, com ponto de fusão na faixa de 68-78°C e cheiro característico de baunilha. Estes foram posteriormente analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e identificados como a cumarina, denominada 4 (1H)-benzopirona. Esta cumarina isolada não é uma substância inédita, podendo ser adquirida comercialmente, como por exemplo da Sigma-Aldrich Co.

Dados não publicados relatam que alguns laboratórios de manipulação e pequenas indústrias farmacêuticas utilizam a cumarina citada acima como marcador da atividade broncodilatadora apresentada pelo EB de *M. laevigata*. Desta forma, foi averiguada a possibilidade desta substância estar envolvida com a atividade antiulcerogênica apresentada pelo EB. Através do modelo experimental de úlcera induzida por Indometacina, observou-se uma inibição significativa do ILU. A partir de então, neste mesmo modelo, buscou-se determinar a dose efetiva 50% (DE₅₀), através de regressão linear. Estes resultados sugerem, portanto, que a cumarina isolada do EB da *M. laevigata* pode ser um dos princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica observada (BIGHETTI, 1999).



FIGURA 1: Exemplar de *Mikania laevigata* cultivada ao sol no CPQBA/UNICAMP

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O estômago é dividido em quatro regiões anatômicas, revestidas por uma mucosa: cárdia, fundo, corpo e antro. A mucosa gástrica é constituída de uma série de depressões e glândulas. Nas depressões estão as células epiteliais superficiais, enquanto que as glândulas contém muco, células parietais, endócrinas e principais. As células parietais, que secretam ácido, e as células principais, que secretam pepsinogênio, estão localizadas primariamente no fundo e no corpo, enquanto que as células de gastrina estão no antro (WINGATE, 1986, ALLEN et al., 1993).

A inervação do estômago compreende fibras extrínsecas e intrínsecas, sendo a extrínseca realizada por ramos autonômicos, através de fibras parassimpáticas de origem vagal que terminam no plexo mioentérico da parede do estômago (GRUNDY E SCRATCHERD, 1989). O nervo vago contém 80-90% de fibras aferentes e 10-20% de fibras eferentes. As fibras eferentes são pré-ganglionares e formam sinapses com neurônios do plexo mucoso e mioentérico.

A parede gástrica contém também neurônios intrínsecos que fazem parte do sistema nervoso entérico (SNE). Este, por sua vez, é constituído por dois plexos principais, o plexo mioentérico, que inerva as camadas musculares e regula a função motora e o plexo mucoso, que inerva a mucosa e regula a absorção e as secreções gastrointestinais. Neurônios de ambos os plexos projetam e recebem fibras neuronais dos gânglios simpáticos e parassimpáticos (SCHUBERT E SHAMBUREK, 1990, HOOGERWERF & PASRICHA, 2003).

A defesa da camada mucosa do estômago tem sido bem caracterizada, sendo a sua principal função a de proteção contra os efeitos nocivos do ácido clorídrico. Um nível de defesa consiste nos fatores secretados no lúmen, incluindo ácido, muco, bicarbonato e substâncias antibacterianas (exemplo, as imunoglobulinas). Ainda que o ácido clorídrico tenha o potencial de causar injúria à mucosa gástrica, é importante lembrar que sua principal função é proteção, o qual reduz o número de bactérias ingeridas (WALLACE et al., 1997). Estes mecanismos, denominados citoprotetores, aumentam a resistência das

células e limitam o acesso dos agentes agressores à elas (ALLEN et al., 1993, BORRELI & IZZO, 2000).

O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago e pelo duodeno, em resposta a vários estímulos, como as prostaglandinas, peptídios gastrointestinais e contato com o ácido gástrico, permanecendo em grande parte abaixo ou na camada mucosa. Deste modo, a superfície mucosa está em contato com um líquido com pH mais elevado do que o observado na luz do estômago. Em condições normais o bicarbonato neutraliza os íons H^+ , enquanto se difunde através da camada de muco, estabelecendo um gradiente de pH entre a luz e as células epiteliais superficiais (SMEDFORS & JOHANSSON, 1986). A secreção de bicarbonato é inibida por atropina, antagonistas muscarínicos, agonistas α -adrenérgicos, indometacina, ácidos biliares, fumaça de cigarro e provavelmente por infecção por *Helicobacter pylori* (HOJGAARD et al., 1996, TAKEUCHI et al., 1999).

A camada de muco aderida à mucosa gástrica protege o epitélio contra ácido, pepsina e outros agentes necrotizantes, como o álcool absoluto e antiinflamatórios não-esteroidais e participa na recuperação da injúria gástrica (AL MOUTAERY et al., 1997). O muco gastroprotetor forma um fino revestimento sobre as células superficiais da mucosa que protege as células subjacentes das forças mecânicas da digestão, lubrifica a mucosa, retém água e impede, mas não bloqueia, a difusão dos íons H^+ da luz para a membrana apical das células epiteliais. O muco aderido à mucosa é constituído por uma camada

de glicoproteínas em forma de gel, denominada mucina e esta camada é insolúvel em água (SELLERS et al., 1986, TAKEUCHI et al., 1999, LLESUY, 2002).

Prostaglandinas são ácidos graxos de vinte carbonos, produzidas a partir do ácido araquidônico, após liberação de fosfolipídeos de membrana, através da ação da enzima ciclooxigenase (WALLACE et al., 1997). No trato gastrointestinal são sintetizadas quantidades substanciais de prostaglandinas das séries E, F e I (EBERHART & DUBOIS, 1995). Quando administradas exogenamente, estimulam a secreção de muco e bicarbonato e aumentam o fluxo sangüíneo da mucosa gástrica (KONTUREK & PAWLIK, 1986, MOTILVA et al., 1996, WALLACE et al., 1997, ARRIETA et al., 2003).

O óxido nítrico tem sido objeto de estudos extensos a respeito do seu papel na defesa da mucosa gástrica (ELLIOT et al., 1995, TATEMACHI et al., 2003). Foi demonstrado que o óxido nítrico influencia a secreção de muco, do fluxo sangüíneo, bem como sobre a resistência da mucosa à injúria gástrica (WALLACE et al., 1997). Seu efeito citoprotetor se dá por promover vasodilatação e conseqüentemente um aumento do fluxo sangüíneo da mucosa gástrica, proporcionando uma retirada mais acelerada dos íons H^+ nocivos à esta e ainda aumentar o suporte de nutrientes para a mesma (KONTUREK et al., 1995, KATO et al., 1998, QUI et al., 2003).

A presença de elevadas concentrações de glutathione reduzida, está intimamente relacionada com a citoproteção gástrica, por impedir a ação nociva de radicais livres tóxicos para as células desta mucosa (SZABO, 1981, TAKEUCHI et al., 1989, MARTIN et

al., 1998, ROSANELI et al., 2002). Os grupos sulfidril não protéicos (GSH) atuam como sequestradores nucleofílicos de anion superóxido e como co-fatores na redução do peróxido de H^+ mediada por GSH-peroxidase. Estes compostos sulfidrílicos podem também influenciar diretamente os receptores sensíveis a $-SH$, além de alterar a permeabilidade da membrana e a liberação de enzimas modificando direta ou indiretamente o fluxo sangüíneo para a mucosa (SZABO et al., 1987; SZABO & SZELENYI, 1987, ARRIETA et al., 2003).

O fluxo sangüíneo protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e bicarbonato, por remover os íons H^+ que penetram nas barreiras muco-bicarbonato e epiteliais, por diluir os produtos do metabolismo celular e por neutralizar substâncias tóxicas (WALLACE & GRANGER, 1996). O fluxo sangüíneo é essencial para virtualmente todos os mecanismos protetores do trato gastrointestinal. Devido à sua distribuição e arquitetura a microcirculação da mucosa é a mais importante (SZABO et al., 1985). A manutenção do fluxo sangüíneo da mucosa permite a rápida restituição de uma lesão epitelial (SZABO, 1991). As prostaglandinas são as principais responsáveis pelo aumento do fluxo sangüíneo da mucosa gástrica.

Capsaicina, o principal composto presente na pimenta vermelha, devido à sua capacidade em excitar e retardar a função de neurônios primários aferentes, tem sido usada para elucidar a função destes neurônios sensoriais em um grande número de processos fisiológicos. Na maioria dos estudos, a capsaicina produz em ratos e gatos uma inibição da secreção ácida gástrica. Em humanos, embora estudos recentes

forneçam algumas evidências à favor do efeito benéfico da capsaicina sobre a mucosa gástrica, ainda necessita-se de comprovação (SALAM et al., 1997, SOBUE et al., 2003).

O suco gástrico é uma mistura de secreção parietal (ácido e fator intrínseco) e secreções não-parietais (muco, bicarbonato, Na^+ , K^+ e pepsinogênio). Três mediadores químicos endógenos, a acetilcolina, a gastrina e a histamina, estimulam a secreção de ácido (SCHUBERT, 1994, HIRSCHOWITZ et al., 1995, KATO et al., 1997).

A estimulação da célula parietal é mediada centralmente pelo vago e, periféricamente, através da liberação de histamina das células enterocromafínicas-símbles, pela acetilcolina das terminações parassimpáticas e pela gastrina das células G (BIGHETTI et al., 2002). Estes mediadores atingem as células alvo por mecanismos conhecidos como: a) Mecanismo de regulação neural, quando o neurotransmissor é liberado dos terminais nervosos, b) Mecanismo de regulação hormonal ou endócrina, em que a liberação do neurotransmissor ocorre à distância e atinge a célula via fluxo sangüíneo ou c) Mecanismo de regulação parácrina, em que a liberação do transmissor se realiza dentro da circulação local ou no fluído intersticial (SCHUBERT & SHAMBUREK, 1990, SCHUBERT, 2000).

Além do controle vagal, o Sistema Nervoso Central (SNC) regula a atividade parassimpática, influenciando o plexo mioentérico da parede gástrica. A regulação é exercida principalmente por peptídeos e neurotransmissores (TACHE et al., 1990; 1991, SCHUBERT, 2000).

Nos anos 70, BLACK et al. (1972) postularam que a histamina estimulava a secreção ácida gástrica interagindo com receptores H_2 e sucessivos antagonistas foram selecionados para este receptor. A histamina, contida em células enterocromoafins, é liberada através de um mecanismo parácrino. Quando liberada, este mediador difunde-se pelos espaços intercelulares até atingir as células parietais, liga-se aos receptores H_2 ali presentes e aumenta então, a secreção ácida gástrica (HERSEY & SACHS, 1995, ANDERSSON et al., 1996, BIGHETTI et al., 2002, SCHUBERT, 2003).

Já a gastrina é encontrada principalmente nas células G do antro gástrico e no duodeno, com pequenas quantidades localizadas na glândula pituitária e algumas nas fibras nervosas vagais e liberada da célula G antral por proteínas presentes nos alimentos, além do Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} e também pela estimulação vagal e alcalinização do antro (HERSEY & SACHS, 1995, SCHUBERT, 2000).

A vagotomia foi utilizada por Latarjet para o tratamento da úlcera duodenal no ano de 1922. Esta foi uma das primeiras evidências do envolvimento da via colinérgica como mediador da secreção ácida gástrica (ARQUIOLA et al., 1987). A inibição da secreção ácida gástrica pela atropina indica que a acetilcolina atua através de um receptor muscarínico colinérgico mas, não define o subtipo do receptor muscarínico envolvido. A caracterização farmacológica da estimulação colinérgica *in vivo* indica que a célula parietal conta com um subtipo de receptor muscarínico – o M_3 . A acetilcolina é liberada por neurônios eferentes vagais, os quais são estimulados através do olfato, visão, paladar ou mastigação e neurônios locais da parede gástrica estimulados pela

distensão do estômago (HERSEY & SACHS, 1995, BIGHETTI et al., 2002, LEHMANN et al., 2003).

A somatostatina, localizada nas células D do antro, é um importante inibidor *in vivo* da secreção ácida gástrica estimulada pela gastrina e é menos efetiva sobre a secreção ácida estimulada pela histamina (WALSH, 1988, VUYYURU et al., 1995, LEHMANN et al., 2003).

A colecistocinina e a gastrina são liberadas endogenamente pelo estômago e parte proximal do intestino, constituindo-se em mediadores fisiológicos de várias funções, tais como a secreção e o esvaziamento gástricos (KONTUREK et al., 1995). Há evidências de que estes peptídios também possuam ação sobre a manutenção da integridade da mucosa gástrica através da ligação à receptores específicos (CCK-A para colecistocinina e CCK-B para a gastrina) localizados em fibras vagais sensíveis à capsaicina (KONTUREK et al., 1995, DING & HAKANSON, 1996, SCHUBERT, 2000).

Os mecanismos que levam à secreção de ácido pelas células parietais envolvem o AMPc como mediador da secreção estimulada pela histamina, enquanto que a entrada de Ca^{2+} nas células parietais facilitaria aquela estimulada pela acetilcolina. Uma H^+/K^+ ATPase, localizada na superfície luminal das células parietais, funciona como bomba de prótons ou etapa final da secreção de íons H^+ (CLISSOLD & CAMPOLI-RICHARDS, 1986).

Minutos após a estimulação da célula parietal as tubulovesículas citoplasmáticas hipertrofiam-se e coalescem num intricado sistema de canálculos da célula parietal (HELANDER, 1988; LI et al., 1993). A H^+/K^+ ATPase, transloca-se das tubulovesículas citoplasmáticas para os canálculos secretórios da membrana, onde é ativada. A bomba de prótons é uma enzima α , β -heterodimérica ligada à membrana, composta de uma grande subunidade α catalítica de 1033 a 1035 aminoácidos e uma pequena subunidade β composta de 290 aminoácidos fortemente glicosilados (SACHS et al., 1993; SCOTT et al., 1993, SCHUBERT, 2003).

A H^+/K^+ ATPase bombeia íons hidrogênio através da membrana canalicular da célula parietal contra um gradiente de concentração químico. Transportadores de íon potássio, cloreto e bicarbonato ligados às membranas apical e basolateral permitem a secreção de íons hidrogênio e cloreto pela bomba de prótons. O ácido clorídrico é transportado ao lúmen da mucosa por forças hidrostáticas através do gel de muco (HOLM & FLEMSTROM, 1990, SCHUBERT, 2000).

A acetilcolina e a gastrina estimulam a secreção ácida por um mecanismo que leva ao aumento do cálcio citosólico na célula parietal. Vários estudos sugerem que esses neurotransmissores ligam-se a receptores específicos (muscarínicos M_3 e CCK-B, respectivamente) na membrana da célula parietal. Estes receptores estão acoplados a fosfolipases que catalizam a quebra dos fosfolipídeos de membrana formando inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 mobiliza o cálcio intra e extracelular, aumentando a permeabilidade da membrana ao cálcio, elevando as concentrações de

cálcio livre em até 10000 vezes. O cálcio pode se unir a proteínas fixadoras de cálcio, como a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina (CaM), que estimula a fosforização de proteínas em cascata e ativando as proteínas quinases cálcio dependentes (PKC). O complexo CaM pode modificar a produção ou degradação de AMPc, que por sua vez pode modificar os fluxos de cálcio intracelular ou extracelular (SHAMBUREK & SCHUBERT, 1993). O DAG permanece fixo à membrana plasmática e atua como cofator, junto com o cálcio, na ativação da PKC (CHANG, 1990; WILKES et al., 1991 a,b). Esta PKC pode influenciar a transdução do sinal variando a afinidade do receptor pelo agonista e modificando a sensibilidade das células ao agonista. A ativação da PKC por este processo, ou a ativação da PKA pela via histaminérgica faz com que estas proteínas fosforilem as proteínas responsáveis pela ativação da bomba de prótons, a H^+/K^+ ATPase, que condiciona a liberação do íon H^+ para o lúmen gástrico às custas de K^+ (SHAMBUREK & SCHUBERT, 1993; LLOYD & DEBAS, 1994; IKARASHI, et al, 2000, SCHUBERT, 2000).

A úlcera geralmente é encontrada no estômago ou mais freqüentemente nos primeiros centímetros do duodeno. A mucosa gástrica está exposta a vários fatores agressivos como o estresse, drogas ulcerogênicas como os antiinflamatórios não esteroidais, etanol, a bactéria *Helicobacter pylori* e vários irritantes endógenos como a secreção de ácido clorídrico, pepsina e sais biliares (KONTUREK et al., 1997, SILVA et al., 1997). Embora o desenvolvimento do processo ulcerativo ainda não esteja totalmente elucidado, quando ocorre um desvio no equilíbrio entre os mecanismos lesivos da mucosa (a secreção e ação do ácido clorídrico e da pepsina) e os mecanismos

citoprotetores da mucosa (a secreção de muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico e grupo sulfidrila não protéico), acredita-se que a lesão ulcerativa seja desenvolvida (BIGHETTI et al., 2002).

A identificação e isolamento do *Helicobacter pylori* por MARSHALL & WARREN em 1983 proporcionou um enorme desenvolvimento dos conhecimentos a cerca da úlcera péptica (MARSHALL, 1994). Após vários estudos científicos, evidenciou-se que a maioria (90%) das infecções da mucosa gastroduodenal estão associadas a esta bactéria como agente causador (COVER et al., 1992, GOODWIN, 1997, WATANABE et al., 2003). A detecção do *Helicobacter pylori* é feita através da biópsia gástrica ou duodenal e posterior estudo histopatológico laboratorial. Recentemente, desenvolveu-se uma nova metodologia, que consiste na pesquisa de anticorpos de *Helicobacter pylori*, no sangue do paciente infectado, evitando o uso de métodos de diagnóstico invasivo, desconfortáveis para o paciente. Outra possibilidade para o tratamento, que está em desenvolvimento, é a produção de vacinas para esta bactéria (GRAHAM et al., 1996).

Várias drogas têm sido utilizadas no tratamento das úlceras gástricas e duodenais, sendo de grande importância os agentes anti-secretores gástricos, do tipo antagonistas dos receptores H₂ de histamina (BAUER et al., 1986) e os análogos das prostaglandinas, como o misoprostol (FELIX et al., 1986), exemplo típico de droga citoprotetora. Em 1988 foram introduzidos no mercado os primeiros inibidores da bomba protônica sendo o omeprazol e o lansoprazol os representantes desta classe, cujo

mecanismo de ação consiste na inibição da bomba protônica H^+ , K^+ ATPase, enzima responsável pela etapa final da secreção ácida gástrica (SACHS et al., 1988, HERMANSSON et al., 1997, TARI et al., 1997, AIHARA et al., 2003).

Os compostos de bismuto e alguns outros antimicrobianos têm sido associados ao tratamento medicamentoso das gastrites e ulcerações gástricas, pois, geralmente as ulcerações estão infectadas pela *Helicobacter pylori*. Nesses casos, a associação de antimicrobianos têm diminuído significativamente o números de recidivas desta patologia (GRAHAM, 1989).

Existe um interesse crescente nos efeitos gastrointestinais dos agonistas e antagonistas de receptores serotoninérgicos e estes aspectos farmacológicos apresentam implicações clínicas importantes. Derivados ativos de benzamidas como agonistas 5-HT₄, incluindo a cisaprida, tem reforçado o arsenal terapêutico na classe dos fármacos que aumentam a motilidade intestinal. Estudos recentes têm sugerido que a coordenação da motilidade intestinal pode ser de importância crucial na promoção da eliminação de ácido gástrico e poderia ser um fator não detectável na patogênese da úlcera gástrica (MOTILVA et al., 1996).

No que diz respeito aos fármacos de origem natural com atividade antiulcerogênica, vários princípios ativos tiveram sua atividade comprovada através de modelos experimentais em animais. A mais importante delas e já comercializada, é a carbenoxolona sódica (sal sódico do hemisuccinato do ácido glicirretínico), obtida a

partir das raízes e rizomas do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*). Seu mecanismo de ação foi extensamente estudado e sabe-se que esta droga aumenta os níveis de prostaglandinas na mucosa gástrica por inibir as enzimas que promovem o catabolismo das prostaglandinas (15-hidroxi-PG-dehidrogenase e Δ^{13} -PG-redutase). Os altos níveis de prostaglandinas aumentam a secreção de muco e bicarbonato e conseqüentemente, os mecanismos de proteção da mucosa contra o ácido clorídrico e a pepsina. Além deste mecanismo, a carbenoxolona age aumentando os níveis de AMPc por inibição das fosfodiesterases da mucosa e inibe a secreção de pepsina (LEWIS & HANSON, 1991a, LEWIS & HANSON, 1991b).

5. OBJETIVOS

OBJETIVOS

- ✓ Isolar e identificar os princípios ativos presentes no Extrato Bruto Hidroalcoólico (EB) de *Mikania laevigata* Schultz Bip.;
- ✓ Avaliar a atividade antiulcerogênica dos princípios ativos isolados e frações em modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos ;
- ✓ Identificar o possível mecanismo de ação;

6. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Amostras da espécie vegetal *Mikania laevigata* Schultz. Bip. foram obtidas de cultivos realizados desde 1996 no Campo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) pela Divisão de Agrotecnologia do CPQBA.

Uma exsicata da *M. laevigata* está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob número UEC - 102.046. Um exemplar da exsicata está apresentado na figura 2.

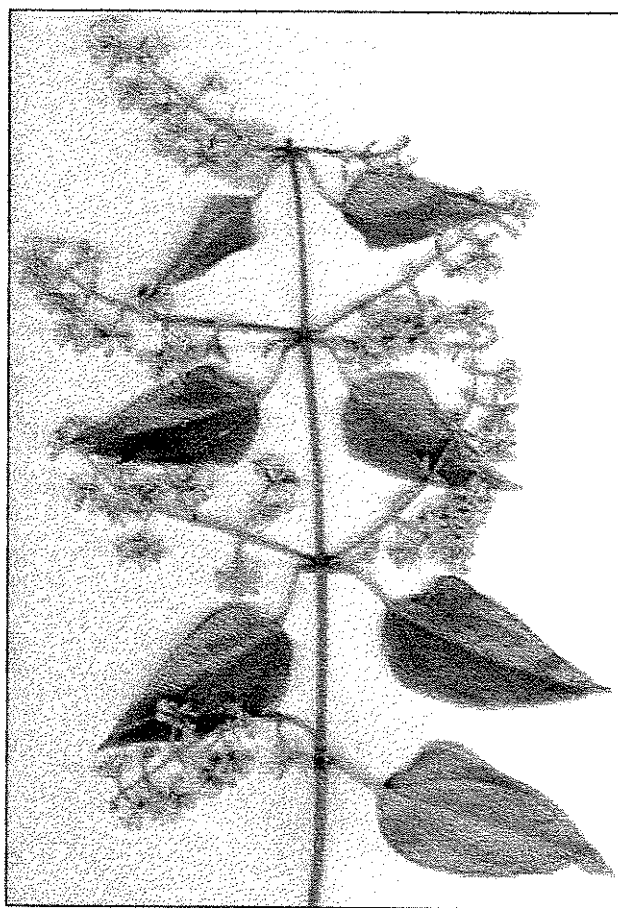


Figura 2: Exsicata de *M. laevigata*

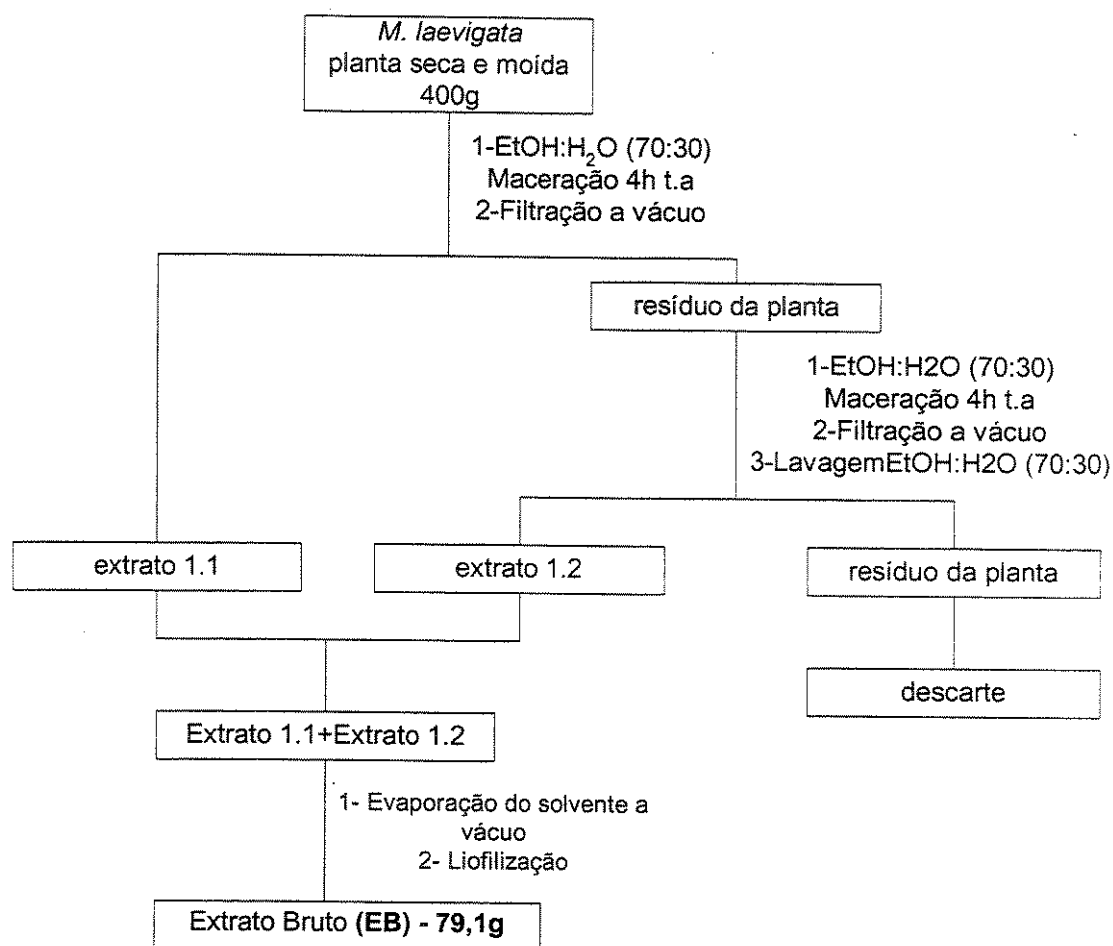
Foram utilizadas as folhas da espécie vegetal cultivada a pleno sol e colhidas no período da manhã. Após a coleta, o material vegetal foi seco a uma temperatura de 45°C durante 48 horas em estufa da marca Fabbe, modelo 170, com circulação de ar forçado. Posteriormente, as folhas foram finamente moídas em moinho de facas da marca Stephen, modelo UM 40, produzindo-se partículas de aproximadamente 0,35 mm.

2. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

2.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Mikania laevigata* Schultz. Bip.

O extrato bruto hidroalcoólico (EB) foi obtido a partir de 400g de folhas secas e moídas com 2,0 L de uma solução de etanol:água (70:30) sob agitação mecânica por 4 horas a temperatura ambiente. Após filtração em funil de placa porosa, o processo de extração acima foi repetido e o resíduo final da planta foi lavado com 1,0 L da solução hidroalcoólica e descartado. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até eliminação de todo etanol mantendo a temperatura do banho inferior a 40°C e em seguida liofilizados, obtendo-se 79,1 g do extrato bruto seco (EB), com um rendimento de 19,8% sobre a massa seca da planta processada.

O EB foi preparado em maior quantidade a partir de 2,0 Kg de folhas secas e moídas com 8,0 L etanol:água (70:30), utilizando procedimento análogo ao descrito acima, obtendo-se 380,0 g do extrato seco, com 19% de rendimento (fluxograma 1).

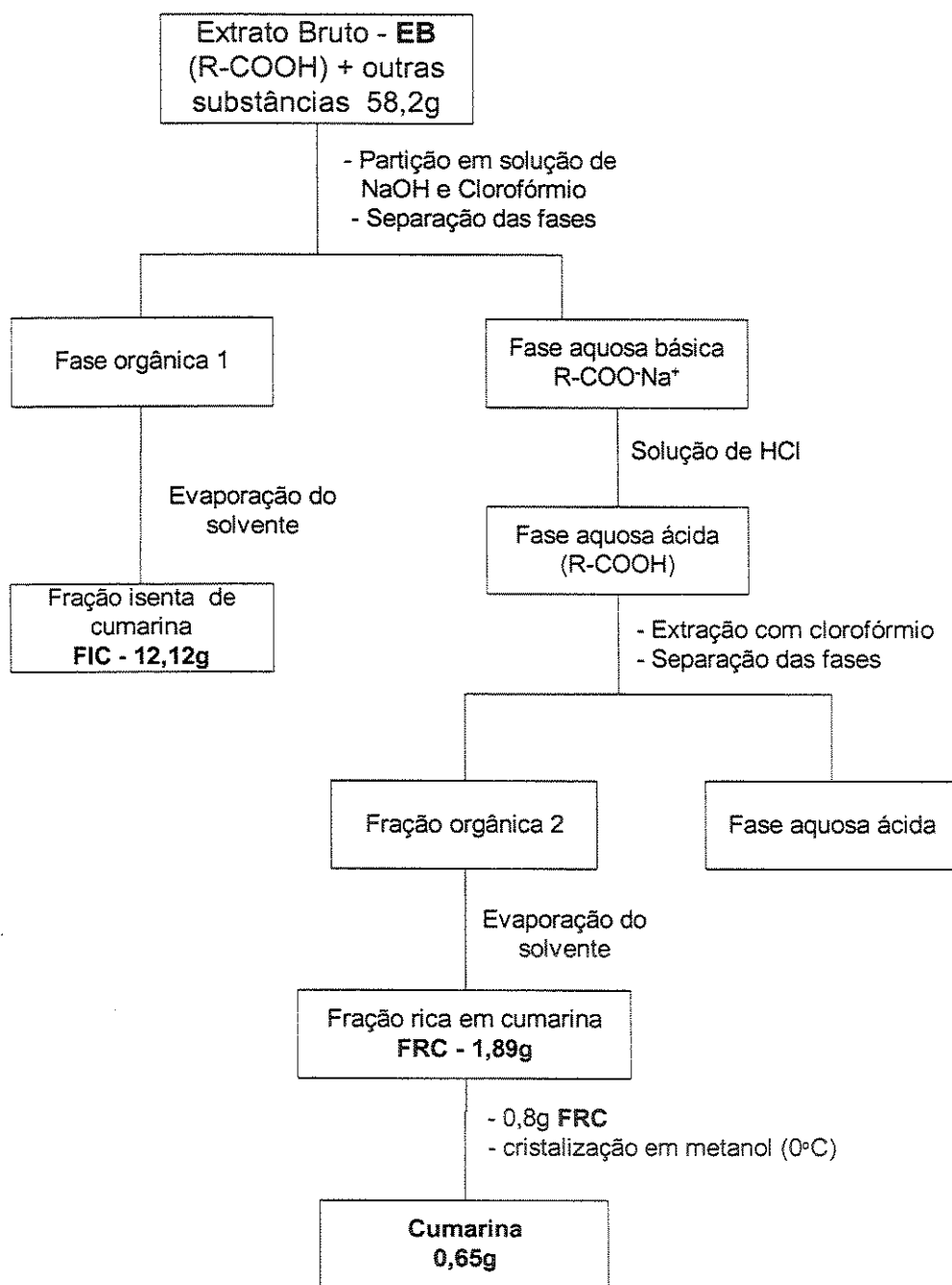


FLUXOGRAMA 1: Obtenção do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EB) de *M. laevigata*.

2.2 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM CUMARINA (FRC) E DA FRAÇÃO ISENTA DE CUMARINA (FIC): PARTIÇÃO DO EB EM CLOROFÓRMIO E SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO

Foram solubilizados 58,2 g do EB em 300 mL de clorofórmio e em seguida adicionados 200 mL de uma solução aquosa de NaOH 1N. A mistura foi mantida em agitação por 4 horas a temperatura ambiente seguido de separação das fases em funil de separação. A fase aquosa básica foi extraída com 100 mL de clorofórmio e as fases de clorofórmio

foram agrupadas e evaporadas a vácuo em evaporador rotativo obtendo-se 12,12 g da Fração Isenta de Cumarina (FIC) (20,8% de rendimento). A fase aquosa resultante foi acidificada com uma solução de HCl 2N até pH=5,0, seguida de extração com três porções de 100 mL de clorofórmio, procedendo-se a separação das fases em funil de separação após cada extração. As fases de clorofórmio foram agrupadas, filtradas em Na_2SO_4 e evaporadas a vácuo, fornecendo 1,89 g da Fração Rica em Cumarina (FRC) (3,2% de rendimento). A fração aquosa final foi descartada (fluxograma 2).



FLUXOGRAMA 2: Obtenção da Fração Rica em Cumarina (FRC) e da Fração Isenta de Cumarina (FIC)

2.3. PURIFICAÇÃO DA CUMARINA

A FRC (0,8 g), foi cristalizada com 50,0 mL de metanol à 0°C, fornecendo após filtração e secagem, 0,65g de cristais brancos amorfos com odor característico de baunilha e ponto de fusão na faixa de 68 a 78 °C. Estes cristais foram analisados por CG-EM.

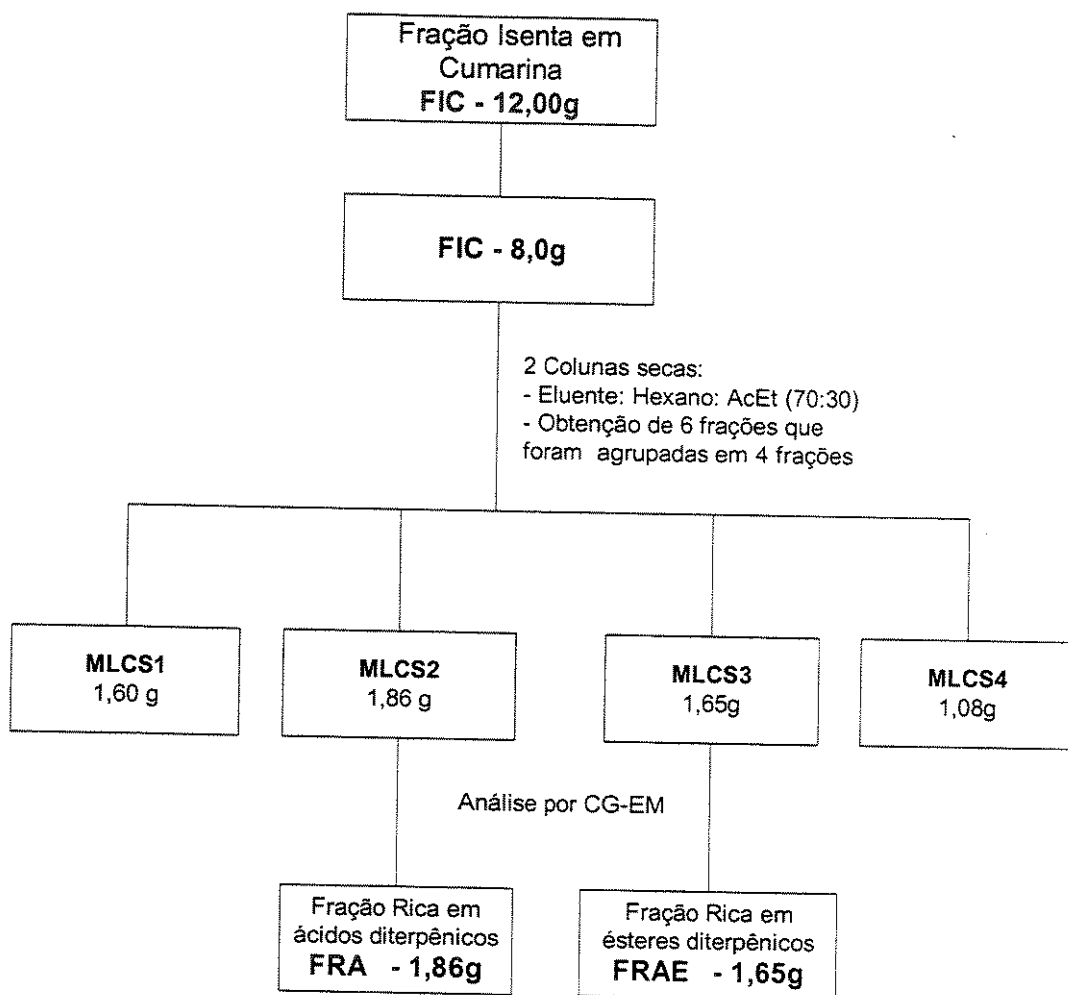
2.4. PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM ÁCIDOS DITERPÊNICOS (FRA) E DA FRAÇÃO RICA EM ÉSTERES DITERPÊNICOS (FRE)

A Fração Isenta de Cumarina (8,0 g) foi submetida a um processo de fracionamento por coluna cromatográfica seca, utilizando membrana de celulose - 60 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. Foram preparadas 2 colunas idênticas utilizando 40 g de sílica gel 60 da Merck (70-230 Mesh) como fase estacionária e Hexano:Acetato de etila (H:AcEt) 70:30 como eluente. Após eluição, as colunas foram cortadas em 6 partes iguais, as frações extraídas com acetato de etila e analisadas por CCD em H:AcEt (70:30v/v). As frações semelhantes das duas colunas foram agrupadas, filtradas em funil de placa porosa, lavadas com acetato de etila e evaporadas a vácuo, originando 4 frações denominadas MICS1 (1,60 g) MICS2 (1,86 g); MICS3 (1,65 g); MICS4 (1,08 g).

Aliquotas de cada fração foram metiladas com solução de diazometano e analisadas por CG-EM, em um Cromatógrafo a Gás- HP 5890 série II, acoplado com um detetor seletivo de massas HP5971, equipado com uma coluna de 25m ou 30m de comprimento x 0,2mm de diâmetro x 0,33µm de espessura da marca HP ultra-2 ou HP-5. As condições de análise utilizadas foram:

Temperatura do injetor: 250°C, Detetor: 280°C, Programação: $T_i = 110^\circ\text{C}$ (2 min), $5^\circ\text{C}/\text{min}$; $T_f = 300^\circ\text{C}$, Gás de arrase: Hélio (1,0mL/min) e Volume de injeção: 1,0 μL (15-20mg/mL).

As frações de média polaridade MICS2 e MICS3 foram identificadas como Fração Rica em Ácidos Diterpênicos (FRA) e Fração Rica em Ésteres Diterpênicos (FRE), respectivamente (fluxograma 3).



FLUXOGRAMA 3: Obtenção da Fração Rica em Ácidos Diterpênicos (FRA) e Fração Rica em Ésteres Diterpênicos (FRE)

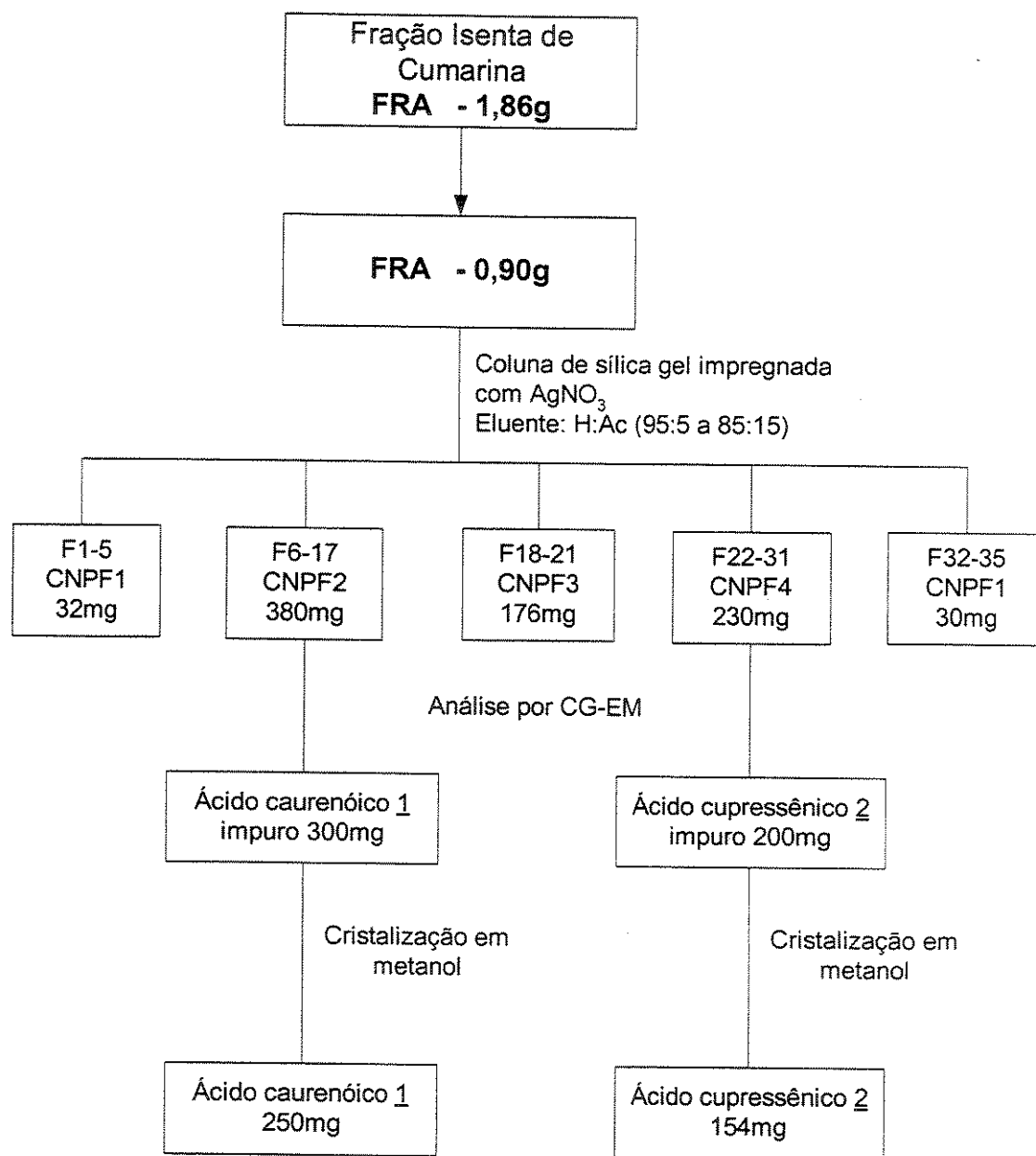
2.5. PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS DITERPÊNICOS

Para identificação dos ácidos caurenóico e cupressênico utilizou-se uma coluna aberta contendo sílica impregnada com nitrato de prata. Desta forma, preparou-se uma solução de nitrato de prata a 10% em água, seguido da adição de 40,0g de sílica gel Merck (0,063-0,200 Mesh). A eliminação da água foi feita em estufa a vácuo a 100°C por 24 horas, até obtenção da sílica seca impregnada com nitrato de prata.

Utilizou-se uma coluna de vidro de 4,0 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Após adição da sílica, a coluna foi envolvida em papel alumínio e empacotada com hexano, seguido da adição da papa preparada com 900 mg da fração MICS2 e 900 mg de sílica gel. Hexano:Acetato de etila foi utilizado como eluente, nas seguintes proporções: 95:5 (1400 mL) 90:10 (800 mL) e 85:15 (1200 mL).

Foram recolhidas 35 frações de 100 mL cada e a partir das análises por CCD-NP, estas foram agrupadas de acordo com suas semelhanças originando 5 frações, resultando após evaporação do solvente a vácuo as frações secas: CNPF1 (32 mg); CNPF2 (380 mg); CNPF3 (176 mg); CNPF4 (230 mg); CNPF5 (30mg). Parte das frações foram solubilizadas em éter etílico, metiladas com solução de diazometano e analisadas por CG-EM.

As frações CNPF2 (300 mg) e CNPF4 (200 mg) foram cristalizadas em metanol a 0°C, fornecendo os ácidos caurenóico (250 mg) e cupressênico (154 mg), respectivamente (fluxograma 4).



FLUXOGRAMA 4: Obtenção dos ácidos caurenóico e cupressênico.

2.6 PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES DITERPÊNICOS

A fração FRAE3 (0,80 g), rica em ésteres diterpênicos (FRE), foi purificada em coluna flash, utilizando-se coluna de vidro de 45 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. A coluna foi previamente empacotada com sílica gel 60 (230 – 400 Mesh) e hexano sob pressão de ar comprimido.

Foi utilizado como eluente Hexano:Acetato de etila (98:2), sendo sua polaridade aumentada gradativamente para (95:5), (90:10) e (80:20).

Foram recolhidas 59 frações, as quais foram analisadas por CCD (H:AcOEt 80:20) e as frações semelhantes foram agrupadas, originando 6 frações denominadas F1(150 mg); F2 (130 mg); F3 (160 mg); F4 (110 mg); F5 (78 mg) e F6 (88 mg).

As frações F1, F2 e F6 foram metiladas com solução de diazometano e analisadas por CG-EM, nas mesmas condições descritas anteriormente.

As frações F1 e F2 foram agrupadas e a fração resultante foi cristalizada em metanol a 0 °C, obtendo-se um sólido branco identificado como a mistura dos compostos: ácido isobutil-grandiflórico (MM = 388) e Ácido 3-metil-butil-grandiflórico (MM= 402).

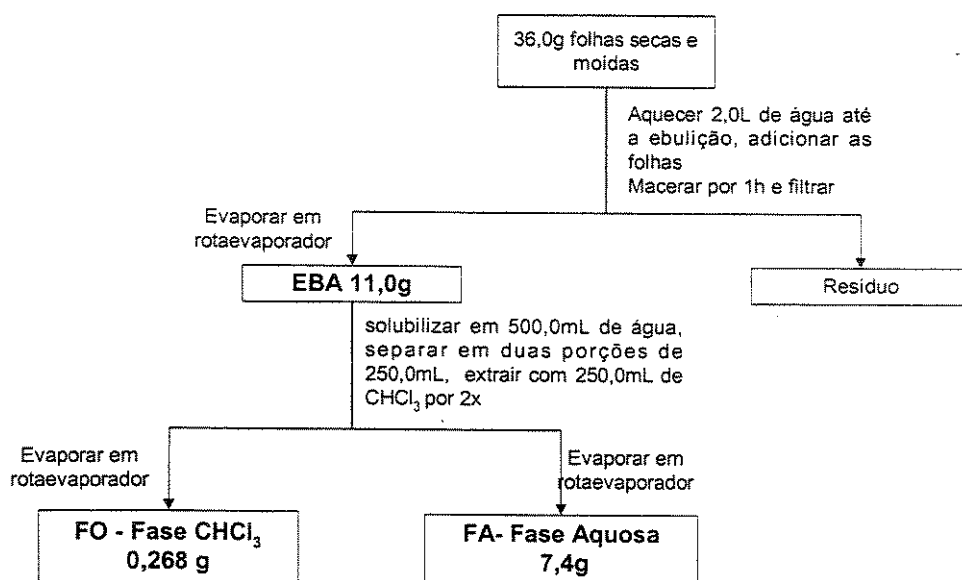
A fração F6 apresentou-se como um sólido amorfo que foi identificado como ácido cinamoilgrandiflórico. Os dados espectroscópicos (RMN ^1H e ^{13}C) estão de acordo com os valores descritos na literatura.

2.7. PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO AQUOSO (EBA) DE *M. laevigata*

Em um béquer de 4,0 L foram fervidos 2,0 L de água e após desligar-se o aquecimento, foram adicionadas 36 g de folhas secas e moídas de *M. laevigata*, sob agitação magnética. A agitação foi mantida até o resfriamento total do EBA.

Este foi evaporado em evaporador rotativo, seguido de liofilização até seca, fornecendo o EBA seco (36,6% de rendimento).

O EBA foi solubilizado em 250 mL de água e extraído inicialmente com duas porções de 250 mL de clorofórmio, fornecendo a fase de clorofórmio e a fase aquosa. A fase do clorofórmio foi evaporada a vácuo resultando na fração orgânica (FO) (0,268 g) (2,4%). A fase aquosa (FA) resultante foi evaporada e seca em estufa a vácuo, resultando uma massa de 7,40 g (20,22% de rendimento) (fluxograma 5).



FLUXOGRAMA 5: Obtenção do EBA e suas frações

3. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O extrato bruto hidroalcoólico, as frações obtidas, a cumarina, os ácidos e os ésteres diterpênicos isolados foram diluídos em etanol ou acetato de etila e analisadas por CCD. Foram utilizadas cromatoplasas prontas de alumínio, da marca *Merk* (artigo 5554) e como eluentes H:Ac (80:20). As placas foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada.

3.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA IMPREGNADA COM NITRATO DE PRATA (CCD-NP)

Para análise dos ácidos caurenóico e cupressênico, utilizou-se cromatoplaças prontas de alumínio, previamente impregnadas com uma solução de nitrato de prata 5% em metanol e como eluentes H:Ac (75:25).

A detecção dos compostos em ambas as técnicas utilizadas foi feita por irradiação com lâmpada Ultravioleta – UV a 254 e 366 nm, seguida de pulverização com uma solução de anisaldeído (ácido acético:ácido sulfúrico:anisaldeído 50,0:1,0:0,5 v/v) e aquecimento em estufa a 100°C por 5 min.

3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

O EB, as frações de interesse, cumarina e compostos ácidos e ésteres isolados de *M.laevigata* foram analisados por CG/EM num Cromatógrafo a Gás- HP 5890 série II, acoplado com um detetor seletivo de massas HP5971, equipado com uma coluna de 25m ou 30m de comprimento x 0,2mm de diâmetro x 0,33µm de espessura da marca HP ultra-2 ou HP-5. As condições de análise utilizadas foram:

Temperatura do injetor: 250°C, Detetor: 280°C, Programação: Ti = 110°C (2 min), 5°C/min; Tf = 300°C, Gás de arrase: Hélio (1,0mL/min) e Volume de injeção: 1,0µL (15-20mg/mL).

As amostras dos extratos, frações e compostos ácidos isolados foram metiladas antes das injeções. As metilações foram feitas dissolvendo-se as amostras em éter etílico ou metanol, seguido da adição de solução de diazometano a 0°C. A solução de diazometano foi preparada previamente e estocada em freezer. As substâncias que apresentarem em sua estrutura radicais de ácidos carboxílicos são metiladas aos correspondentes ésteres metílicos dos ácidos.

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS

A determinação estrutural dos compostos isolados foi feita através de métodos espectroscópicos e espectrométricos: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono 13 (RMN- ^{13}C), Espectrometria de Massas (EM) e Infravermelho (IV).

Os espectros de RMN foram obtidos a 300 MHz ou 500 MHz para hidrogênio e 77,4 MHz para C-13 em equipamento INOVA 500 (MHz). Estas análises foram realizadas na Central Analítica do IQ-UNICAMP.

5. TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

5.1. ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos *wistar* machos, com peso corporal entre 200 e 250 g. Esta espécie animal foi fornecida pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram utilizados nos experimentos, após período mínimo de sete dias de adaptação em biotério, com ciclo de claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 20°C, com água e ração *ad libitum*.

5.2. ÚLCERA INDUZIDA POR INDOMETACINA

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução de NaCl a 0,9% (solução salina) no volume de 10 mL/kg (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg (controle positivo) e os grupos com as amostras FRC, FIC, cumarina, FRA e FRE, todos na dose de 100 mg/kg.

Após 30 minutos dos tratamentos, cada animal recebeu uma injeção subcutânea de suspensão aquosa de indometacina, na dose de 30 mg/kg, segundo metodologia descrita por MORIMOTO et al. (1991).

Decorrida uma latência de 4 horas após a administração da suspensão aquosa de indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) foi calculado por meio da somatória dos parâmetros abaixo, de acordo com a metodologia descrita por GAMBERINI et al. (1991):

Até 10 petéquias	1 ponto
Até 20 petéquias	2 pontos
Até 30 petéquias	3 pontos
Úlceras de até 1 mm	*n x 2
Úlceras maiores que 1 mm	*n x 3
Hemorragia	1 ponto
Perda de pregas	1 ponto
Perda da coloração	1 ponto

* onde n refere-se ao número de lesões encontradas

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

$$\text{Inibição do ILU} = \frac{\text{Média Controle} - \text{Média Tratado} \times 100}{\text{Média Controle}}$$

5.2.1. DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% (DE₅₀)

O modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina foi utilizado para a determinação da DE₅₀ da cumarina, através da construção de uma curva dose-efeito. Para tanto, os animais foram tratados oralmente com doses crescentes de cumarina. O valor de DE₅₀ foi obtido através de cálculo de regressão linear.

5.3. ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo), outro grupo com solução aquosa de carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg (controle positivo) e os grupos com as amostras FRC, FIC, cumarina, FRA e FRE, todos na dose de 100 mg/kg.

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por ROBERT (1979).

Decorridos uma latência de 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de GAMBERINI et al. (1991), descrito anteriormente.

Este mesmo modelo experimental foi utilizado para a determinação da DE₅₀ da cumarina, da FRA e da FRE, através da construção de uma curva dose-efeito. Para tanto, os animais foram tratados oralmente com doses crescentes das amostras. O valor de DE₅₀ foi obtido através de cálculo de regressão linear.

5.4. ÚLCERA INDUZIDA POR RESERPINA

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo), outro grupo com solução aquosa de atropina, na dose de 10 mg/kg (controle positivo) e a cumarina na dose de 100 mg/kg.

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via intraperitoneal solução aquosa de reserpina, na dose de 10 mg/kg, segundo metodologia modificada de GUPTA et al. (1974).

Decorridos uma latência de 20 horas da administração de reserpina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de GAMBERINI et al. (1991), descrito anteriormente.

5.5. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e os grupos com as amostras cumarina, FRA e FRE, todos na dose de 100 mg/kg. Todos estes grupos receberam tratamento prévio com uma solução aquosa de L-NAME na dose de 5 mg/kg, por via endovenosa, com exceção de um grupo, que somente recebeu solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo-salina).

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por ROBERT (1979).

Decorridos uma latência de 1 hora após a administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de GAMBERINI et al. (1991), descrito anteriormente.

5.6. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SULFIDRÍLICAS NÃO PROTEICAS SOBRE A CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e os grupos com as amostras cumarina, FRA e FRE, todos na dose de 100 mg/kg. Todos estes grupos receberam tratamento prévio com uma solução aquosa de N-etilmaleimida na dose de 10 mg/kg, por via subcutânea, com exceção de um grupo, que somente recebeu solução salina no volume de 10mL/kg (controle negativo-salina).

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por ROBERT (1979).

Decorridos uma latência de 1 hora após a administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de GAMBERINI et al. (1991), descrito anteriormente.

5.7. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS NA CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e os grupos com as amostras cumarina, FRA e FRE, todos na dose de 100 mg/kg. Todos estes grupos receberam tratamento prévio com uma suspensão aquosa de Indometacina na dose de 5 mg/kg, por via intraperitoneal, com exceção de um grupo, que somente recebeu solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo-salina).

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por ROBERT (1979).

Decorridos uma latência de 1 hora após a administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de GAMBERINI et al. (1991), descrito anteriormente.

5.8. LIGADURA DE PILORO

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g. Após um período de 24 horas de jejum com livre acesso à água, os animais foram divididos em grupos de 7 animais, anestesiados por inalação de éter etílico. Em seguida foi realizada tricotomia na região abdominal, incisão e a ligadura do piloro com linha cirúrgica de algodão.

Logo após a ligadura, cada grupo de animais recebeu, por via intraduodenal, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg (controle positivo) e o último grupo recebeu cumarina na dose de 100 mg/Kg, que foi diluído em solução salina.

O abdômen foi então suturado e após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o abdômen foi aberto para a retirada do estômago. Segundo metodologia de SHAY et al. (1945), foi determinado o volume do conteúdo estomacal, seu pH e a quantidade de íons H^+ (mEq/L/4h), através de titulação com solução de NaOH 0,05N, utilizando-se solução a 1% de fenolftaleína como indicador. A concentração de Ácido Total em mEq/L/4h calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$[\text{total de ácido}] = \frac{\text{fator } 1,825 \times \text{Vol.de NaOH(ml)}}{\text{Vol. Gástrico (ml)}}$$

O mesmo procedimento foi adotado, porém após uma hora dos tratamentos por via intraduodenal, foram administrados, em distintos experimentos, os seguintes secretagogos: histamina, na dose de 25 mg/kg, pentagastrina, na dose de 4 µg/kg e betanecol, na dose de 2,5 mg/kg, sendo os mesmos parâmetros avaliados.

5.9 TRÂNSITO INTESTINAL

Foram utilizados camundongos *swiss* machos, pesando entre 25 e 30 g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg (controle negativo), outro grupo com solução aquosa de atropina, na dose de 3 mg/kg (controle positivo), grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução salina e o último grupo recebeu cumarina na dose de 100 mg/Kg (grupo tratado).

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral suspensão aquosa à 10% de carvão ativado, na dose de 0,1mL por animal, segundo metodologia descrita por STICKNEY & NORTHUP (1959).

Decorridos uma latência de 1 hora da administração do carvão ativado, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os intestinos retirados. Foram medidos o comprimento total do intestino e o deslocamento do carvão ativado.

O Índice do Deslocamento Intestinal (IDI) foi calculado pela diferença entre o comprimento total e o deslocamento do carvão ativado.

5.10. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

As drogas (extratos, frações princípios ativos) foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 1g/mL resultando em soluções estoques. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, evitando a atividade do DMSO.

Para a realização do teste de atividade antiproliferativa *in vitro* foram selecionadas as linhagens de células tumorais humanas de leucemia (K562), mama (MCF-7), mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas (NCI-ADR), melanoma (UACC-62), pulmão (NCI460), próstata (PCO3), cólon (HT29), ovário (OVCAR) e rim (786-0). Esses testes também foram realizados em linhagens normais de fibroblasto de pulmão de hamster (V79), fibroblasto de rim de macaco (VERO), Fibroblasto de rim de cão (MDCK) e fibroblasto de embrião de camundongo (3T3). Essas linhagens foram cultivadas em RPMI com 5% de soro fetal bovino inativado, em atmosfera de 5% de CO₂, 37°C e ambiente úmido.

Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos. Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido, para readaptação ao ambiente.

Depois desse período uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético para determinação da quantidade de células no momento da adição das drogas. Nas demais placas foram adicionadas as drogas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas por 48 horas. Após este período, as placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e fixadas com 50 μL de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão (leucemia). Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após secagem à temperatura ambiente, as placas foram coradas pela adição de 50 μL do corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %, e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente.

O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 μM e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos, e calculada a porcentagem de inibição de

crescimento. Com os dados obtidos, foram construídos gráficos relacionando a porcentagem de inibição de crescimento com a concentração da substância teste.

6. 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.

RESULTADOS

1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

1.1. OBTENÇÃO E ANÁLISE POR CCD DO EB DE *Mikania laevigata* Schutz Bip.

Extratos brutos hidroalcóolicos (EB'S) foram preparados a partir de 400g e 2000g de planta seca e moída, obtendo-se 79,1g (19,8%) e 380,0g (19,0%), respectivamente, conforme descrito no fluxograma 1, apresentado anteriormente. O EB foi analisado por CCD utilizando como eluente Hexano:Acetato de Etila (70:30). A placa quando revelada em luz Ultravioleta - UV (254 e 366 nm) evidenciou a presença de uma mancha principal com Rf de 0,41. Após revelação com solução de anisaldeído, a placa

apresentou substâncias com coloração vermelha, rosa e azul, evidenciando a presença de compostos terpênicos. A substância de Rf de 0,41 não revelou com a solução de anisaldeído, evidenciando não se tratar de um composto terpênico.

Parte do EB foi metilado com solução de diazometano e analisado por CCD. Na figura 3 está apresentada a CCD obtida para o EB e EBm de *M. laevigata*.

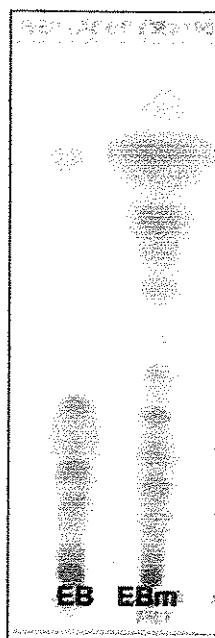


FIGURA 3: CCD do EB e EBm

A análise do EB e do EBm por CCD revelou o aparecimento de compostos menos polares no EBm, evidenciando a presença de compostos ácidos no EB.

1.2. ANÁLISE DO EB POR CG-EM

A avaliação do EBm por CG-EM (figura 4) revelou a presença de diversas substâncias que foram numeradas de 1 a 9, em de acordo com seu tempo de retenção

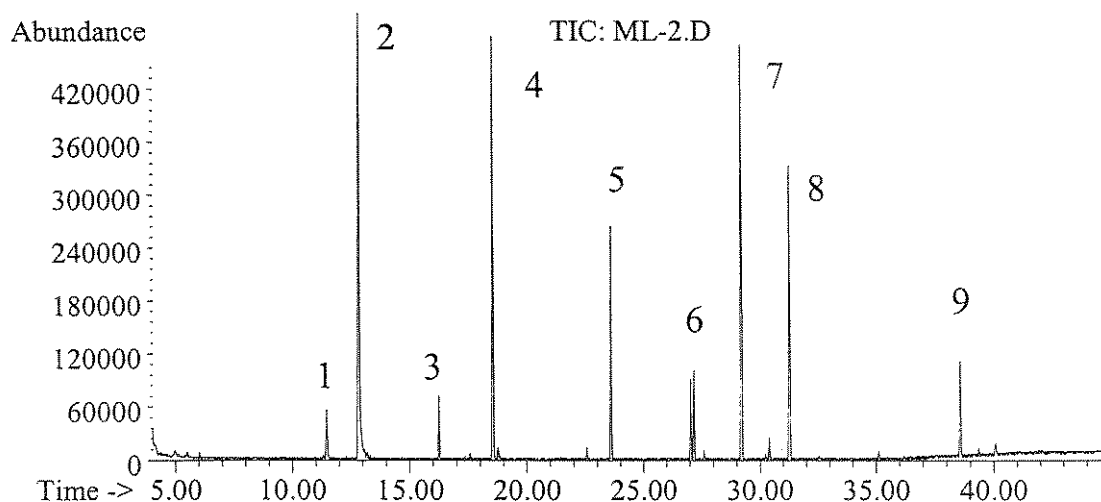


FIGURA 4: Análise por CG-EM do EB e do EBm

A identificação das substâncias foi realizada por análise dos espectros de massas e por comparação desses com os espectros de massas da espectroteca Wiley (banco de dados presente no equipamento). No espectro de massas da figura 5 foi observado um pico com tempo de retenção 11,46 min, PM = 148 que corresponde ao íon molecular. O fragmento em m/z 120 caracterizou a perda de 28 unidades de massa, atribuído do grupo C=O (PM=28). A presença de um grupo aromático pode ser confirmada pelos fragmentos em m/z 91 e 78. Esses dados confirmaram a presença da diidrocumarina (C_9H_8O – PM = 148) no EB.

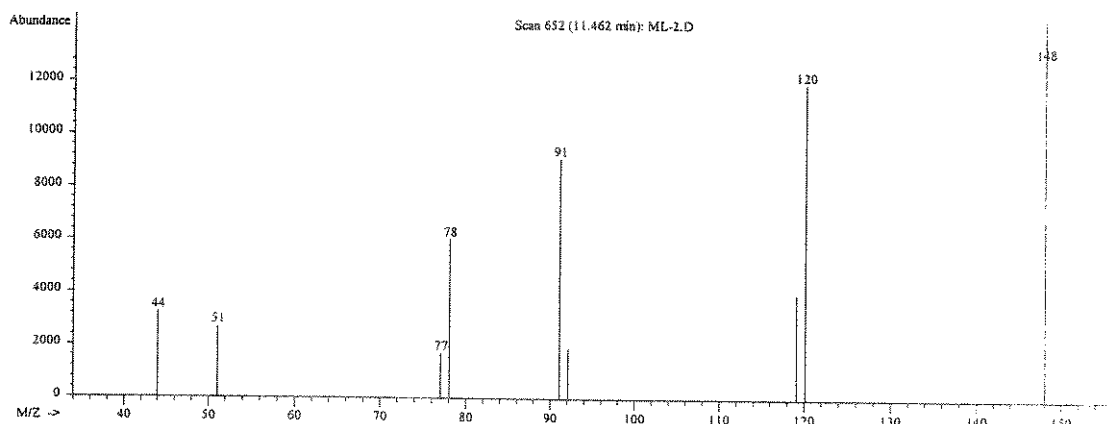


FIGURA 5: Espectro de massas do composto com tempo de retenção 11,46 min, diidrocumarina ($M^+ = 148$)

Por outro lado, a substância com tempo de retenção de 12,87 min (figura 6), apresentou o pico do íon molecular $M^+ = 146$, que corresponde a cumarina (C_9H_6O , PM=146). O fragmento em m/z 118 caracterizou a perda de 28 unidades de massa ($M^+ - CO$). A presença do grupo aromático foi confirmada pelos fragmentos em m/z 89 e 90 (C_7H_6).

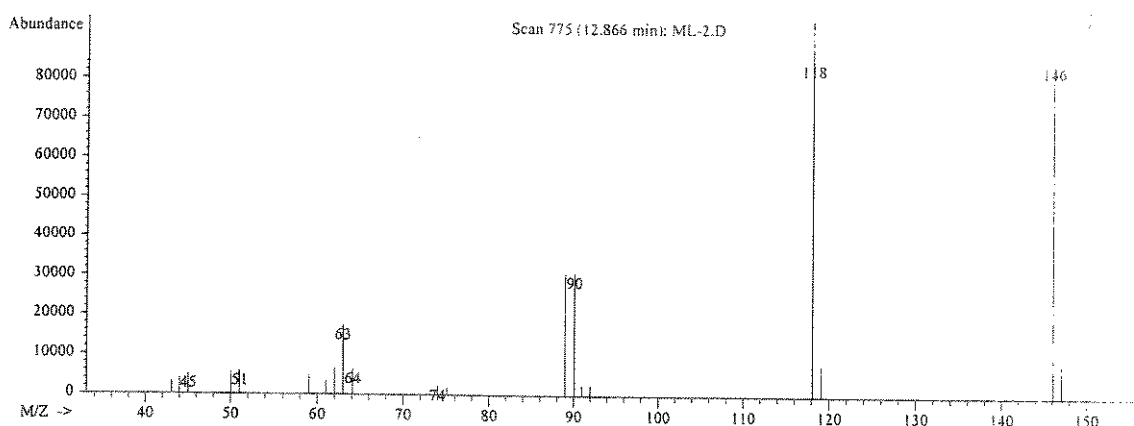
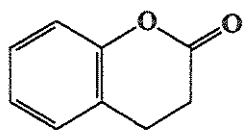


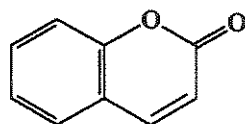
FIGURA 6: Espectro de massas do composto com tempo de retenção 12,87 min.

RESULTADOS



diidrocurmarina

(PM = 148)



cumarina

(PM = 146)

Os sinais 7 e 8 presentes no cromatograma do EBm (figuras 7 e 8) apresentaram massa molecular 316 e fragmentações características para compostos diterpênicos ácidos (C-20 – MM = 302).

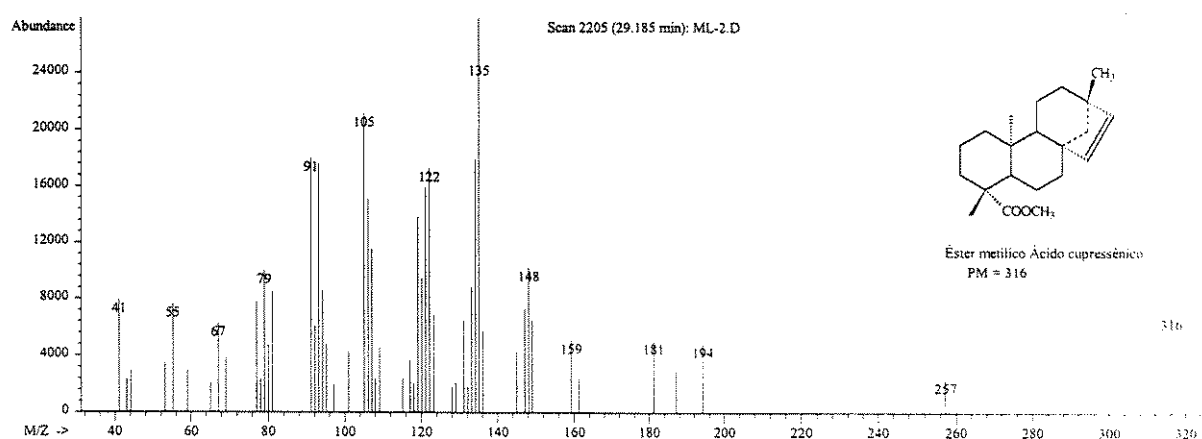


FIGURA 7: Espectro de massas do ácido cupressênico metilado $t_R = 29,18$ min.

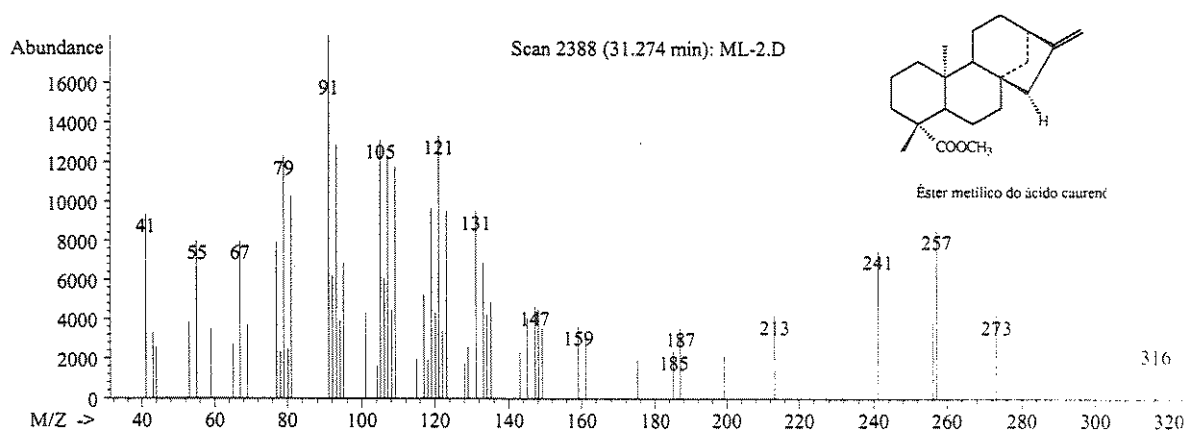


FIGURA 8: Espectro de massas do ácido caurenóico metilado $t_R = 31,27$ min.

A confirmação das estruturas dos compostos isolados foi feita a partir dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C , após isolamento dos mesmos em colunas cromatográficas.

No Quadro 1 estão apresentadas as substâncias identificadas por CG-EM no EBm.

Sinal no CG-EM	I. Retenção (min)	MM	Substância
1	11,46	148	Diidrocurmarina
2	12,87	146	Cumarina
3	16,24	220	Espatuleno
4	23,59	270	Hexadecanoato de metila
5	27,10	292	9,12,15- octadecatrienoato de metila
6	27,22	294	9,12 - octadecadienoato de metila
7	29,20	316	Éster metílico do ácido cupressésico
8	31,33	316	Éster metílico do ácido caurenóico
9	38,58	402	Éster metílico do ácido 3-metil-butil- grandiflorico

QUADRO 1: Principais substâncias do EBm de *M. laevigata* identificadas por CG-EM

1.3. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM CUMARINA (FRC) E DA FRAÇÃO ISENTA DE CUMARINA (FIC)

O EB foi submetido a um fracionamento com solução básica de NaOH 1,0N em clorofórmio segundo fluxograma 2 apresentado anteriormente, fornecendo as frações isenta em cumarina (FIC) e rica em cumarina (FRC). A fração rica em cumarina foi obtida após neutralização da fase aquosa básica com solução de HCl, seguido de extração com clorofórmio.

As frações obtidas na partição básica/ácida foram metiladas e analisadas por CG-EM e apresentaram características distintas, figuras 9 e 10. A fração denominada FIC mostrou-se isenta de cumarina ($t_R = 13,5\text{min}$) e rica nos ácidos e ésteres diterpênicos. Por outro lado, a FRC apresentou alta concentração dessa substância, conforme pode ser observado na figura 10.

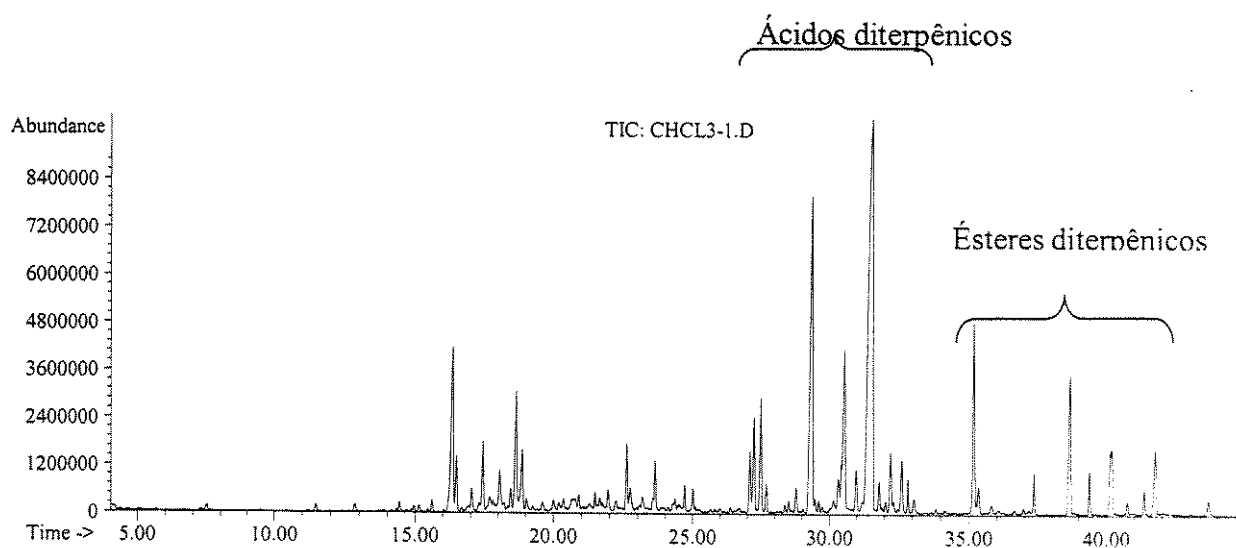


FIGURA 9: Cromatograma obtido para Fração Isenta de Cumarina (FIC) de *M. laevigata*

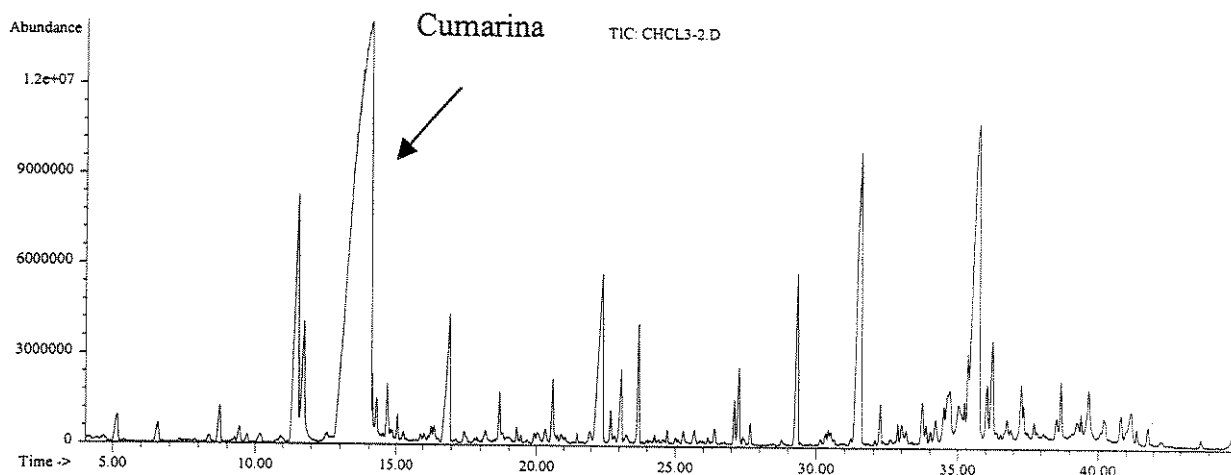


FIGURA 10 : Cromatograma obtido para Fração Rica de Cumarina (FRC) de *M. laevigata*

A fração FRC foi cristalizada em metanol a baixa temperatura, fornecendo a cumarina pura na forma de cristais brancos amorfos. A cumarina apresenta cheiro característico de baunilha e sua estrutura foi confirmada pela análise do espectro de massas e determinação do ponto de fusão.

1.4. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES RICA EM ÁCIDOS (FRA) E ÉSTERES DITERPÊNICOS (FRE)

As frações denominadas FRA e FRE, foram obtidas conforme fluxograma 3 apresentado anteriormente.

1.5. IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS CAURENÓICO E CUPRESSÊNICO A PARTIR DA FRA

A FRA foi metilada e analisada por CG-EM apresentando dois compostos que após análise dos seus espectros de massas resultaram na identificação dos ácidos cupressênico e caurenóico, que podem ser observados na figura 10.

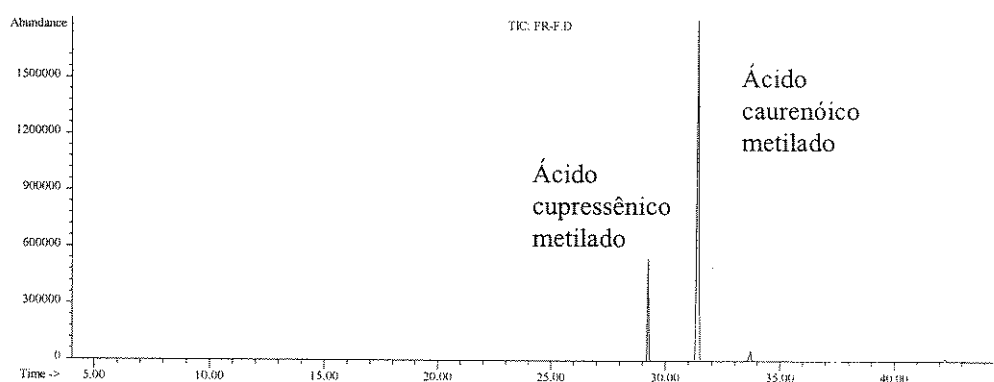


FIGURA 11: Cromatograma da FRA metilada.

O composto de índice de retenção 31,5min. foi isolado e identificado como sendo o ácido caurenóico metilado. Para o composto com tempo de retenção 29,3min., os dados obtidos sugerem que este composto seja o ácido cupressênico metilado.

A purificação dos ácidos caurenóico e cupressênico foi realizada por coluna cromatográfica impregnada com nitrato de prata, utilizando 0,90g da FRA, conforme apresentado no fluxograma 4, anteriormente.

Foram recolhidas 35 frações e analisadas por CCD e CG-EM. Devido a grande dificuldade de visualizar a separação dos ácidos por CCD, utilizou-se cromatoplaças impregnadas com nitrato de prata - CCD-NP, figura 12.

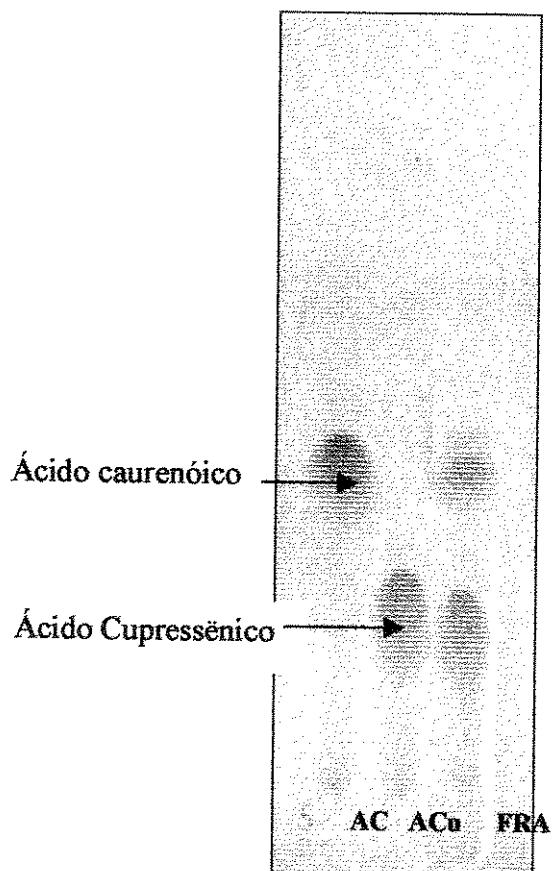


FIGURA 12: CCD-NP dos ácidos caurenóico e cupressênico

Nas figuras 13 e 14 estão apresentados os cromatogramas dos ácidos caurenóico e cupressênico metilados.

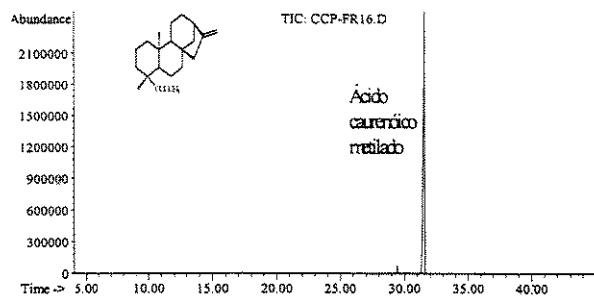


FIGURA 13: Cromatograma do ácido caurenóico metilado

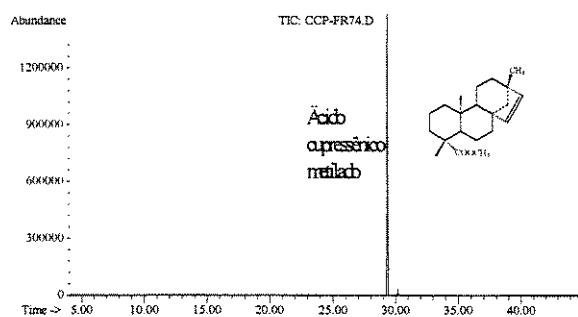


FIGURA 14: Cromatograma do ácido cupressênico metilado

A determinação da estrutura das substâncias isoladas foi realizada por métodos cromatográficos e espectroscópicos: CG-EM; RMN 1-H; RMN 13-C; IV e comparação com os dados da literatura.

1.6. IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ÉSTERES DITERPÊNICOS

A fração MLCS3, enriquecida nos ácidos e ésteres diterpênicos (FRAE), conforme fluxograma 3 apresentado anteriormente, foi metilada e analisada por CG-EM apresentando quatro compostos majoritários com massas moleculares 316 (t_R 28,4 min), 316 (t_R 30,5 min), 402 (t_R 37,8 min) e 416 (t_R 39,3 min), figura 15. Os espectros de massas dos compostos identificados como 3 e 5 correspondem aos dos ácidos cupressênico e caurenóico metilados. Os espectros de massas dos compostos identificados como 6 e 7 estão apresentados nas figuras 16 e 17

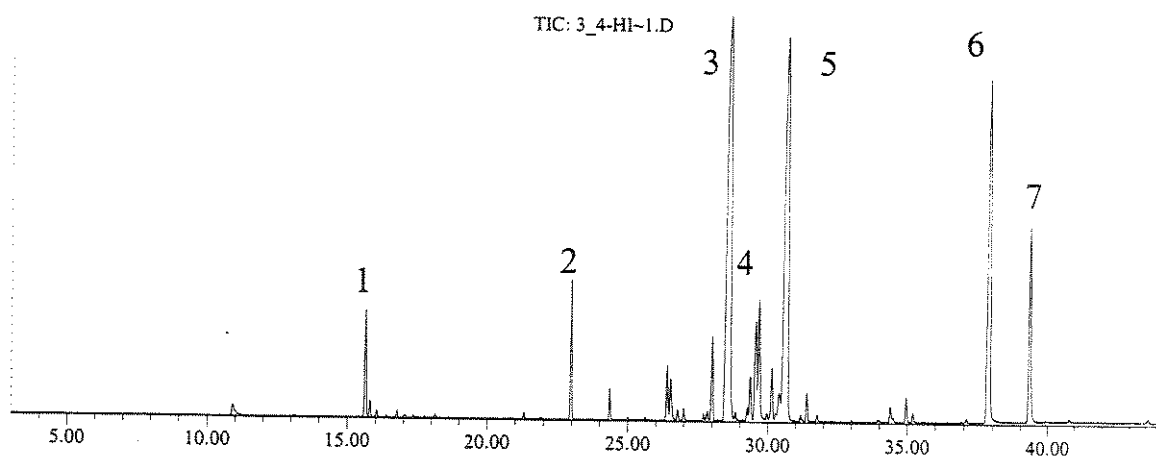


FIGURA 15: Cromatograma da fração MLCS3 metilada, enriquecida em ácidos e ésteres diterpênicos.

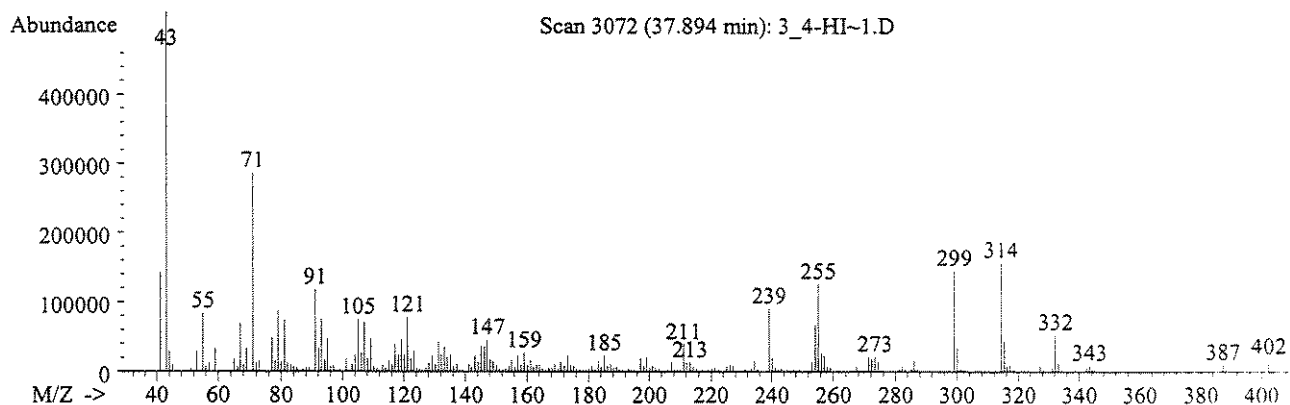


FIGURA 16: Espectro de massas do éster diterpênico metilado com MM = 402

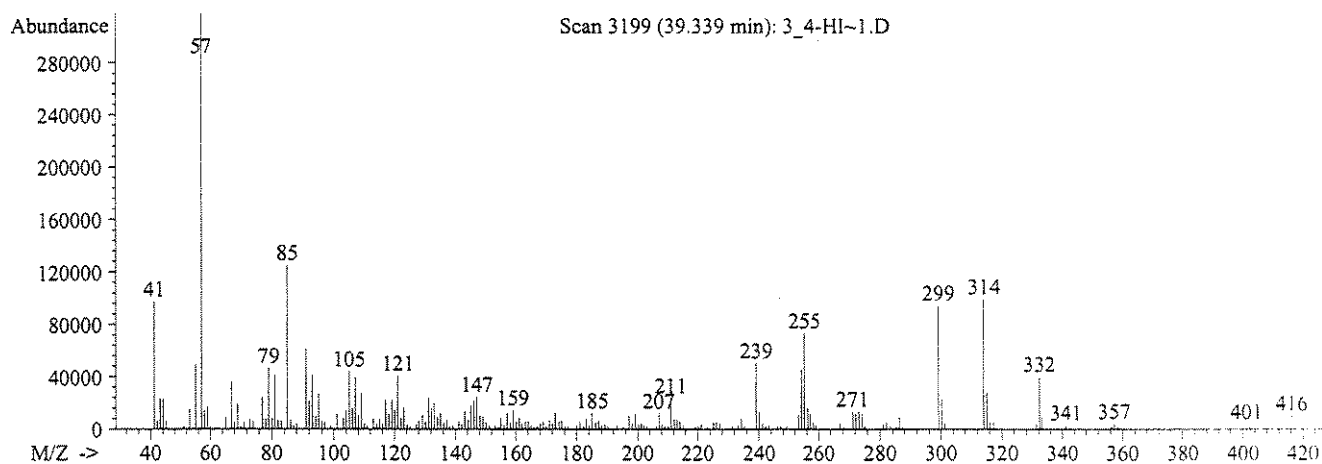


FIGURA:17: Espectro de massas do éster diterpênico metilado com MM = 416

A FRAE foi refractionada por coluna cromatográfica seca, resultando numa fração enriquecida nos ésteres diterpênicos (FRE). A análise por CG-EM da FRE metilada está apresentada na figura 18.

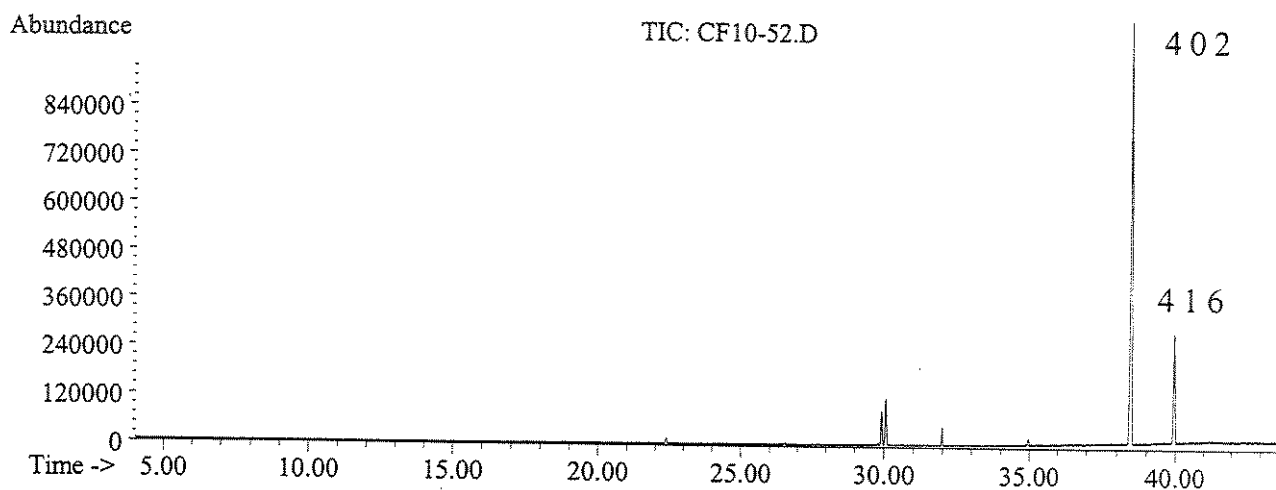


FIGURA 18: Cromatograma da FRE, contendo os ésteres diterpênicos de MM 388/402 e 402/416 metilados

De acordo com as fragmentações observadas no espectro de massas, e dados descritos na literatura, sugerimos que esse composto fosse o ácido grandiflórico de PM=318, que metilado apresenta PM=332, figura 19.

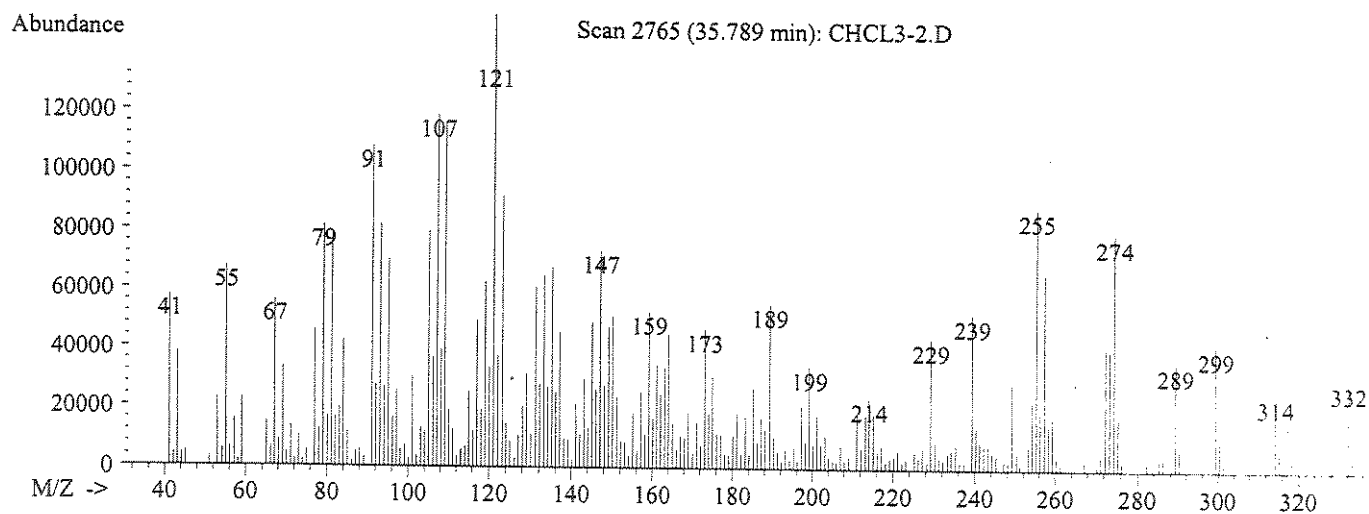


FIGURA 19: Espectro de massas do ácido grandiflórico metilado com MM = 332

A FRE foi purificada em coluna flash utilizando como eluente Hexano:Acetato de Etila (2%), sendo sua polaridade aumentada gradativamente para (5%) e (10%). As frações foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a presença de compostos semelhantes. Na figura 20 está apresentada a CCD das frações resultantes da coluna flash da FRE.

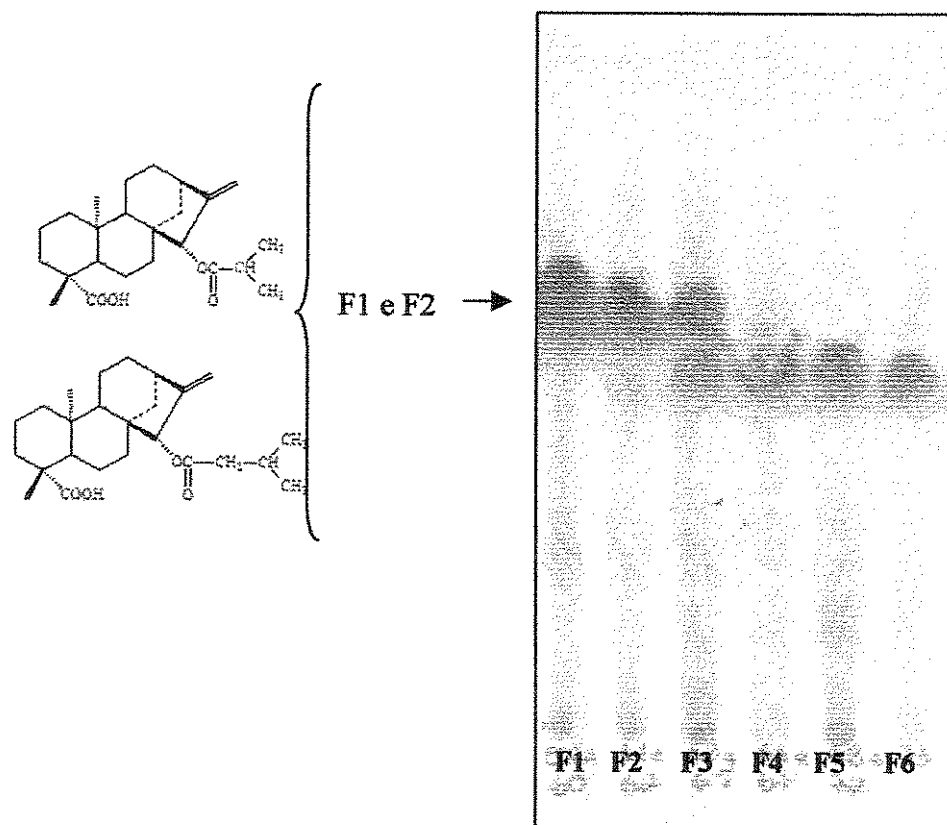
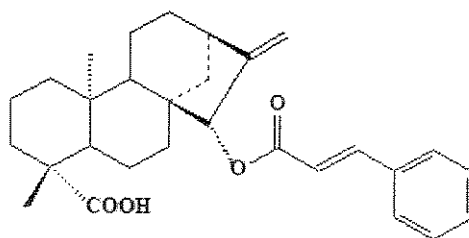


FIGURA 20: Perfil por CCD da purificação da FRE por coluna flash (Fase móvel: Hexano:AcOEt 70:30)

Pela avaliação da cromatoplaça apresentada acima, observou-se que houve uma boa separação das substâncias. As frações F1, F2 e F6 foram metiladas e analisadas por CG-EM, revelando que tanto a F1, quanto a F2 apresentaram-se como uma mistura de duas substâncias de MM 402 e 416. Os cromatogramas foram análogos ao apresentado para FRE, figura 17, ou seja, não foi possível separar os ésteres derivados do ácido grandiflórico. Por outro lado, a F6 metilada quando analisada por CG-EM não apresentou nenhum sinal no cromatograma, sugerindo que este composto não volatiliza nas condições utilizadas para análise desses compostos.

O composto isolado na fração F6 foi identificado como sendo o ácido cinamoilgrandiflórico, após análise dos espectros de RMN ^1H ; ^{13}C e Infravermelho, comparando-os com dados descritos na literatura.



Acido cinamoil grandiflórico

MM = 448

1.7 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO AQUOSO (EBA) DE *M. laevigata*

O EBA foi preparado a partir de 36g de folhas secas e moídas conforme apresentado anteriormente no Fluxograma 5, fornecendo 11,0g do EBA seco (36,6%), que foi fracionado com clorofórmio fornecendo após secagem 0,268 g (2,4%) da fração orgânica (FO) e 7,40g (20,22%) da fração aquosa (FA), respectivamente. Na figura 21 está apresentada a análise do EBA e FO por CCD

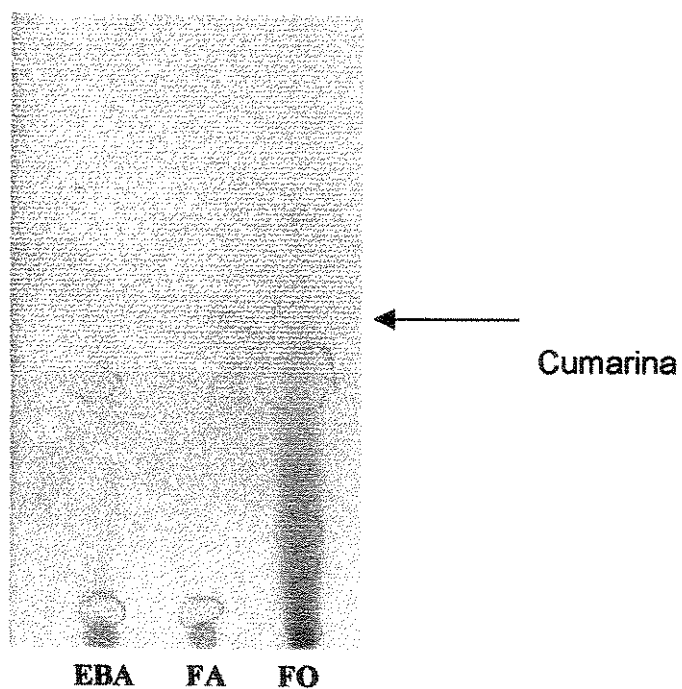


FIGURA 21: Análise por CCD do EBA, FA e FO.

A FO foi analisada por CG-EM, evidenciando a presença de cumarina (iR = 9,5 min) e alguns compostos minoritários, figura 22.

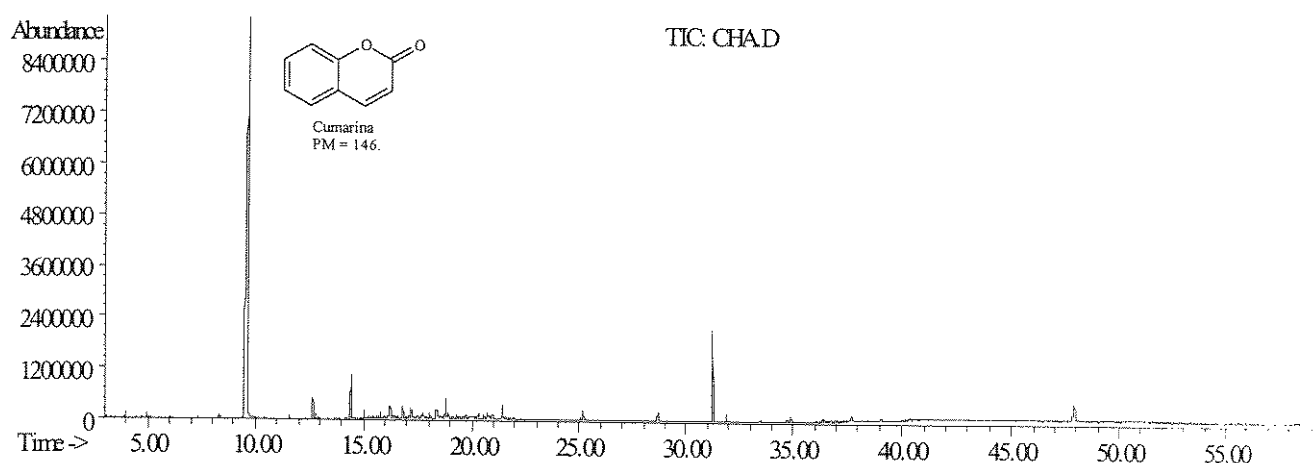


FIGURA 22: Cromatograma da FO

2. TESTES FARMACOLÓGICOS

2.1. FRAÇÃO RICA EM CUMARINA (FRC) E FRAÇÃO ISENTA DE CUMARINA (FIC) OBTIDAS DAS FOLHAS DA *Mikania laevigata* Schultz. Bip.

2.1.1. ÚLCERA INDUZIDA POR INDOMETACINA

No modelo de úlcera induzida por indometacina a FRC, administrada oralmente na dose 100 mg/kg, reduziu o índice de lesões ulcerativas (ILU) em 73%, enquanto que cimetidina, administrada pela mesma via e na dose (100 mg/kg), foi capaz de reduzir o ILU em 77%. Já a FIC não reduziu o ILU. Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Figura 23 e na Tabela 1.

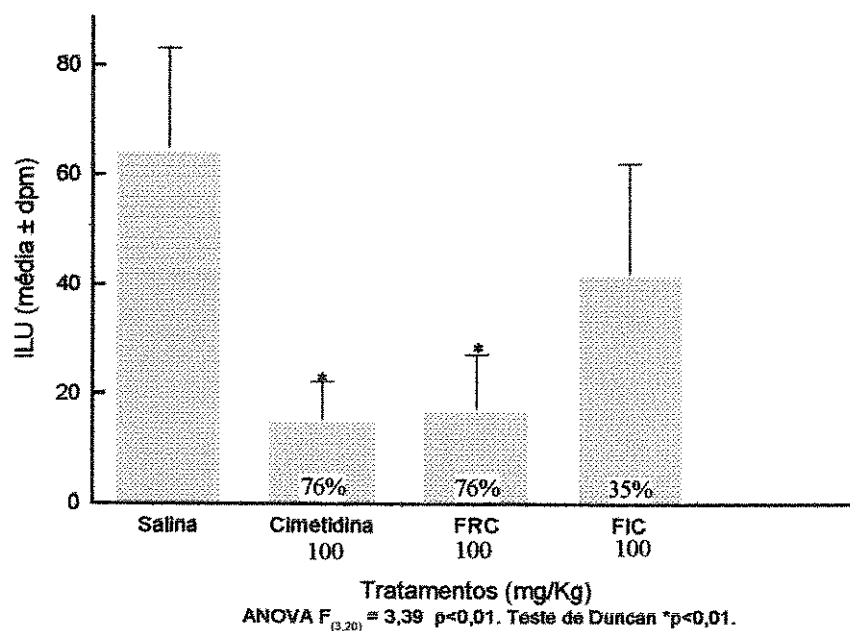


FIGURA 23: Efeito da administração oral das frações: rica em cumarina (FRC) e isenta da curmarina (FIC) da *Mikania laevigata* e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA $F_{(3,20)} = 3,39$ $p < 0,01$. Teste de Duncan $*p < 0,01$).

TABELA 1: Efeito da administração oral da FRC e da FIC da *Mikania laevigata* e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	6	64,8 ± 18,4	
Cimetidina	100	6	15,3 ± 7,0**	76,4**
FRC	100	6	17,3 ± 9,9**	73,3**
FIC	100	6	42,2 ± 19,9	34,9

ANOVA $F_{(3,20)} = 3,39$ $p < 0,01$. Teste de Duncan * $p < 0,01$.

2.1.2. ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL

No modelo de úlcera induzida por etanol a FRC e a FIC, administradas oralmente na dose 100 mg/kg, apresentaram atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição do ILU de 75% e 71%, respectivamente, enquanto que carbenoxolona, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 84%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Figura 24 e na Tabela 2.

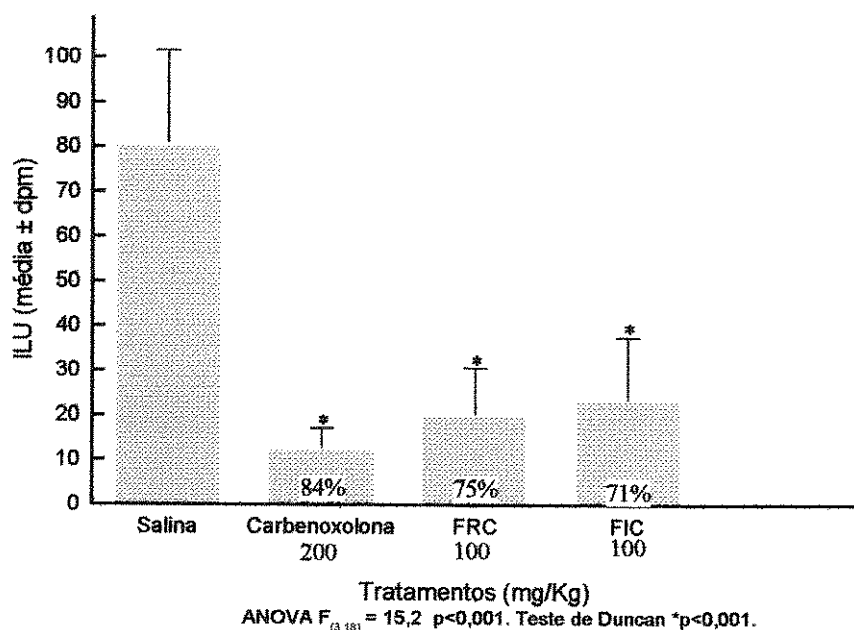


FIGURA 24: Efeito da administração oral da FRC e da FIC de *Mikania laevigata* e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA $F_{(3,18)} = 15,2$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$)

TABELA 2: Efeito da administração oral da FRC e da FIC de *Mikania laevigata* e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	6	81,0 ± 20,7	
Carbenoxolona	200	6	12,8 ± 4,2*	84,2*
FRC	100	5	20,2 ± 10,9*	75,1*
FIC	100	5	23,8 ± 13,8	70,6*

ANOVA $F_{(3,18)} = 15,2$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$.

2.2. CUMARINA ISOLADA DO EXTRATO BRUTO (EB) DAS FOLHAS SECAS E MOÍDAS DE *Mikania laevigata* Schultz. Bip.

2.2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

2.2.1.1. ÚLCERA INDUZIDA POR INDOMETACINA

No modelo de úlcera induzida por indometacina a cumarina (100 mg/kg,vo) apresentou atividade antiulcerogênica, com inibição de 90% do ILU, enquanto que cimetidina (100 mg/kg,vo) utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 78%. Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Figura 25 e na Tabela 3.

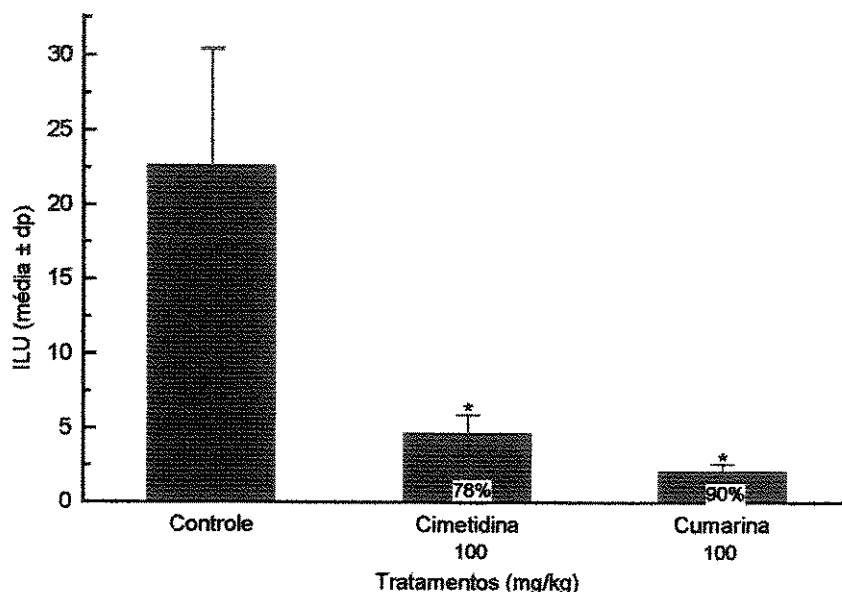


FIGURA 25: Efeito administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA: $F_{(2,12)} = 31,67$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,001$).

TABELA 3: Efeito administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	5	22,8 ± 7,6	
Cimetidina	100	5	4,8 ± 1,1*	78,2
Cumarina	100	5	2,2 ± ,4*	90,4

ANOVA $F_{(2,12)} = 31,67$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,001$.

2.2.1.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% (DE₅₀)

O efeito antiulcerogênico apresentado pela cumarina isolada do EB no modelo de úlcera induzida por indometacina, quando administrado oralmente nas doses de 10, 25, 50, 75 e 100 mg/kg, foi dose-dependente e o valor de DE₅₀, calculado por regressão linear, foi de 60,7 mg/kg. Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4: Curva Dose-Efeito administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU (média $\pm$ dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	5	22,8 $\pm$ 7,6	
	10	5	14,6 $\pm$ 8,7	35,9
	25	5	19,0 $\pm$ 7,5	16,7
Cumarina	50	5	18,6 $\pm$ 13,0	18,4
	75	5	9,4 $\pm$ 3,8*	58,8
	100	5	2,2 $\pm$ 0,4**	90,4

ANOVA $F_{(5,24)} = 4,35$ $p < 0,01$. Teste de Duncan * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

2.2.2 ÚLCERA INDUZIDA POR RESERPINA

No modelo de úlcera induzida por reserpina (Gupta et al., 1974), a cumarina na dose de 100 mg/kg (vo), produziu redução de 46% do ILU. A atropina (10 mg/kg, vo), utilizada como controle positivo, reduziu o ILU em 53%. Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média estão apresentados na Figura 26 e Tabela 5.

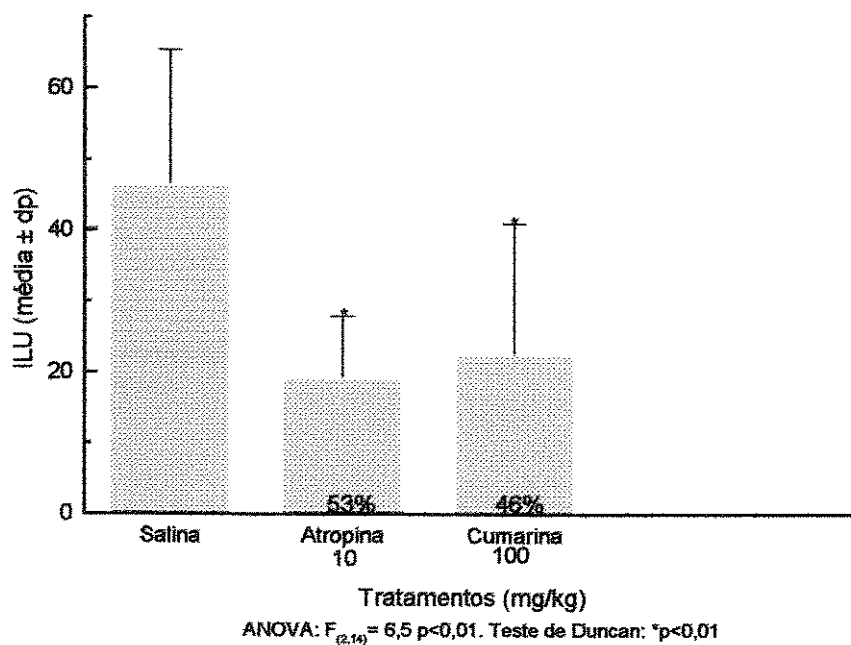


FIGURA 26: Efeito administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da atropina, em modelo de úlcera induzida por reserpina (ANOVA: $F_{(2,14)} = 6,5$ $p < 0,01$ Teste de Duncan: $*p < 0,01$)

TABELA 5: Efeito administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas da *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da atropina, em modelo de úlcera induzida por reserpina

TRATAMENTO	DOSE (mg/Kg)	N	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Salina	—	5	23,1 ± 9,1	
Atropina	10	5	10,8 ± 5,3	53,0*
Cumarina	100	5	12,4 ± 7,2	46,0*

ANOVA: $F_{(2,14)}=6,5$ $p<0,01$. Teste de Duncan: $*p<0,01$)

2.2.3. LIGADURA DO PILORO

No modelo de ligadura do piloro , a cumarina administrada por via intraduodenal, na dose 100 mg/kg, reduziu o volume da secreção gástrica e a concentração de íons H^+ , em 51% e 47%, respectivamente. A cimetidina (100 mg/kg) utilizada como controle positivo reduziu o concentração de íons H^+ em 24%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H^+ estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6: Efeito da administração intraduodenal da cumarina em modelo de ligadura do piloro de ratos

TRATAMENTO	DOSE	N	VOLUME	[H ⁺]
	(mg/Kg)		(mL)	(mEq/L)
Salina	—	5	5,5 ± 1,3	1,7 ± 0,4
Cimetidina	100	5	4,2 ± 1,5	1,3 ± 0,2*
Cumarina	100	5	2,7 ± 1,6*	0,9 ± 0,1*

ANOVA: Volume: $F_{(2,12)} = 10,26$ $p < 0,001$; H⁺: $F_{(3,16)} = 5,85$ $p < 0,01$. Teste de Duncan * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$.

2.2.4. LIGADURA DO PILORO DE RATOS TRATADOS COM HISTAMINA

No modelo de ligadura do piloro de ratos tratados com histamina (25 mg/kg) por via intraperitoneal, a cumarina administrada no duodeno (100 mg/kg), não alterou nem o volume da secreção gástrica nem a concentração de íons H⁺. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H⁺ estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7: Efeito da administração intraduodenal da cumarina em modelo de ligadura do piloro em ratos tratados previamente com histamina

TRATAMENTO	DOSE	N	VOLUME	[H ⁺]
	(mg/Kg)		(mL)	(mEq/L)
Salina	—	5	2,8 ± 1,4	1,9 ± 0,3
Cimetidina	100	5	1,0 ± 0,4*	1,2 ± 0,5*
Cumarina	100	5	1,9 ± 0,8	1,8 ± 0,1

ANOVA: Volume: F(2,12) = 3,53 p<0,05; H⁺: F(3,16)= 3,04 p<0,05. Teste de Duncan

*p<0,05.

2.2.5. LIGADURA DO PILORO EM RATOS TRATADOS COM PENTAGASTRINA

Neste mesmo modelo de ligadura do piloro em ratos, porém tratados previamente com pentagastrina na dose de 4µg/kg por via endovenosa, a cumarina, administrada no duodeno (100 mg/kg), reduziu o volume da secreção gástrica em 39%, mas não alterou a concentração de íons H⁺. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H⁺ estão demonstrados na Tabela 8.

TABELA 8: Efeito da administração intraduodenal da cumarina em modelo de ligadura do piloro em ratos tratados previamente com pentagastrina

TRATAMENTO	DOSE	N	VOLUME	[H ⁺]
	(mg/Kg)		(mL)	(mEq/L)
Salina	—	5	3,3 ± 1,0	1,1 ± 0,5
Cimetidina	100	5	1,9 ± 0,6*	0,5 ± 0,2*
Cumarina	100	5	2,0 ± 0,7*	1,08 ± 0,6

ANOVA: Volume: $F_{(2,12)} = 5,16$ $p < 0,01$; H⁺: $F_{(3,16)} = 5,85$ $p < 0,05$. Teste de Duncan * $p < 0,01$.

2.2.6. LIGADURA DO PILORO EM RATOS TRATADOS COM BETANECOL

Já com a administração prévia de betanecol na dose de 1,5 mg/kg por via intraperitoneal, a cumarina, administrada no duodeno na dose 100 mg/kg, reduziu o volume da secreção gástrica e a concentração de íons H⁺ em 66% e 39%, respectivamente. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H⁺ estão demonstrados na Tabela 9.

TABELA 9: Efeito da administração intraduodenal da cumarina em modelo de ligadura do piloro em ratos tratados previamente com betanecol

TRATAMENTO	DOSE	N	VOLUME	[H ⁺]
	(mg/Kg)		(mL)	(mEq/L)
Salina	—	5	10,8 ± 3,5	1,3 ± 0,5
Atropina	10	5	0,6 ± 0,2**	0,7 ± 0,2*
Cumarina	100	5	3,7 ± 1,0**	0,8 ± 0,1*

ANOVA: Volume: $F_{(2,12)} = 18,04$ $p < 0,001$; H^+ : $F_{(3,16)} = 4,17$ $p < 0,05$. Teste de Duncan * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

2.2.6. TRÂNSITO INTESTINAL

Neste modelo experimental (Stickney & Northup, 1959), o EB administrado oralmente na dose de 1,0g/Kg e a cumarina (100 mg/kg, vo), reduziram o índice de deslocamento intestinal (IDI) em 72% e 37%, respectivamente. A atropina (3 mg/kg,vo), utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o IDI em 38%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média estão apresentados na Figura 27 e Tabela 10.

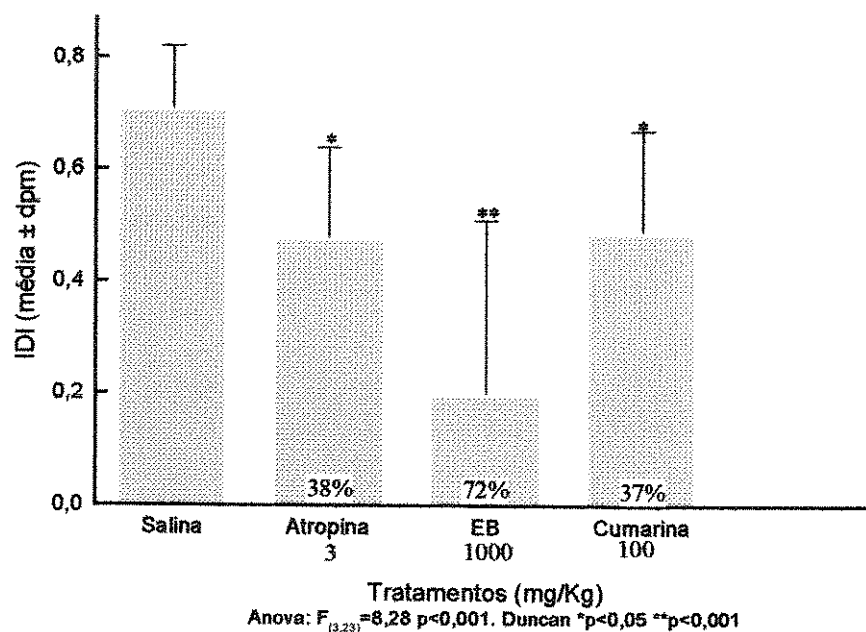


FIGURA 27: Efeito da administração oral do EB e da cumarina obtidos das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da atropina, em modelo de trânsito intestinal (ANOVA: $F(3,23) = 8,28$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$).

TABELA 10: Efeito da administração oral do EB e da cumarina obtidos das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da atropina, em modelo de trânsito intestinal

TRATAMENTO	DOSE (mg/Kg)	N	IDI (média±dp)	Inibição do IDI (%)
Salina	—	5	71,0 ± 0,11	
Atropina	3	5	44,0± 0,14*	38,0*
Cumarina	100	5	45,0± 0,18*	37,0*
EB	1000	5	20,0 ± 0,31**	72,0**

ANOVA: F(3,23) = 8,28 p<0,001. Teste de Duncan *p<0,05 ** p< 0,001.

2.3 FRAÇÃO RICA EM ÁCIDOS DITERPÊNICOS (FRA) E FRAÇÃO RICA EM ÉSTERES DITERPÊNICOS (FRE) OBTIDAS DO EXTRATO BRUTO (EB) DAS FOLHAS SECAS E MOÍDAS DE *Mikania laevigata* Schultz. Bip.

2.3.1 ÚLCERA INDUZIDA POR INDOMETACINA

No modelo de úlcera induzida por indometacina a FRA e a FRE, administradas oralmente na dose 100 g/kg, apresentaram atividade antiulcerogênica, ambas com uma porcentagem de inibição de 32% do ILU enquanto que a cimetidina, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg, foi capaz de reduzir o ILU em 75%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU estão apresentados na Figura 28 e na Tabela 11.

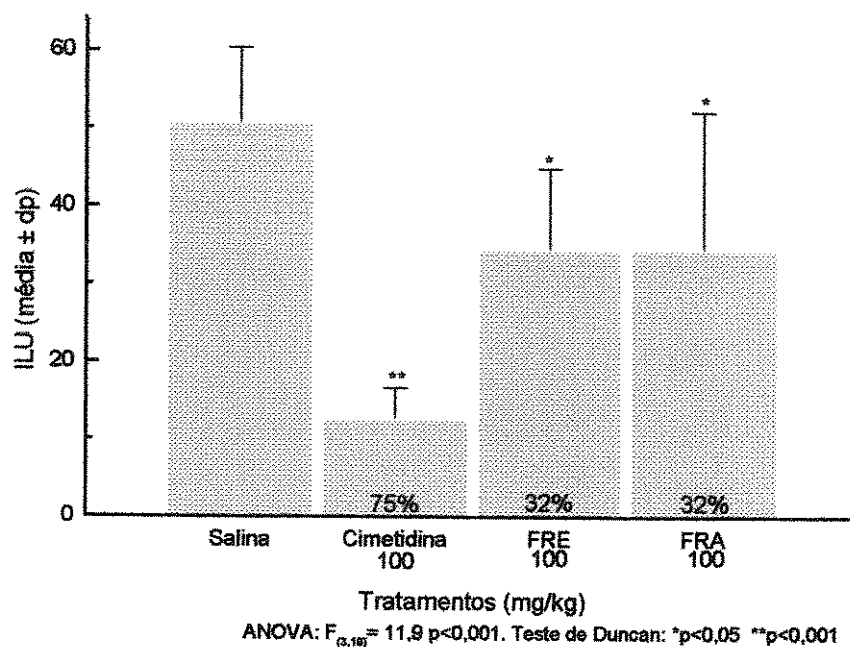


FIGURA 28: Efeito da administração oral da FRA e da FRE obtidas do EB de Mikania laevigata e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA $F_{(3,18)} = 11,99$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

TABELA 11: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de Mikania laevigata e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	6	50,8 ± 9,5	
Cimetidina	100	6	12,8 ± 3,8**	75,0**
FRA	100	6	34,6 ± 17,6*	32,0*
FRE	100	6	34,6 ± 10,3*	32,0*

ANOVA $F_{(3,18)} = 11,99$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

2.3.2 ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL

2.3.2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCEROGÊNICA

No modelo de úlcera induzida por etanol a FRA e a FRE, administradas oralmente na dose 100 mg/kg, apresentaram atividade antiúlcero gênica, com uma porcentagem de inibição de 41% e 68%, respectivamente, enquanto que carbenoxolona (200 mg/kg,vo), utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 86%. Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Figura 29 e na Tabela 12.

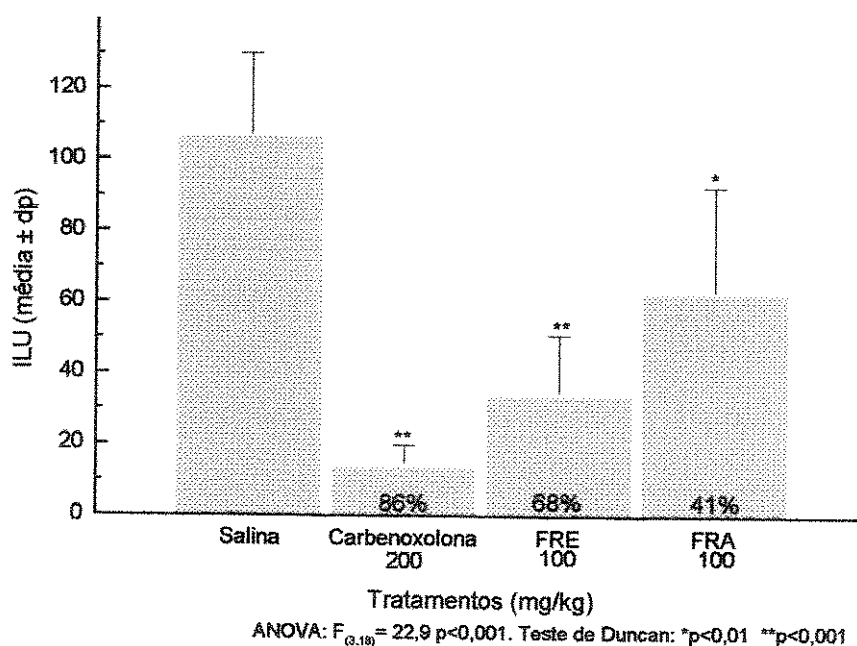


FIGURA 29: Efeito da administração oral da FRA e da FRE obtidas do EB de Mikania laevigata e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA $F(3,18) = 22,98$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$).

TABELA 12: Efeito da administração oral da FRA e da FRE obtidas do EB de Mikania laevigata e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	5	106,7 ± 23,3	
Carbenoxolona	200	5	14,5 ± 5,3**	86,0**
FRA	100	4	63,0 ± 29,4*	41,0*
FRE	100	5	34,4 ± 16,4**	68,0*

ANOVA F(3,18) = 22,98 p<0,001. Teste de Duncan *p<0,01, **p<0,001.

2.3.2.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% (DE₅₀)

O efeito antiulcerogênico apresentado pela FRA e pela FRE obtidas do EB no modelo de úlcera induzida por etanol, quando administradas por via oral nas doses de 25, 50, 100, 200 e 300 mg/kg, foi dose-dependente e o valor de DE₅₀, calculado por regressão linear, foi de 152,4 mg/kg e de 119,32 mg/Kg, respectivamente. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU estão demonstrados nas Tabela 13 e 14.

TABELA 13: Atividade antiulcerogênica da fração FRA obtida do EB das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	5	73,0 ± 3,5	—
	25	5	58,5 ± 13,8	20%
	50	5	68,0 ± 13,6	7%
FRA	100	4	52,0 ± 23,1*	29%
	200	5	43,8 ± 7,0**	40%
	300	5	36,2 ± 13,2**	59%

ANOVA $F_{(5,21)} = 5,31$ $p < 0,01$. Teste de Duncan * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

TABELA 14: Atividade antiulcerogênica da fração da FRE obtida do EB das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	5	79,0 ± 9,6	—
	25	5	71,6 ± 16,7	10%
	50	5	72,0 ± 10,2	9%
FRE	100	5	32,0 ± 15,8*	59%
	200	5	40,0 ± 8,4*	49%

ANOVA $F_{(4,21)} = 14,81$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,001$.

2.3.3 ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de L-NAME (5 mg/kg, ev), a FRA e a FRE administradas por via oral na dose de 100mg/kg, mantiveram a atividade antiulcerogênica apresentada anteriormente, inibindo o índice de lesões ulcerativas em 59% e 40%, respectivamente. Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média do ILU estão apresentados na Figura 30 e na Tabela 15.

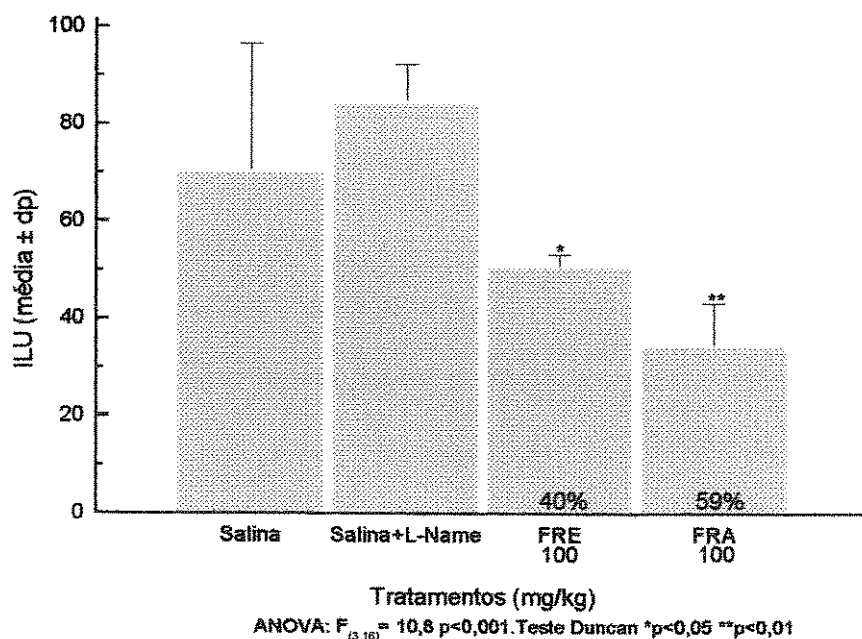


FIGURA 30: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de Mikania laevigata, após tratamento prévio com L-Name, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA $F_{(3,16)} = 10,8$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

TABELA 15: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de *Mikania laevigata*, após tratamento prévio com L-Name, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Salina	—	5	70,4 ± 26,1	
Salina + L-Name		5	84,8 ± 7,4	
FRA	100	5	34,4 ± 8,7**	46,0**
FRE	100	5	50,6 ± 2,5*	40,0*

ANOVA F(3,16) = 10,8 p<0,001. Teste de Duncan *p<0,05 **p<0,01.

2.3.4 ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS NA CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de indometacina na dose de 5 mg/kg por via intraperitoneal, a FRA e a FRE na dose de 100mg/kg (vo), mantiveram a atividade antiulcerogênica apresentada anteriormente, inibindo o índice de lesões ulcerativas em 46% e 39%, respectivamente. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU estão apresentados na Figura 31 e na Tabela 16.

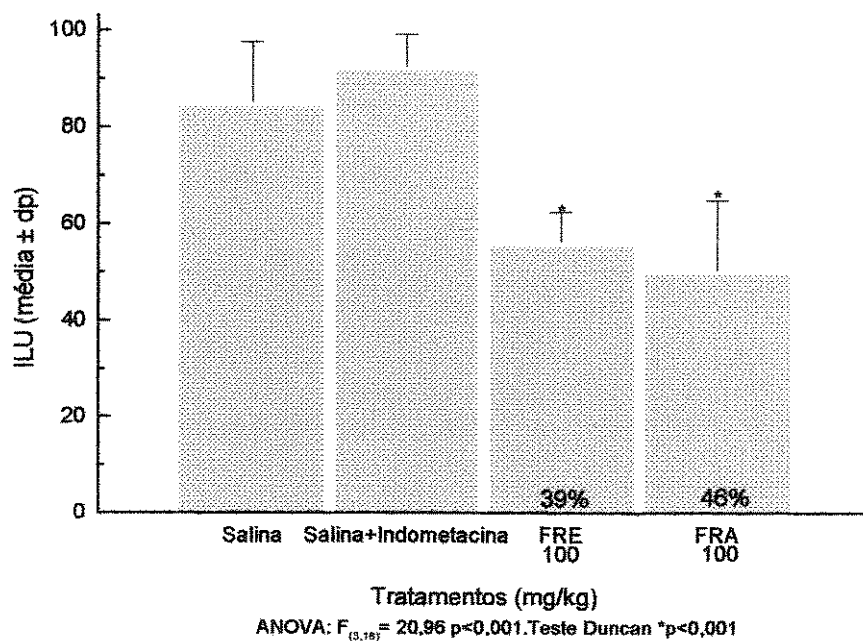


FIGURA 31: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de Mikania laevigata, após tratamento prévio com Indometacina, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA $F_{(3,18)} = 20,96$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,001$).

TABELA 16: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de *Mikania laevigata*, após tratamento prévio com Indometacina, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Salina	—	5	85,0 ± 12,6	
Salina + Indometacina		5	92,5 ± 6,8	
FRA	100	5	50,2 ± 14,7*	46,0*
FRE	100	5	56,2 ± 6,3*	39,0*

ANOVA $F(3,18) = 20,96$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,001$.

2.3.5 ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SULFIDRÍLICAS NÃO PROTEICAS SOBRE A CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de N-etilmaleimida (NEM) na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal, a FRA e a FRE na dose de 100 mg/kg (vo), não reduziram o índice de lesões ulcerativas. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU estão apresentados na Figura 32 e na Tabela 17.

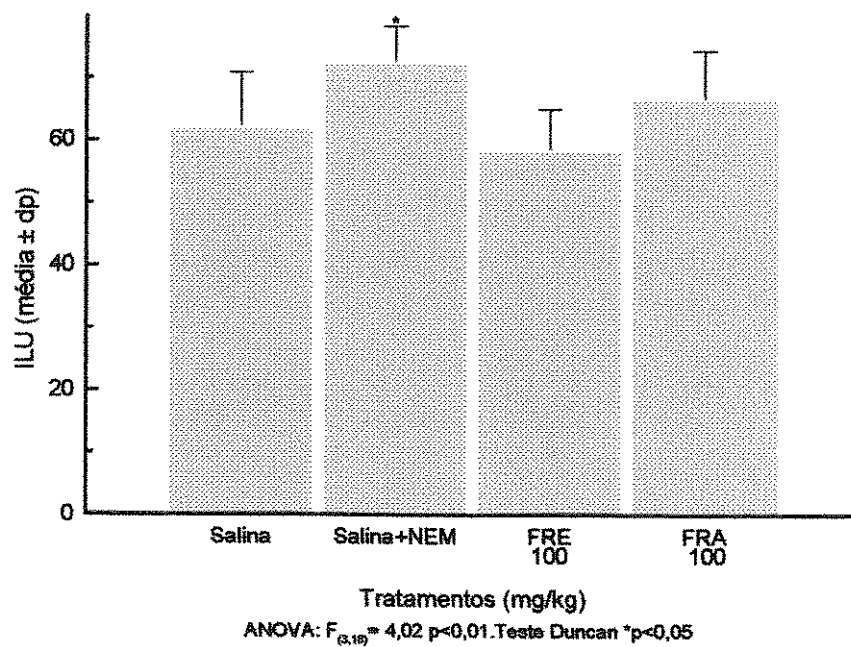


FIGURA 32: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de *Mikania laevigata*, após tratamento prévio com NEM, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA $F_{(3,16)} = 4,02$ $p > 0,05$).

TABELA 17: Efeito da administração oral da FRA e da FRE isoladas do EB de *Mikania laevigata*, após tratamento prévio com NEM, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Salina	—	6	62,5 ± 8,4	—
Salina + Nem		6	72,7 ± 5,5	—
FRA	100	5	66,8 ± 7,6	—
FRE	100	5	58,8 ± 6,3	5,9

ANOVA F(3,16) = 4,02 p>0,05.

2.4. EXTRATO BRUTO AQUOSO (EBA) OBTIDO DAS FOLHAS SECAS E MOÍDAS da *Mikania laevigata* Schultz. Bip.

2.4.1 ÚLCERA INDUZIDA POR INDOMETACINA

No modelo de úlcera induzida por indometacina o extrato bruto aquoso (EBA), por via oral na dose 1000 mg/kg, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição de 51%, enquanto que cimetidina, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg, foi capaz de reduzir o ILU em 77%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Figura 33 e na Tabela 18.

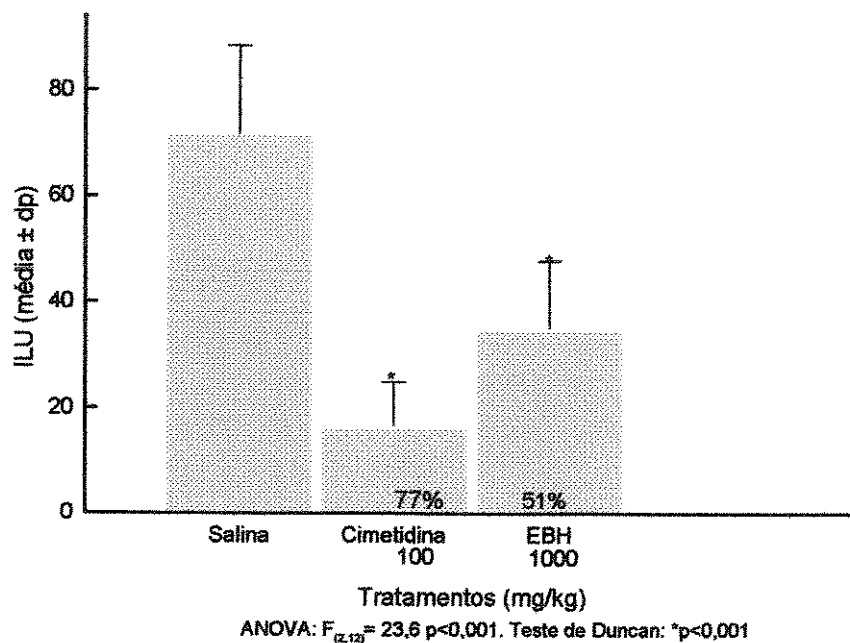


FIGURA 33: Efeito da administração oral do EBA de *Mikania laevigata* e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA $F_{(2,12)} = 23,6$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$).

TABELA 18: Efeito da administração oral do EBA de *Mikania laevigata* e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	5	71,8 ± 16,6	
Cimetidina	100	5	16,6 ± 8,3*	76,9*
EBA	1000	5	35,3 ± 12,5*	50,6*

ANOVA $F_{(2,12)} = 23,6$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$.

2.4.2 ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL

No modelo de úlcera induzida por etanol o EBA, administrado por via oral na dose 1000 mg/kg, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição de 78%, enquanto que carbenoxolona (200 mg/kg,vo), utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 84%. Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Figura 34e na Tabela 19.

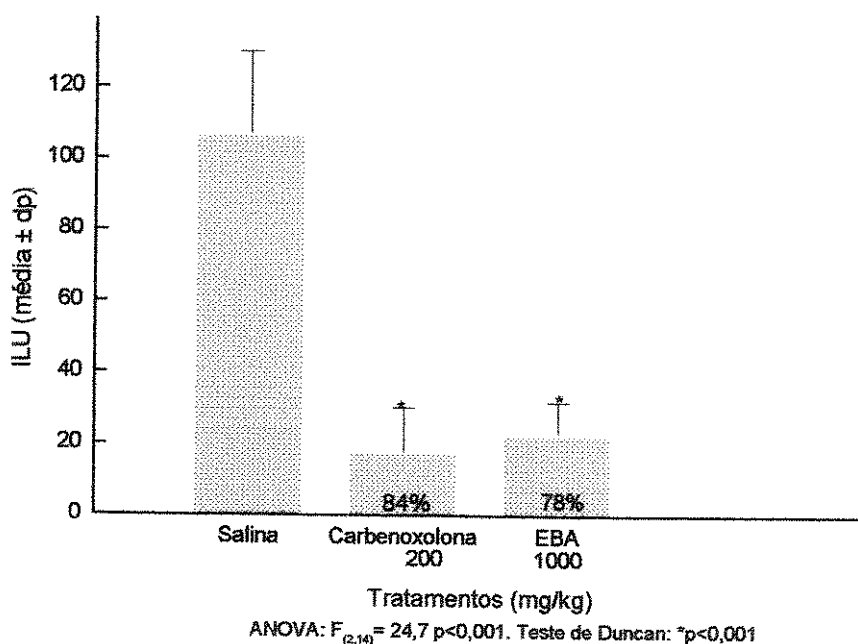


FIGURA 34: Efeito da administração oral do EBA da *Mikania laevigata* e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA $F_{(2,14)} = 24,66$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$).

TABELA 19: Efeito da administração oral do EBA da *Mikania laevigata* e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	6	106,7 ± 23,3	
Carbenoxolona	200	6	17,5 ± 12,6*	83,6**
EBA	1000	5	23,0 ± 8,7*	78,4*

ANOVA $F_{(2,14)} = 24,66$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,001$.

2.5. FRAÇÃO AQUOSA (FA) E FRAÇÃO ORGÂNICA (FO) OBTIDAS DO EBA DAS FOLHAS SECAS E MOÍDAS DE *Mikania laevigata* Schultz. Bip.

2.5.1 ÚLCERA INDUZIDA POR INDOMETACINA

No modelo de úlcera induzida por indometacina a FO, administrada por via oral na dose 100 mg/kg, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição de 72%, enquanto que cimetidina (100 mg/kg,vo) utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 70%. Já a FA não reduziu o ILU.

Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Figura 35 e na Tabela 20.

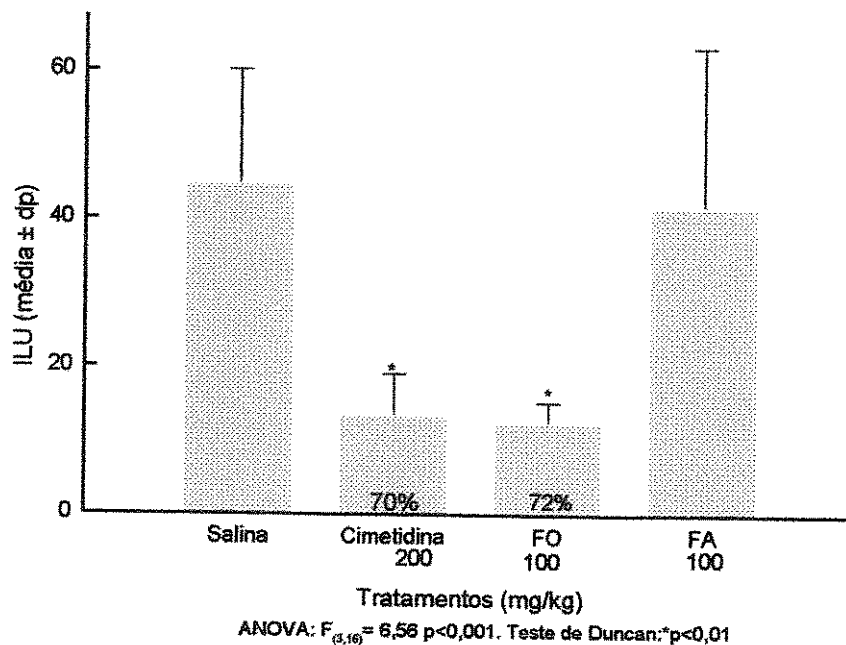


Figura 35: Efeito da administração oral da FA e FO obtidas do EBH de *Mikania laevigata* e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina (.ANOVA $F_{(3,16)} = 6,56$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,01$).

TABELA 20: Efeito da administração oral da FA e FO obtidas do EBA de *Mikania laevigata* e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	5	44,9 ± 15,2	
Cimetidina	100	5	13,6 ± 5,4*	70,0*
FO	100	5	12,6 ± 2,6*	71,9*
FA	100	5	42,0 ± 21,2	6,5

ANOVA $F_{(3,16)} = 6,56$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,01$.

2.5.2. ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL

No modelo de úlcera induzida por etanol a FO e a FA, administradas oralmente na dose 100 mg/kg, apresentaram atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição de 76% e 21% respectivamente. A carbenoxolona, administrada pela mesma via na dose de (200 mg/kg,vo), utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 83%.

Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média do ILU estão demonstrados na Figura 36 e na Tabela 21.

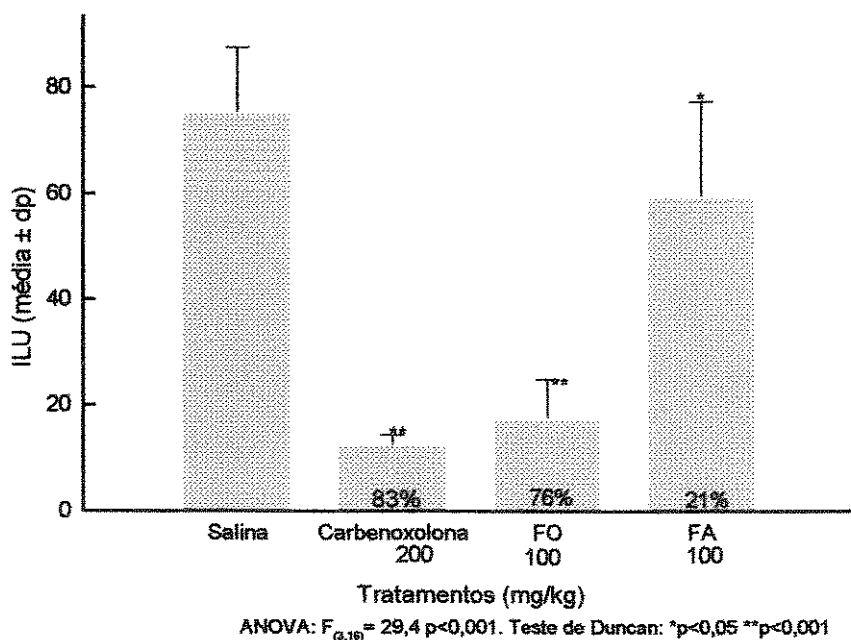


Figura 36: Efeito da administração oral da FA e FO obtidas do EBA de *Mikania laevigata* e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA $F_{(3,16)} = 29,4$ $p < 0,001$. Teste de Duncan ** $p < 0,001$ * $p < 0,05$).

TABELA 21: Efeito da administração oral da FO e da FA obtidas do EBH da *Mikania laevigata* e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	5	75,4 ± 12,1	
Carbenoxolona	200	5	12,8 ± 1,5*	83,0**
FO	100	5	17,8 ± 7,1*	76,4**
FA	100	5	59,6 ± 17,8*	21,0*

ANOVA $F_{(3,16)} = 29,4$ $p < 0,001$. Teste de Duncan ** $p < 0,001$ * $p < 0,05$.

2.6. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Em cultura de células tumorais humanas o extrato bruto hidroalcoólico produziu inibição de crescimento e morte celular de forma concentração-dependente, para a maioria das linhagens e com seletividade para as linhagens de leucemia e ovário (figura 37) As frações rica em ácidos (FRA) e rica em ésteres (FRE) produziram inibição de crescimento e morte celular, mas sem qualquer seletividade (figuras 38 e 39). Em cultura de células normais de linhagens de fibroblasto, O EB, a FRA e a FRE produziram efeito semelhante, com inibição de crescimento e morte para a maioria das linhagens (figuras 40, 41 e 42).

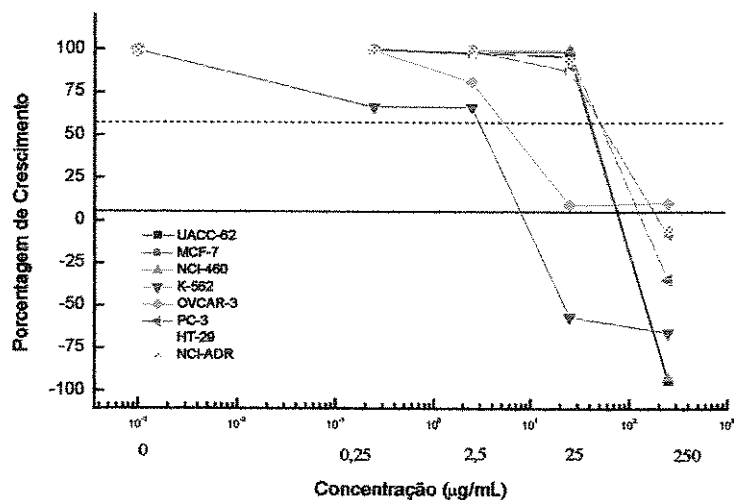


FIGURA 37: Curva concentração resposta da atividade antiproliferativa de EB de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., sobre o crescimento de linhagens celulares tumorais humanas, após 48 h de exposição.

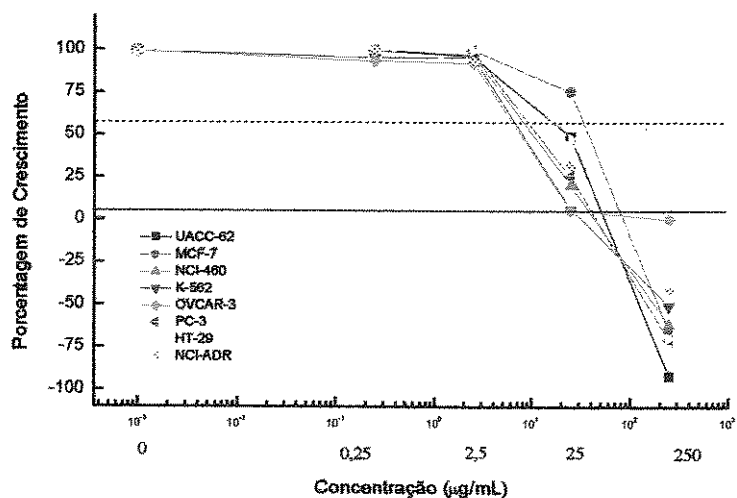


FIGURA 38: Curva concentração resposta da atividade antiproliferativa de FRA de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., sobre o crescimento de linhagens celulares tumorais humanas, após 48 h de exposição.

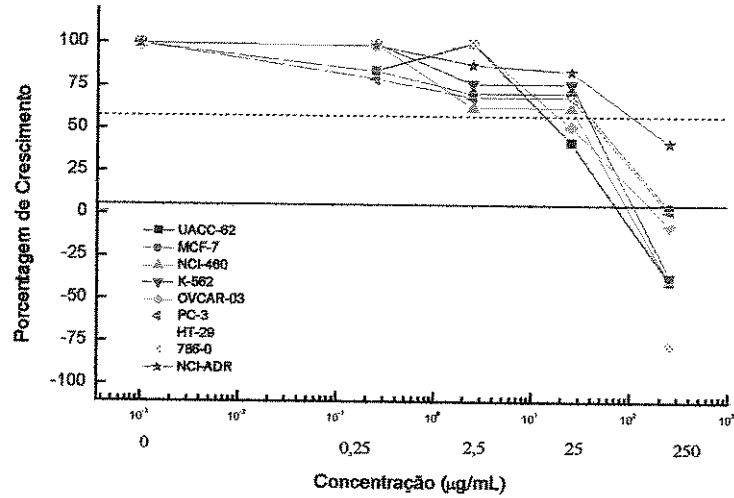


FIGURA 39: Curva concentração resposta da atividade antiproliferativa de FRE de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., sobre o crescimento de linhagens celulares tumorais humanas, após 48 h de exposição.

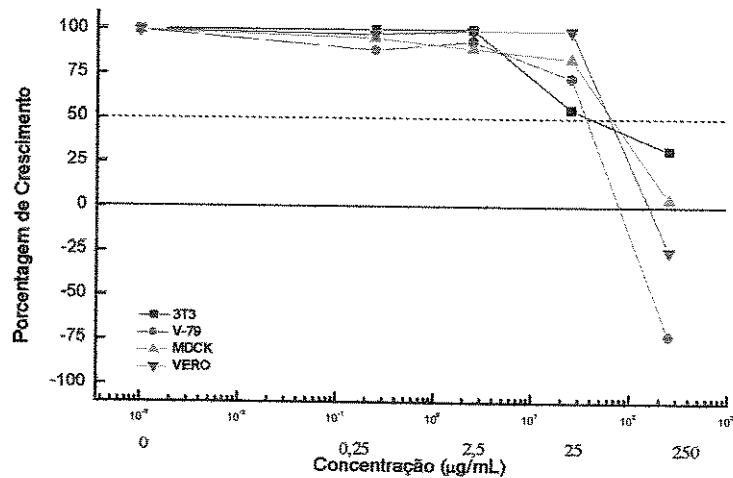


FIGURA 40: Curva concentração resposta da atividade citotóxica de EB de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., sobre o crescimento de linhagens celulares normais (fibroblastos), após 48h de exposição.

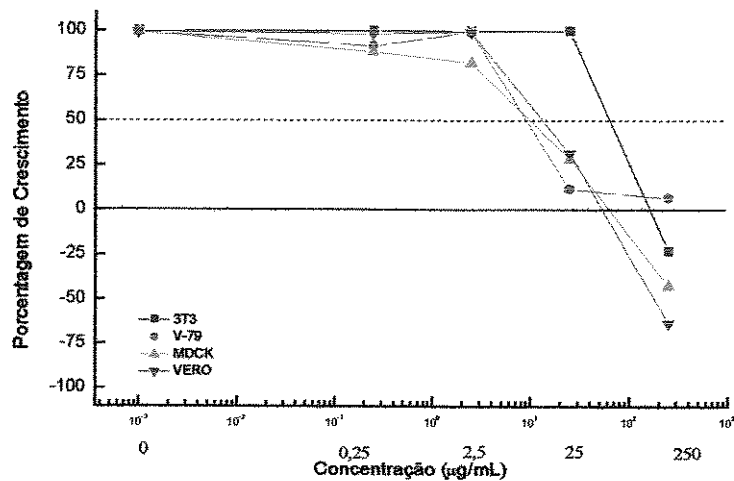


FIGURA 41: Curva concentração resposta da atividade citotóxica de FRA de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., sobre o crescimento de linhagens celulares normais (fibroblastos), após 48h de exposição.

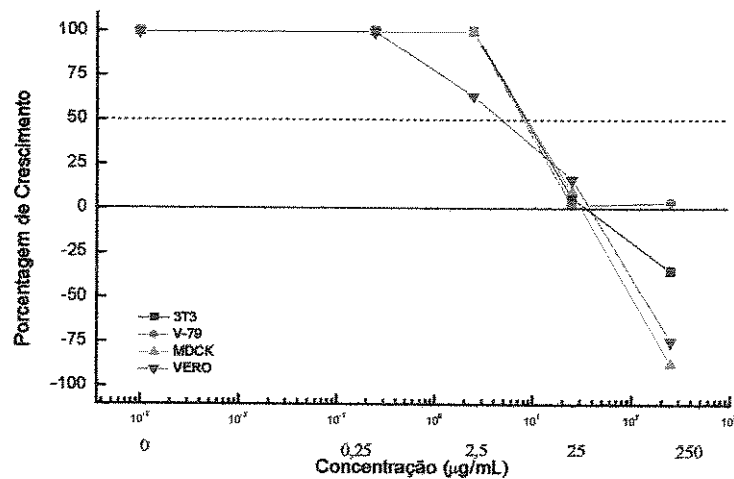


FIGURA 42: Curva concentração resposta da atividade citotóxica de FRE de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., sobre o crescimento de linhagens celulares normais (fibroblastos), após 48h de exposição.

1

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Apesar dos avanços na terapêutica, gastrite e úlcera gastroduodenais são muito freqüentes na maioria dos países e com poucas alternativas terapêuticas para evitar sua recidiva (AL MOUTAERY et al., 1997). O papel dado para o ácido gástrico na patogênese da úlcera gástrica tem mudado significativamente durante os últimos 25 anos. Por muito tempo acreditou-se que a hipersecreção de ácido era o principal fator etiológico da úlcera duodenal associado a fatores extrínsecos, como estresse, alimentos, condimentos e classe sócio-econômica. Alterações em mecanismos intrínsecos da secreção ácida foram encontrados em pacientes com úlcera duodenal. Entre eles pode-se citar a hipersecreção, o aumento do número

de células parietais com sensibilidade aumentada para secreção, aumento da atividade vagal e da liberação pós-prandial de gastrina (HOJGAARD et al., 1996).

Estudos anteriores revelaram que o Extrato Bruto Hidroalcoólico (EB) de *Mikania laevigata* apresentou atividade antiulcerogênica em modelo de úlcera induzida por indometacina. Basicamente as drogas com atividade antiulcerogênica podem atuar estimulando os fatores citoprotetores da mucosa ou por diminuição da liberação de HCl estomacal.

O EB, por via oral e subcutânea, também apresentou atividade antiulcerogênica em modelo de úlcera produzida por etanol, sugerindo efeito específico e sistêmico para esse extrato de *Mikania laevigata*. Com objetivo de identificar o mecanismo de ação desse extrato, a influência de alguns mecanismos de citoproteção foram avaliados. Entre eles, a participação do óxido nítrico, substância endógena que aumenta a resistência da mucosa por promover a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo local. Em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com L-NAME, inibidor da NO sintase, o EB manteve sua atividade antiulcerogênica, sugerindo que a via do óxido nítrico não participa das ações desse extrato.

Outra hipótese seria a interferência dos grupos sulfidril não protéicos encontrados em quantidades elevadas na mucosa gástrica. Estas substâncias provavelmente promovem uma diminuição do aumento da permeabilidade

vascular ou ainda impedem a ação de radicais livres sobre a mucosa. Para avaliar esta hipótese, foi utilizado o modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com N-etilmaleimida, que alquila os grupos sulfidrila. O EB de *Mikania laevigata* Shultz Bip., por via oral, manteve sua atividade, sugerindo que este grupo de substâncias não está envolvido no mecanismo antiulcerogênico apresentado.

Outro grupo de substâncias endógenas importantes no processo de citoproteção é o das prostaglandinas, que aumentam a secreção de muco e bicarbonato. Em modelo de úlcera induzido por etanol, com administração prévia de indometacina que inibe a cicloxigenase, enzima envolvida na síntese de prostaglandinas, o EB manteve sua atividade antiulcerogênica, sugerindo que essas substâncias parecem não participar da atividade apresentada pelo EB.

A partir de então, buscou-se avaliar a atividade anti-secretória do EB, através do modelo de ligadura do piloro. O tratamento intraduodenal com EB alterou de forma significativa o volume e a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico nos grupos de animais tratados. Na secreção ácida gástrica estão envolvidos os mediadores como histamina, gastrina e acetilcolina (BOROCELLY et al., 1997). Então, utilizou-se o modelo de ligadura do piloro com administração destes secretagogos antes da injeção intraduodenal do EB de *Mikania laevigata*.

Com a administração de histamina, o EB de *Mikania laevigata* não alterou o volume e a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico nos grupos de animais tratados. Com a pentagastrina o EB diminuiu o volume de secreção mas sem alterar a concentração hidrogeniônica. Já com a administração de betanecol, o EB de *Mikania laevigata* alterou de forma significativa o volume e a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico nos grupos de animais tratados. Este resultado sugeriu que a atividade antiulcerogênica do EB era consequência da diminuição da produção de HCL por interferência nos mecanismos colinérgicos (BIGHETTI, 1999).

Com esses resultados anteriores, o trabalho atual teve como objetivos isolar e purificar os princípios ativos presentes no extrato bruto hidroalcoólico (EB) de *Mikania laevigata*, avaliar sua atividade antiulcerogênica e identificar o possível mecanismo de ação.

Após obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EB), foi realizado um fracionamento com clorofórmio em meio básico, onde na porção orgânica obteve-se uma fração rica em cumarina (FRC), identificada por CCD e na porção aquosa, uma fração isenta de cumarina (FIC).

Estas frações foram avaliadas em modelo experimental de úlcera induzida por indometacina e observou-se que a FRC inibiu o ILU em 73%, ao passo que, a FIC não promoveu redução das lesões ulcerativas. Já no modelo de úlcera induzida

por etanol a FRC e a FIC inibiram o ILU em 75% e 71%, respectivamente. Esse resultado sugere que a fração isenta de cumarina seja composta de substâncias que atuem por estimular os mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica. Geralmente, os agentes que possuem ação sobre esses mecanismos têm pouca atividade em modelo de úlcera por indometacina.

A purificação da fração rica em cumarina (FRC) foi realizada através de cristalização com metanol à 0 °C que, após filtração e secagem, deu origem a cristais brancos amorfos com ponto de fusão na faixa de 68-78 °C e cheiro característico de baunilha. A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) identificou a 4 (1H)-benzopirona, pertencente ao grupo das cumarinas. O teor desta cumarina em produtos fitoterápicos a base de guaco, tem sido utilizado como marcador de atividade broncodilatadora, no controle de qualidade.

Algumas drogas simpatolíticas apresentam atividade antiulcerogênica em modelo experimental de úlcera induzida por reserpina, especialmente os bloqueadores dos receptores α -adrenérgicos. A reserpina promove uma depleção de catecolaminas e, para compensar esta estimulação adrenérgica, ocorre uma descarga vagal, com consequente liberação de acetilcolina, um dos mediadores da secreção ácida gástrica. Drogas anticolinérgicas como a atropina, também apresentam atividade antiulcerogênica neste modelo, por ação anticolinérgica (GUPTA et al., 1974).

A cumarina isolada do EB de *Mikania laevigata*, administrada oralmente, na dose de 100 mg/kg, no modelo experimental de úlcera induzida por reserpina, apresentou uma redução do ILU em torno de 46%. Como esse resultado pode sugerir atividade sobre o sistema colinérgico a cumarina foi avaliada em modelo de ligadura de piloro, que envolve basicamente o processo de secreção gástrica.

No modelo experimental de ligadura do piloro em ratos (SHAY et al., 1945), foram avaliados os parâmetros como volume e concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico de ratos. Neste modelo experimental, a cumarina administrada por via intraduodenal, reduziu o volume de secreção gástrica e a concentração de íons H⁺, em 51% e 47%, respectivamente.

Na secreção ácida gástrica estão envolvidos os mediadores como histamina, gastrina e acetilcolina (BOROCELLY et al., 1997, HOOGERWERF & PASRICHA, 2003). Então, utilizou-se o modelo de ligadura do piloro com administração destes secretagogos em animais previamente tratados com cumarina pela via intraduodenal.

A histamina estimula a secreção ácida gástrica, através de estimulação dos receptores H₂ presentes nas células parietais da mucosa gástrica (BLACK et al., 1972; HERSEY & SACHS, 1995, LINDSTROM & HAKANSON, 2002). No modelo de ligadura do piloro em ratos tratados com histamina na dose de 25 mg/kg por via intraperitoenal, a cumarina (100 mg/kg) não alterou nem o volume da secreção

gástrica nem a concentração de íons H^+ . Esses resultados excluem a possibilidade da cumarina diminuir a secreção de HCl por interferência no sistema histaminérgico, como fazem os bloqueadores do receptor H_2 da histamina (BLACK et al, 1972, HOOGERWERF & PASRICHA, 2003).

A pentagastrina é a extremidade funcional da molécula de gastrina, onde foi acrescentada uma β -alanina substituída. Este composto age sobre os receptores CCK-B de gastrina presentes na célula parietal, aumentando a liberação de ácido gástrico e também estimulando a secreção de histamina das células enterocromafins (HERSEY & SACHS, 1995, ATHMANN et al., 2000). O tratamento prévio dos animais com cumarina (100mg/kg), reduziu o volume gástrico, mas não o aumento da concentração hidrogênioica, estimulados pela pentagastrina

O tratamento prévio dos animais com cumarina, reduziu em 34% e 61,5% o volume e a concentração hidrogênioica, estimulados pela injeção de betanecol (1,5 mg/kg,sc). O betanecol é um agonista seletivo para receptores muscarínicos, que estão envolvidos no aumento da secreção ácida gástrica (ANGUS & BLACK, 1982). O antagonismo da cumarina sobre as ações estimulantes do betanecol na secreção ácida gástrica, sugere uma atividade bloqueadora dos receptores muscarínicos ou dos mecanismos de sinalização intracelular envolvidos no processo colinérgico. No entanto, a diminuição da secreção estimulada por pentagastrina sugere mecanismos envolvendo segundos mensageiros intracelulares ou canais iônicos.

Na célula parietal, a histamina interage com receptores H_2 acoplados à proteína Gs, estimulando a produção de AMP cíclico que no citoplasma ativa a proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA). A PKA fosforila proteínas intracelulares ativando a bomba de próton H^+ , K^+ - ATPase e consequentemente a secreção de ácido (KUTCHAI 1996, LINDSTROM et al., 2001). Já a secreção estimulada pela gastrina e acetilcolina é mediada pela ativação da fosfolipase C que catalisa a hidrólise de fosfolípidos de membrana, liberando o trifosfato de inositol (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). IP_3 libera cálcio do retículo endoplasmático que por sua vez se liga à calmodulina, desencadeando alterações conformacionais da proteína, favorecendo sua ligação e ativação da proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina (PKC). Esta quinase, por sua vez, fosforila as proteínas associadas à ativação da bomba de prótons estimulando a secreção ácida. O DAG atua sinergicamente com o IP_3 , aumentando a atividade da PKC (SOUCCAR, 2003). Esses mecanismos intracelulares comuns entre a gastrina e a acetilcolina sugerem que a cumarina atua inibindo alguma etapa da cascata de eventos comuns desencadeados pela interação da gastrina e da acetilcolina com seus receptores. Diminuição da liberação de IP_3 e DAG, por interação com a fosfolipase C; interação com a membrana do retículo endoplasmático; interação com a calmodulina e inibição da PKC estão entre os possíveis alvos de ligação da cumarina isolada do guaco.

No modelo experimental de trânsito intestinal em camundongos (STICKNEY & NORTHUP, 1959), a cumarina administrada na dose de 100mg/Kg por via oral, foi

capaz de inibir o Índice de Deslocamento Intestinal (IDI) em 37%, inibição semelhante à observada pela atropina, utilizada como controle positivo. Esse resultado confirma os dados obtidos sobre a secreção gástrica envolvendo mecanismo de bloqueio da via colinérgica.

As cumarinas isoladas do guaco, pertencem a um grupo de substâncias amplamente distribuídas na natureza que, entre diversos efeitos farmacológicos, algumas possuem ações antiespasmódicas e vasodilatadoras (ALONSO,1998), que se correlacionam com os efeitos observados no presente trabalho

Os resultados obtidos nestes estudos, evidenciando os efeitos da cumarina no sistema gastrointestinal por diminuição do sistema colinérgico, pode justificar também o uso popular do guaco nos distúrbios respiratórios, diminuindo a secreção e provocando relaxamento bronquial, por estar também o sistema colinérgico (vago) envolvido nesses processos.

A fração isenta de cumarina (FIC) apresentou atividade antiulcerogênica no modelo experimental de úlcera induzida por etanol. Este resultado estimulou o trabalho de isolamento e identificação dos princípios ativos presentes nessa fração. Os métodos cromatográficos empregados (CCD e CG-MS) identificaram a presença de ácidos e ésteres diterpênicos, como compostos majoritários da FIC. Essa fração, através de uma coluna cromatográfica flash deu origem a outras

duas: uma rica em ácidos diterpênicos (FRA) e outra rica em ésteres diterpênicos (FRE).

Com a finalidade de averiguar a DE₅₀ da FRA e FRE obtidas de *Mikania laevigata*, através do modelo experimental de úlcera induzida por etanol, obteve-se uma DE₅₀ de 152,4 mg/kg e de 119,32 mg/Kg, respectivamente, calculadas por regressão linear.

Inicialmente, averiguou-se a hipótese de um mecanismo de ação envolvendo os fatores denominados citoprotetores da mucosa gástrica, já que no modelo de úlcera induzido por etanol absoluto (ROBERT, 1979), que produz irritação da mucosa gástrica, a FRA e a FRE isoladas do EB de *Mikania laevigata*, administradas por via oral, na dose de 100 mg/Kg, reduziram o ILU em 32%.

Um dos componentes envolvidos na citoproteção gástrica é o óxido nítrico, que desenvolve seu efeito protetor por promover vasodilatação e conseqüentemente aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Este efeito proporciona uma aceleração da retirada dos íons H⁺ nocivos à mucosa gástrica e aumento da oferta de nutrientes para a mesma. Para avaliar a participação do NO no mecanismo de ação da FRA e FRE, em modelo de úlcera induzido por etanol, os ratos foram tratados previamente com L-NAME (éster dimetilico de N(G)-nitro-L-arginina) que inibe a enzima NO-sintase, responsável pela síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina (KONTUREK et al., 1995; KATO et al., 1998, CHO, 2001, UCHIDA et al.,

2001). Neste experimento observou-se que a FRA e a FRE obtidas de *Mikania laevigata* reduziram o ILU em 59% e 40%, respectivamente, embora a síntese do óxido nítrico estivesse inibida, sugerindo então que a ação antiulcerogênica parece não estar envolvida com a via deste mediador.

As prostaglandinas pertencem a uma classe de substâncias das mais importantes no processo da citoproteção gástrica, que atuam por diminuir a produção de ácido e principalmente por aumentar a produção de muco citoprotetor (ATAY, 2000). Algumas drogas como a carbenoxolona, que inibe a degradação de prostaglandinas, e o misoprostol agonista dos receptores das prostaglandinas, foram introduzidas na terapêutica medicamentosa da úlcera, apresentando elevada eficácia (HAWKINS & HANKS, 2000)

Para avaliar a influência das prostaglandinas na atividade antiulcerogênica das frações FRA e FRE, utilizou-se o modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, em animais tratados previamente indometacina (mecanismo de ação ulcerogênico discutido anteriormente, de acordo com KONTUREK et al., 1995). Na dose de 5 mg/kg, administrada por via intraperitoneal, a indometacina não produz ulceração por si própria, mas potencializa aquelas causadas por etanol absoluto (KONTUREK et al., 1995). Neste modelo, observou-se que a FRA e a FRE obtidas de *Mikania laevigata* mantiveram a redução do ILU, excluindo a participação das prostaglandinas no mecanismo de ação antiulcerogênico dessas frações.

Concentrações elevadas de glutathione reduzida (substâncias sulfidrilas não proteicas) são encontradas na mucosa gástrica estando intimamente relacionadas com a citoproteção gástrica, através da diminuição da permeabilidade vascular e bloqueio de radicais livres tóxicos para as células da mucosa. (ação antioxidante). Além da mucosa gástrica, a glutathione é encontrada em concentrações elevadas no fígado, onde participa da segunda fase de metabolização das drogas (fase de conjugação), quando neutraliza os agentes eletrofílicos formados na primeira fase, e também, na maioria das células, onde exerce efeito antioxidante (SZABO, 1981; TAKEUCHI et al., 1992; MARTIN et al., 1998, SHIRIN et al., 2001).

Para avaliar a participação deste grupo de substâncias na citoproteção gástrica, ratos foram tratados previamente com N-etilmaleimida, na dose de 10 mg/kg por via subcutânea, e então as lesões ulcerativas foram induzidas por etanol absoluto no volume de 1,0 mL/animal por via oral. A N-etilmaleimida é um composto que promove alquilação dos grupos sulfidrilas não proteicos, presentes na mucosa gástrica, eliminando seus efeitos antioxidantes. Com a alquilação destes grupos, as duas frações (FRA e a FRE) perderam a atividade antiulcerogênica, sugerindo que os princípios ativos dessas frações atuam estimulando a síntese ou a atividade de substâncias sulfidrilas não proteicas.

O trabalho de isolamento e identificação dos ácidos diterpênicos, por CG-EM, revelou a presença de ácido caurenóico, ácido cupressênico, ácido grandiflórico, ácido cinamoilgrandiflórico entre outros. Alguns trabalhos da literatura revelaram

atividade mutagênica de alguns derivados do ácido caurenóico, bem como atividade citotóxica, hemolítica, embriotóxica e antimicrobiana (PEZZUTO et al., 1985; DAVINO et al., 1989; COSTA-LOTUFO et al., 2002). Essas publicações, sugerindo ações citotóxicas, direcionaram o trabalho para testes de atividade *in vitro*, utilizando cultura de células tumorais humanas e células murinas normais. Os resultados obtidos demonstraram que a fração rica em ácidos caurenóico e cupressênico (FRA), e a fração rica em ésteres (FRE), produziram morte celular das linhagens tumorais sem qualquer seletividade, bem como, das linhagens normais, confirmando os efeitos citotóxicos inespecíficos. Dessa forma esses dados sugerem que a ação antiulcerogênica observada com esses ácidos e ésteres diterpênicos é consequência de um efeito de adaptação citoprotetora, pois a administração dessas substâncias provocando citotoxicidade induz a formação de elevada quantidade de glutathione que acabou protegendo a mucosa gástrica da ação de agentes ulcerogênicos. Portanto esse efeito, aumento da quantidade de glutathione gástrica, não é consequência de efeito fisiológico estimulando a síntese desses antioxidantes, mas sim, por um efeito tóxico. Trabalho realizado com extrato da *Mikania cordata* revelou aumento da síntese e do conteúdo de glutathione reduzida hepática, confirmando essa hipótese (BISHAYEE & CHATTERJEE, 1994). Outro diterpeno desse grupo, isolado da *Parinari curatellifolia*, com atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais, não apresentou atividade anticâncer em modelo animal, provavelmente pela conjugação hepática com glutathione inibindo sua ação eletrofílica (LEE et al., 1996). Embora as frações ricas em ácidos e ésteres diterpênicos tenham

propriedades antiulcerogênicas, por estimularem a produção de glutathione, a presença dessas substâncias deve ser avaliada em fitoterápicos, pois em pacientes com sistema de conjugação hepática deficiente, além de mutações, podem produzir lesão hepática.

Trabalho também realizado na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA, revelou atividade antiulcerogênica de proteínas do soro do leite, por aumento de glutathione. No entanto, essas proteínas não apresentaram citotoxicidade e sua atividade antiulcerogênica foi inibida pelo tratamento prévio com N-etilmaleimida, bem como, por inibidores da síntese de glutathione. A composição de aminoácidos dessas proteínas indicou concentrações elevadas dos precursores da glutathione. Dessa forma o efeito desse concentrado proteico, diferentemente dos ácidos caurenóicos, é consequência de uma modulação fisiológica benéfica para o organismo (ROSANELI et al., 2002).

Como já salientado, a presença de ácidos e ésteres com atividade citotóxica não é aconselhável em produtos fitoterápicos e de uso popular. Considerando que a infusão (chá) de folhas de guaco é uma das formas de uso popular mais utilizadas, foi realizado estudo fitoquímico e de atividade antiulcerogênica de extrato bruto aquoso a quente (EBA), obtido de folhas de *M. laevigata*. Em modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol o EBA (1,0 g/kg, vo), reduziu o ILU em 49% e 71%, respectivamente.

A presença de princípios ativos com atividade antiulcerogênica no EBA estimulou o processo de partição desse extrato, através da extração com solvente orgânico. Dessa forma foram obtidas duas frações: uma orgânica (FO) e outra aquosa (FA). Após avaliação em modelos de úlcera por indometacina e etanol, constatou-se que a fração orgânica concentrou a maioria dos princípios ativos com atividade antiulcerogênica. A análise fitoquímica dessa fração revelou a presença de cumarina e outros compostos minoritários. Dessa forma apesar da baixa solubilidade aquosa da cumarina presente na *M.laevigata*, a água quente é capaz de arrastar quantidade suficiente dessa substância, conferindo atividade antiulcerogênica e, provavelmente broncodilatadora ao EBA (chá), forma mais utilizada popularmente.

CONCLUSÃO

A presença de princípios ativos com atividade antiulcerogênica no EBA estimulou o processo de partição desse extrato, através da extração com solvente orgânico. Dessa forma foram obtidas duas frações: uma orgânica (FO) e outra aquosa (FA). Após avaliação em modelos de úlcera por indometacina e etanol, constatou-se que a fração orgânica concentrou a maioria dos princípios ativos com atividade antiulcerogênica. A análise fitoquímica dessa fração revelou a presença de cumarina e outros compostos minoritários. Dessa forma apesar da baixa solubilidade aquosa da cumarina presente na *M.laevigata*, a água quente é capaz de arrastar quantidade suficiente dessa substância, conferindo atividade antiulcerogênica e, provavelmente broncodilatadora ao EBA (chá), forma mais utilizada popularmente.

CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos neste projeto de pesquisa revelou que:

- Os testes de atividade da Cumarina isolada do Extrato Bruto (EB) obtido das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz Bip. revelaram que esta substância é um dos princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica;
- O estudo do mecanismo de ação da Cumarina, em modelo de ligadura do piloro, sugeriu um efeito anti-secretório;

- Os mecanismos intracelulares comuns entre a gastrina e a acetilcolina sugerem que a cumarina atua inibindo alguma etapa da cascata de eventos comuns desencadeados pela interação destes secretagos, como redução da liberação de IP3 e DAG, por interação com a fosfolipase C, interação com a membrana do retículo endoplasmático ou interação com a calmodulina e inibição da PKC;
- O tratamento de ratos com a Fração Rica em Ácidos Diterpênicos (FRA) e com a Fração Rica em Ésteres Diterpênicos (FRE) isoladas do Extrato Bruto (EB) obtido das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz Bip. reduziu as lesões produzidas nos diversos modelos de úlcera gástrica utilizados;
- Os testes de atividade *in vitro*, utilizando cultura de células tumorais humanas e células murinas normais, demonstraram que a fração rica em ácidos caurenóico e cupressênico (FRA) e a fração rica em ésteres (FRE), produziram morte celular das linhagens tumorais sem qualquer seletividade, bem como, das linhagens normais, sugerindo efeitos citotóxicos inespecíficos;
- Dada a citotoxicidade *in vitro* observada, é possível sugerir que a ação antiulcerogênica observada com esses ácidos e ésteres diterpênicos é consequência de uma citoproteção adaptativa, através da formação de elevada quantidade de glutathione.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allued Publishing Corporation, Illinois-USA, 1995.
- AHMED M.; RAHMAN M.T.; ALIMUZZAMAN M.; SHILPI J.A. Analgesic sesquiterpene dilactone from *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, 72: 919-921, 2001.
- AL MOUTAERY, A.R. & TARIQ, M. Effect of quinacrine, a phospholipase A2 inhibitor on stress and chemically induced gastroduodenal ulcers, **Digestion** 58, 129-137, 1997.
- ALLEN, A., FLEMSTRÖM, G.; GARNER, A., KIVILAAKSO, E. Gastroduodenal mucosal protection. **Physiol. Rev.**, 73, 823-857, 1993.
- ALONSO J.R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires, Isis Ediciones SRL. 1998.

- ANDERSSON, K., LINSTROM, E., CHEN, D., MONSTEIN, H.J., BOKETOFT, A., HAKANSON, R. Depletion of enterochromaffin-like cell histamine increases histidine decarboxylase and chromogranin A mRNA levels in rat stomach by a gastrin-independent mechanism, **Sand J Gastroenterol** **31**, 959-965, 1996.
- ANGUS, J.A. & BLACK, J.W. The interaction of choline esters, vagal stimulation and H₂ receptor blockade on acid secretion in vivo, **Eur J Pharmacol** **80**, 217-224, 1982.
- ARQUIOLA, E., GUERRA, D.G., MONTIEL, L. A úlcera gastroduodenal. História de uma doença, Barcelona: Doyma, Rio de Janeiro: Glaxo do Brasil S/A. Copyright, 1987.
- ARRIETA, J., BENITEZ, J., FLORES, E., CASTILLO C. & NAVARRETE A. – Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Med.** **69 (10)**: 905-9, 2003.
- ATAY, S., TARNAWSKI, A.S. & DUBOIS, A. - Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & Other Lipids Mediators**, v.61, p.105-124, 2000.
- ATHMANN, C., ZENG, N., SCOTT, D.R. & SACHS, G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. **American Journal of Physiology**, v.279, p. 1048-1058, 2000.
- BAUER, R.F., BIANCHI, R.G., CASLER, J. & GOLDSTIN, B. Comparative mucosal protective properties of misoprostol, cimetidine and sucralfate. **Digestive Diseases and Sciences.** **31 (2)**: 81S-85S, 1986.

- BIGHETTI, A .E. Atividade Antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip., Tese de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – Campinas, 1999.
- BIGHETTI, A.E., ANTÔNIO, M. & CARVALHO, J.E. – Regulação e modulação da secreção ácida gástrica. **Rev. Ciênc. Med.** 11(1): 55-60, 2002.
- BISHAYEE A.; CHATTERJEE M. Anticarcinogenic biological response of *Mikania cordata*: reflections in hepatic biotransformation systems. **Cancer Lett**, 81 (2): 193-200, 1994.
- BISHAYEE A.; CHATTERJEE M. Protective effects of *Mikania cordata* root extract against physical and chemical factors-induced gastric erosions in experimental animals. **Planta Med.**, 60 (2): 110-113, 1994.
- 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.
- BOROCELLI, E., CHIAVARINI, M., BALLABENI, V., BARLOCCO, D., VIANELLO, P., DAL PIAZ, V., IMPICCIATORE, M., Study of the antisecretory and antiulcer mechanism of a new indenopyridazinone derivative in rats, **Pharmacological Research**, 35 (5), 1997.
- CABRAL L.M.; DOS SANTOS T.C.; ALHAIQUE F. Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1-benzopyran-2-one (coumarin) from *Mikania glomerata*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 27 (1): 103-106, 2001.

- CASTRO, V., JAKUPOVIC, J. & BOHLMANN, F. Sesquiterpene lactones from *Mikania* species, **Phytochemistry**, **25** (7) 1750-1752, 1986.
- CELEGHINI R.M.S.; VILEGAS J.H.Y.; LANCAS F.M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 12 (6): 706-709, Nov-Dec 2001.
- CHANG, E.B – Acid secretion by parietal cells: relative roles for $[Ca^{2+}]_i$ and protein kinase C. **Gastroenterology**, **98**: 244-245, 1990.
- CHO, C.H. - Current roles of nitric oxide on gastrointestinal disorders. **Journal of Physiology-Paris**, v.95, 253-256, 2001.
- CLISSOLD, S.P. & CAMPOLI-RICHARDS, D.M. Omeprazole: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in peptic ulcer disease and Zollinger-Ellison syndrome. **Drugs**, **32**: 15-47, 1986.
- CORNE, S.J., MORRISEY, S.M. & WOODS, R.J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol. Lond.**, **242**: 116-117P, 1974.
- COSTA-LOTUFO, L.V., CUNHA, G.M.A., FARIAS, P.A.M., VIANA, G.S.B., CUNHA, K.M.A., PESSOA, C., MORAES, M.O., SILVEIRA, E.R., GRAMOSA, N.V. & RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, **40**, 1231-1234, 2002.
- COVER, T.L., & BLASER, M.J., *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease, **Annu Rev Med.**, **43**, 135-145, 1992.

- CUENCA, M. D. D., BORKOSKY, S., CATLÁN, C. A. N. , GOEDKEN, V. L., DIAZ, J. G. E HERZ, W. Sesquiterpene lactones of *Mikania minima*, **Phytochemistry** **32(6)**,1506-1513, 1993.
- CUENCA, M. D. D., BORKOSKY, S., CATLÁN, C. A. N. , GOEDKEN, V. L. DIAZ, J. G. & HERZ, W. A cadinanolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania haenkeana*. **Phytochemistry**, **31(10)**, 3521-3525, 1992.
- DAVINO, S. C., GIESBRECHT, A. N. E ROQUE, N. F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. **Brazilian J. Med. Bio. Res.**, **22**, 1127-1129, 1989.
- DE PASQUALE, A. – Pharmacognosy: the oldest modern science. **J. Ethnopharmacol.**, **11**: 1-16, 1984.
- DIAZ, J. G., GOEDEKEN, V. L. & HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Mikania rimachii* and *Mikania microptera*. **Phytochemistry**, **31(2)**, 597-608), 1992.
- DING, X.Q., HAKANSON,R., Evaluation of the specificity and potency of series of cholecystokinin- B/gastrin receptor antagonists *in vivo*, **Pharmacology & Toxicology** **79**, 124-130, 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.

- FARNSWORTH, N.R. – Medicinal plants in therapy. **Bull. World Health Organ.**, **63(6)**: 965-81, 1985.
- FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S; SOEJARTO, D.D & GUO, Z. – Las Plantas medicinales en la Terapéutica. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, **107(4)**: 314-327, 1989.
- FELIX, W.L., MILLER, J.C. & GUTH, P.H. Dissociated effects of misoprostol on gastric acid secretion and mucosal blood flow. **Digestive Diseases and Sciences**. **31 (2)**: Suppl. Feb. 86S-90S, 1986.
- FELLOWS, L.E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: Future prospects. In: Coombes, JD, ed. New drugs from natural sources. London, IBC Technical Services, 1992.
- FERNANDES J.B.; VARGAS V.M. Mutagenic and antimutagenic potential of the medicinal plants *Mikania laevigata* and *Campomanesi xanthocarpa*. **Phytother Res.**, **17 (3)**: 269-273, 2003.
- GAMBERINI, M.T., SKORUPA, L.A., SOUCCAR, C. & LAPA, A.J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, **86**: Suppl. II, 137-139, 1991.
- GOEL, R.K. & BHATTACHARYA, S.K. – Gastroduodenal mucosal defence and mucosal protective agents. **Indian J. Exp. Biol.**, **29**: 701-14, 1991.
- GOODWIN, C.S., Helicobacter pylori gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer: clinical and molecular aspects, **Clinical Infectious Diseases** **25**, 1017-1019, 1997.

- GRAHAM, D.Y. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. **Gastroenterology**, **96**: 615-625, 1989.
- GRAHAM, D.Y., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Helicobacter pylori*, and ulcers: where we stand?, **The American Journal of Gastroenterology** **91** (10), 2080-2086, 1996.
- GRUNDY, D & SCRATCHERD, T. – Sensory afferents from the gastrointestinal tract. In: SCHULTZ, S.G. **Handbook of Physiology. The Gastrointestinal system**. Bethesda, MD: American Physiological, 1989. p. 593-620.
- GUPTA, M.B., TANGRI, K.K., BHARGAVA, K.P. Mechanism of ulcerogenic activity of reserpine in albino rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **27**: 269-271, 1974.
- GUPTA, P.M. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas, Programa Iberoamericano de Ciência Y Tecnologia para El Desarrollo, Subprograma de Química Fina Farmacêutica, 125-125, 1994.
- HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. - Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, **30** (12): 3864-3874, 1991.
- HAMBURGER, M.; MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. - Search for new drugs of plant origin. **Advances in Drug Research**, **20**, 167-169, 1991.
- HAWKINS, C. & HANKS, G.W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature. **Journal of pain and symptom management**, v.20, 140-151, 2000.
- HELANDER, H.F. – Physiology and pharmacology of the parietal cell. **Bailliers Clin. Gastroenterol.**, **2**: 539-554, 1988.

- HERMANSSON, M., STAEL VON HOLSTEIN, C., ZILLING, T., Peptic ulcer perforation before and after the introduction of H₂- receptor blockers and proton pump inhibitors, **Sand J Gastroenterol** **32**, 523-529, 1997.
- HERSEY, S.J., SACHS, G., Gastric acid secretion, **Physiological Reviews** **75**, no1, 155-188, 1995.
- HERZ, W., SUBRAMANIAM, P.S., SANTHANAM, P.S., AOTA, K. & HALL, A.L. Structure elucidation of sesquiterpene dilactones from *Mikania sandens* (L.) Wild., **J. Org. Chem.** **35**(5), 1453-1464, 1970.
- HERZ, W.E., SANTHANAM, P.S. Isolation, Structure and synthesis of 4',5,6,7-tetrahydroxy-3''-methoxyflavone (batafolin), a new flavone from *Mikania batatifolia* DC, **Tetrahedron Letters**, **39**: 3419-3421, 1969.
- HIRSCHOWITZ, B.I., KEELING, D., LEWIN, M., OKABE, S., PARSONS, M., SEWING, K., WALLMARK, B. & SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Digestive Diseases and Sciences**. **40** (2): 3S-23S, 1995.
- HOJGAARD, L., NIELSON, A .M., RUNE, S.J. Peptic Ulcer Pathophysiology: Acic, Bicarbonate, and Mucosal Function, **Sand J Gastroenterol** **31**, suppl 216:10-15, 1996.
- HOLETZ F.B.; PESSINI G.L.; SANCHES N.R.; CORTEZ D.A.G.; NAKAMURA C.V.; FILHO B.P.D. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97** (7): 1027-1031, 2002.
- HOLM, L. & FLEMSTRÖM, G. – Microscopy of acid transport at the gastric surface "in vivo". **J. Intern. Med.**, **228**: 91-96, 1990.

- HOOGERWERF W.A. & PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: HARDMAN, L.G. & LIMBIRD, L.E. GOODMAN & GILMAN **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10a edition, 2003.
- IKARASHI Y., YUZURIHARA M., SHINODA M. & MARUYAMA Y. – Effect of 2-deoxy-D-glucose on acetylcholine and histamine level in gastric juice of pylorus-ligated rats anesthetized with urethane. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, **9;742 (2)**:295-301, 2000.
- INADA, I. & SATOH, H. Capsaicin-sensitive sensory neurons are involved in bicarbonate secretion induced by lansoprazole, a proton pump inhibitor, in rats. **Digestive Diseases and Sciences**. **41 (4)**: 785-790, 1996.
- IWASAKI, T.; NOHARA, A.; ICHINOSE, M.. – Inhibition of gastric acid secretion by protein kinase C in isolated rat parietal cells. **Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi**, **88**: 2726, 1991.
- KATO,S., KITAMURA, M., KOROLKIEWICZ, R.P., TAKEUCHI, K., Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor, **Br J Pharmacol** **123 (5)**, 839-846, 1998.
- KATO,S., YAYOI, A ., KONISHI, M., KURODA, N., TAKEUCHI, K., Mechanism of gastric hyperemic response during acid secretion in rats: relation to nitric oxide, prostaglandins, and sensory neurons, **J Clin Gastroenterol** **25**, (suppl.1), s48-s55, 1997.
- KATORI, M., MAJIMA, M., Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors, **Nippon Yakurigaku Zasshi** **109 (6)**, 247-258, 1997.

- KIANG, A. K., SIM, K. Y. E GOH, J. Constituents of *Mikania cordata* (Burm.f.) B. L. Robinson (Compositae). Isolation of mikanin, epifriedelinol, and fumaric acid; the structure of mikanin., **J. Org. Chem.**, 6371-6374, 1965
- KNUDSEN, F.S., VILEGAS, W., OLIVEIRA, F. & ROQUE, N. F. Pimaradiene diterpenes from *Mikania triangularis*, **Phytochemistry**, **25** (5), 1240-1242, 1986.
- KONTUREK, P.C., BRZOZOWSKI, T., KONTIREK, S.I., MÁRQUEZ, M., TORRES, J., ORTIZ, J.A ., Studies on the cytoprotective and antisecretory activity of ebrotidine. A review, **Arzneimittelforschung** **47** (4 A), 578-589, 1997.
- KONTUREK, S.J. & PAWLIK, W. Physiology and pharmacology of prostaglandins. **Digestive Diseases and Sciences**, **31** (2), 6S-19S, 1986.
- KONTUREK, S.J., BROZOZOWSKY, T., PYTKO-POLONCZYK, J., DROZDOWICZ, D. Comparison of cholecystokinin, pentagastrin and duodenal oleate in gastroprotection in rats. **Scand. J. Gastroenterology.**, **30** (7), 620-630, 1995.
- KUTCHAI, H.C. Secreções gastrointestinais. In: BERNE, R.M. & LEWI, M.N. **Fisiologia**. 3a ed., 1996.
- LEE, I.K., SHAMON, L.A., CHAI, H.B., CHAGWEDERA, T.E., BESTERMAN, J.M., FARNSWORTH, N.R., CORDELL, G.A., PEZZUTO, J.M. & KINGHORN, A.D. Cell-cycle specific cytotoxicity mediated by rearranged *ent*-kaurene diterpenoids isolated from *Parinari curatellifolia*. **Chemico-Biological Interactions**, **99**, 193-204, 1996.

- LEITE, M.G.R., DA SILVA, M.A.M., LINO, C.S., VIANA, G.S.B. & MATOS, F.J.A.
Abstracts 021, **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. *Anais*. U. F.
Paraná, Curitiba, 1992.
- LEVINE, R.J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: C.J. Pfeiffer
(Ed.), *Peptic Ulcer*, Munksgaard, Copenhagen, pp.92-97, 1971.
- LEWIS, D.A. & HANSON, P.J., Anti-ulcer drugs of plant origin, **Progress in
Medicinal Chemistry**, **28**, 1991.
- 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., 201-231, 1991.
- LI, Q-Z.; CABERO, J.L.; NILSON, B.O. & MARDH, S. – Direct gastrin actions on
isolated rat parietal cells induces morphological transformations. **Biochem.
Biophys. Acta. Mol. Cell Res.**, **1175**: 250-256, 1993.
- LINDSTROM, E. & HAKANSON, R. Neurohormonal regulation of secretion from
isolation rat stomach ECL cell: a critical reappraisal. **Regulatory Peptides**.
v.97, 169-180, 2001.
- LINDSTROM, E., CHEN, D., NORLEN, P., ANDERSSON, K. & HAKANSON, R.
Control of gastric acid secretion: the gastrin-ECL cell parietal cell axis.
Comparative Biochemistry and Physiology Part A., v.128, 505-514, 2001.
- LLOYD, K.C. & DEBAS, H.T. – Peripheral Regulation of Gastric Acid Secretion. In:
PHYSIOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT, 3^a ed., Raven Press,
Ltd., vol.2 – 1185-1226, 1994.
- LOBITZ, G. O., CASTILLO, G. T. & MERFOR, I. Diterpenes and sesquiterpenes from
Mikania banisteriae, **Phytochemistry**, **46 (1)** 161-164, 1997.

- MAIA, J. G. S.; DA SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R., ZOGHBI, M. G. B. & RAMOS, L. S.
Essential oils of some Amazonian *Mikania* species, **Phytochemistry**, **23** (10),
2374-2376, 1984.
- MARSHALL, B.J., *Helicobacter pylori*, **Am J Gastroenterol** **89**, s116-s128, 1994.
- MARTHUR, S.B. & FERMIN, C.M. Terpenes of *Mikania mongenans*.
Phytochemistry **12**, 226-227, 1973.
- MARTIN, M.J., LA CASA, C., ALARCÓN DE LA LASTRA, C., CABEZA, J.,
VILLRGAS, I., MOTILVA, V., Anti-oxidant mechanisms involved in
gastroprotective effects of quercetin, **Z Naturforsch [C]** **53**, (1-2), 82-88, 1998.
- 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.
- MOSADDIK, M.A. & ALAM, K.M. - The anti-ulcerogenic effect of an alkaloidal fraction
from *Mikania cordata* on diclofenac sodium-induced gastrointestinal lesions in rat.
Journal Pharmacy Pharmacology, **Sep;52(9)**:1157-62, 2000.
- MOTILVA, V., LÓPEZ, A., MARTÍN, M.J., LA CASA, C., ALARCÓN DE LA LASTRA,
C., Cytoprotective activity of cisapride on experimental gastric mucosal lesions
induced by ethanol. Role of endogenous prostaglandins, **Prostaglandins** **52**,
63-74, 1996.
- MOURA R.S.; COSTA S.S.; JANSEN J.M.; SILVA C.A.; LOPES C.S.; FILHO M.B.;
SILVA V.N.; CRIDDLE D.N.; PORTELA B.N.; RUBENICH L.M.S.; ARAÚJO
R.G.; CARVALHO L.C.R.M. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata*

- Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 54: 249-256, 2002.
- NUNEZ C.V.; AMÊNDOLA M.C.; LAGO J.H.G.; ROQUE N.F. Diterpene acids from *Mikania* sp. nov (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 32: 233-237, 2004.
- ODY, P. – Las Plantas medicinales Dorling Kindersley limited, tercera edición, 1996
- OHKOSHI E.; KAMO S.; MAKINO M.; FUJIMOTO Y. ent-Kaurenoic acids from *Mikania hirsutissima* (Compositae). **Phytochemistry**, 65: 885-890, 2004.
- OLIVEIRA, F., ALVARENGA, M. A., AKISUE, G. & AKISUE, M. K. Isolamento e identificação de compostos químicos de *Mikania glomerata* Spreng e de *Mikania laevigata* Shultz Bip. Ex Baker. **Rer. Farm Bioquim. Univ. S. Paulo**, 20, 169-183, 1984.
- OLIVEIRA, F., SAITO, M. L. & GARCIA, L. O. Caracterização cromatográfica do extrato fluído de *Mikania glomerata* Sprengel. Abstracts 096, **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Anais. U. F. Paraná, Curitiba, Brasil, 1992.
- PAL, S., BHATTACHARYA, S., CHAUDHURI, A . K.N., The effects of *Mikania cordata* (Burm) B.L.Robins. root extract on gastro-duodenal ulcer models in rats and guinea pigs, **Phytotherapy Research**, 2 (4), 1988.
- PAUL R.K.; JABBAR A.; RASHID M.A. Antiulcer activity of *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, 71: 701-703, 2000.
- PEREIRA, N. A., PEREIRA, B, M. R., NASCIMENTO, M.C., PARENTE, J. P. & MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Med.**, 60, 99-100, 1994.

- PEZZUTTO, J.M., NANAYAKKARA, N.P., COMPADRE, C.M., KINGHORM, A.D. & GUENTHNER, T.M. Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic acid (stevio) and several structurally-related derivatives and evaluation of potencial to induc glutathione S-transferase in mice. **Mutat. Res.**, **169(3)**, 93-103, 1986.
- PIO CORRÊA, M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Vol. 3, pp.517-520. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1942.
- QUI, B.S., MEI, Q.B., LIU, L. & TCHOU-WONG, K.M. - Effects of nitric oxide on gastric ulceration induced by nicotine end cold-restrain stress. **Word J. Gastroenterol.** **15,10 (4)**: 594-7, 2003.
- 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 "adaptative cytoprotection" mediated by prostaglandins. **Am. J. Physiol.** **245**: G113-G121, 1983
- ROSANELI, C.F., BIGHETTI, A.E., ANTÔNIO, M., CARVALHO, J.E., & SGARBIERI, V.C.- Efficacy of a Whey Protein Concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, **5 (4)**:221-228, 2002.
- RUPPELT, B.M.; PEREIRA, E.F.R.; GONÇALVES, L.C. & PEREIRA, N.A.
Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-

- snake venom .1. analgesic and antiinflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 86: 203-205 Suppl.2, 1991.
- 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.; BESANCON, M. & PRINZ, C. – The continuing development of gastric acid pump inhibitors. **Alim. Pharmacol. Ther.**, **7(Suppl. 1)**: 4-12, 1993.
- SHIRIN, H., PINTO, J.T., LIU, L.U., MERZIANU, M., SORDILLO, E.M. & MOSS, S.F. *Helicobacter pylori* decreases gastric mucosal glutathione. **Cancer letters**, v.164, 127-133, 2001.
- SALAM, O.A ., SZOLECSÁNYI, J., MÓZSIK, G., Capsaicin and the stomach. A review of experimental and clinical data, **J Physiology** **91**, 151-171, 1997.
- SCHUBERT, M.L. - Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, **16**: 463-468, 2000.
- SCHUBERT, M.L. - Regulation of gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**. **10**: 575-588, 1994.
- SCHUBERT, M.L. & SHAMBUREK, R.D. – Control of acid secretion. In HUNT, R. **Peptic Ulcer Disease**. Saunders Company. Harcourt Brace Jovanoivich Inc., 19 (1), 1-23, 1990.
- SCHUBERT, M.L., SHAMBUREK, R.D. Control of acid secretion. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, **19**, 1-25, 1990.

- SCOTT, D.R.; HELANDER, H.F.; HERSEY, S.J. & SACHS, G. – The site of acid secretion in the mammalian parietal cell. **Biochim. Biophys. Acta**, 2246 (1): 73-80, 1993.
- SELLERS, L.A., CARROLL, N.J.H., ALLEN, A. Misoprostol-induced increases in adherent gastric mucus thickness and luminal mucus output. **Digestive Diseases and Sciences**, 31 (2), 91S-95S, 1986.
- SHAMBUREK, R.D. & SCHUBERT, M.L. – Pharmacology of gastric acid inhibition. **Baillieres Clin. Gastroenterol.**, 7(1): 23-24, 1993.
- 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.
- SILVA, E.P., SILVA, D.F.S., JANSEN, J.T., LUDVIG, J.C. & NOGARA, M.A.S. – **Úlcera Péptica. Revista Brasileira de Medicina**, 54: 83-96, 1997.
- SILVERSTEIN, R.M., BASDLER, G.C., & MORRILL, T.C. Espectrometria de massas. In: ____-. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos** Ed. Guanabara Dois, 4-64, 1979.
- SMEDFORS, B. & JOHANSSON, C. Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by misoprostol. **Digestive Diseases and Sciences**, 31: (2) 96S-100S, 1986.
- SOBUE, M., JOH, T., OSHIMA, T., SUZUKI, H., SENO, K., KASUGAI, K., NORUMA, T., OHARA, H., YOKOYAMA Y & ITOH M. – Contribution of capsaicin-sensitive afferent nerves to rapid recovery from ethanol-induced gastric epithelial damage in rats. **J. Gastroenterol Hepatol**. 18(10): 1188-95, 2003.

- SOUCCAR C. Inibidores da secreção ácida e drogas antiúlcera péptica. IN **Bases Moleculares da Biologia, da Genética e da Farmacologia**. SCHOR N., BOIM M.A., SANTOS O.F.P. Editora Atheneu, São Paulo, 309-317, 2003.
- STICKNEY, J.C. & NORTHUP, D.W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. **Exp. Biol. Med.**, v.101, 585, 1959.
- SUYENAGA, E.S., RECHE, E., FARIAS F.M., SCHAPOVAL, E.E., CHAVES. C.G.M. & HENRIQUES, A.T. – Antiinflammatory investigation of some species of Mikania. **Phytotherapy Research**, 16: 519-523, 2002.
- SZABO, S. – Mechanism of gastric mucosal injury and protection. **J. Clin. Gastroenterol.**, 13(Suppl.2): S21-S34, 1991.
- SZABO, S. & SZELENYI, I. – Cytoprotection in gastrointestinal pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, 8: 149-154, 1987.
- SZABO, S. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, 214, 201-202, 1981.
- SZABO, S.; PIHAN, G.; RAZA, A.; MULLER, E. A. & HAUSCHKA, P.V. – Multiple mechanisms of cell injury in the gastric mucosa. **Fed. Proc.**, 48: 1152, 1987.
- SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J.; HOMAN, H.D. & BRADFORD, J.C. – A quantitative method for assessing the extend of experimental gastric erosions and ulcers. **J. Pharmacol. Methods.**, 13(1): 59-66, 1985.
- TACHÉ, Y.; GARRICK, T. & RAYBOULD, H. – Central nervous system of peptides to influence gastrointestinal motor function. **Gastroenterology**, 98(2): 517-528, 1990.

- TACHÉ, Y.; RAYBOULD, H. & WEI, J.Y. – Central and peripheral actions of calcitonin gene-related peptide on gastric secretory and motor function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **298**: 183-198, 1991.
- 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. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **248** (2): 836-841, 1989.
- TARI, A., HAMADA, M., KAMIYASU, T., SUMII, K., HARUMA, K., INOUE, M., KISHIMOTO, S., KAJIYAMA, G., WALSH, J.H. - Effect of enprostil on omeprazole- induced hypergastrinemia and inhibition of gastric acid secretion in peptic ulcer patients, **Digestive Diseases and Sciences**, **42** (8), 1741-1746, 1997.
- TATEMACHI, M., OGURA, T., SAKURAZAWA, N., NAGATA, H., SUGITA M. & ESUMI H. – Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers. **Int. J. Exp. Pathol.** **84**(50): 213-20, 2003.
- THOMPSON, A.C. & NICOLLIER, G. Essential oil and terpenoides of *Mikania micrantha* , **Phytochemistry** **20** (11), 2587-2588, 1981.
- UCHIDA, M. MATSUEDA, Y., SHODA, R., MURAOKA, A. & YAMATO, S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. **Jpn. J. Pharmacol.**, v.85, 133-138, 2001.
- VILEGAS, J.H.Y., MARCHI, E. & LANÇAS, F. Determination of Coumarin and Kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ("Guaco") Leaves by Capillary Gas Chromatography, **Phytochemical Analysis** **8**, 74-77, 1997.

- VUYYURU, L., SCHUBERT, M.L., HARRINGTON, L., ARIMURA, A., MAKHLOUF, G.M. - Dual inhibitory pathways link antral somatostatin and histamine secretion in human, dog, and rat stomach, **Gastroenterology** **109**, 1566-1574, 1995.
- WALLACE, J.L. & CHIN, B.C. - Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury, **P.S.E.B.M.**, **214**, 1997.
- WALLACE, J.L. & GRANGER, D.N. - The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **Faseb J.**, **10 (7)**: 731-740, 1996.
- WALSH, J.H. - Peptides as regulators of gastric acid secretion, **Ann. Ver. Physiol.** **50**, 41-63, 1988.
- WATANABE, H., HIRAISHI, H., ISHIDA, M., KAZAMA, J.J. & TERANO, A. - Pathophysiology of gastric acid secretion in patients with chronic renal failure: influence of *Helicobacter pylori* infection. **J. Intern. Med.**, **254 (5)**: 439-46, 2003.
- WILKES, J.M.; KAJIMURA, M.; SCOTT, D.R.; HERSEY, S.J. & SACHS, G. - Muscarinic responses of gastric parietal cells. **J. Membr. Biol.**, **122**: 97-110, 1991b.
- WILKES, J.M.; SCOTT, D.R.; HERSEY, S.J. & SACHS, G. - Second messengers in the gastric gland: a focus on calcium. **Scand. J. Gastroenterol.**, **180**: 70-84, 1991a.
- WINGATE, D.L. Neurophysiology of the gastrointestinal tract. **The Gastroenterology Ann.**, **3**: 258-283, 1986.
- YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; REHDER, V.G.; KOO, H.; CECANHO, R.; GONÇALVES, R.B. Effect of *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* on mutans streptococci. **Journal of dental research**, **80 (4)**: 1054-1054, 2001.