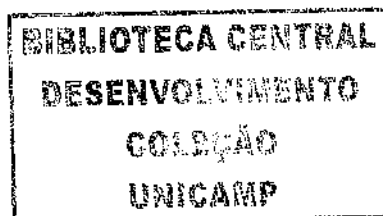


MARINA GUIMARÃES SIQUEIRA

**Atividade Antiulcerogênica do Extrato Bruto Hidroalcoólico
da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini**

CAMPINAS

2006



MARINA GUIMARÃES SIQUEIRA

**Atividade Antiulcerogênica do Extrato Bruto Hidroalcoólico
da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica na área de Ciências Básicas.*

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

CPQBA/ UNICAMP

CAMPINAS

2006

UNIDADE 86
Nº CHAMADA 1/UNICAMP
Si75a
V _____ EX _____
TOMBO 50/ 67975
PROC 46.323.06
C _____ D X
PREÇO 4,00
DATA 12/04/06
Nº CPD _____

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

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

Si75a

Siqueira, Marina Guimarães

Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico da
Luehea divaricata Martus et Zuccarini. / Marina Guimarães Siqueira.
Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : João Ernesto de Carvalho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Úlcera gástrica. 2. Plantas medicinais. 3. Mucosa gástrica.
4. Extratos vegetais. 5. Prostaglandinas. I. Carvalho, João Ernesto
de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Título em inglês: *Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract of Luehea divaricata Martus et Zuccarini*

Keywords: Gastric ulcer ; Plants, Medicinal; Gastric mucosa; Plant extracts;
Prostaglandins

Área de concentração: Clínica médica

Titulação: Mestrado

Banca examinadora: Profª.Drª. Aparecida Erica Bighetti ; Profª.Drª Maria
Cristina Teixeira Duarte; Suplentes: Prof.Drº. Rodney Alexandre Rodrigues ;
Profº Drº Ivaldo Pontes Jankowsky

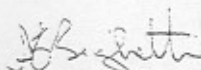
Data da defesa: 20 / 01 / 2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

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

Membros:

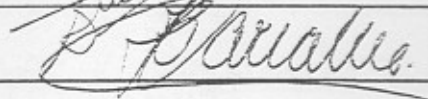
1. Prof(a). Dr(a) Aparecida Érica Bighetti



2. Prof(a). Dr(a). Marta Cristina Teixeira Duarte



3. Prof(a). Dr(a). João Ernesto de Carvalho



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

Data: 20/01/2006

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida!

A minha mãe, Virgínia, pelo amor, apoio, incentivo e sacrifícios...

*Por sempre estar ao meu lado em todos os momentos e por
ser um exemplo de vida pra mim.*

*Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho,
pelas oportunidades, ensinamentos, estímulos e atenção
durante a realização desse trabalho. À você, toda a minha admiração!*

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)- Unicamp, por oferecer suas instalações para a realização desse trabalho.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Clínica médica da Unicamp, pela inserção no programa de pós-graduação.

A Dr. Mary Ann Foglio pela orientação na realização do trabalho fitoquímico, além de sua atenção e amizade.

A Luciana Jankowsky pela convivência e amizade que construímos durante todos estes anos.

A Ana Possenti, pela colaboração na realização dos experimentos e principalmente pela amizade e carinho.

À Luciana Kohn, Sirlene Tinti, Márcia Aparecida Antônio, Karin Maia, Marcilene, Vanessa, Juliana Lessa, Cristianne, Alik Fernandes e Calú pela amizade e colaboração na realização dos experimentos.

Ao Prof. José Luis Haiello pela disponibilidade para a coleta da espécie vegetal estudada.

À Ericosa pela sua inestimável amizade e ensinamentos que com certeza serão pra vida toda.

Ao Rogério por estar ao meu lado em mais essa etapa da minha vida.

À Carol Garcia pela sua amizade e apoio durante a realização desse trabalho.

A todos os meus familiares que me apoiaram e torceram pela obtenção desse título.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão desse trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

*“Mas há a vida que é para ser intensamente vivida,
há o amor. Que tem que ser vivido até a última
gota. Sem nenhum medo. Não mata.”*

Clarice Lispector

	PÁG.
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUÇÃO.....	21
REVISÃO DA LITERATURA.....	26
OBJETIVOS.....	32
MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
1- Obtenção do Material vegetal.....	35
2- Processamento Fitoquímico.....	35
2.1- Obtenção do Extrato Bruto de <i>Luehea divaricata</i>	35
2.2- Triagem Fitoquímica.....	36
2.3- Obtenção das Frações Aquosa (FA) e Orgânica (FO).....	40
2.4- Obtenção da Fração Aquosa Hidrolisada (FAH).....	42
3- Análises Cromatográficas.....	42
Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	42
4- Atividade Antiproliferativa.....	43
4.1- Plaqueamento de células.....	44
4.2- Avaliação da atividade anticâncer.....	45
5- Testes de Atividade Farmacológica.....	47
5.1- Animais.....	47
5.2- Triagem de atividade geral do EBH 70%.....	47
5.3- Úlcera Induzida por Indometacina.....	47

5.4- Úlcera Induzida por Etanol.....	48
5.5- Determinação da Dose Efetiva 50% (DE ₅₀).....	49
5.6- Ligadura do Píloro.....	49
5.7- Estudo da Participação das Substâncias Sulfidrílicas Não Proteicas na Citoproteção Gástrica.....	50
5.8- Estudo da Participação das Prostaglandinas na Citoproteção Gástrica....	51
5.9- Estudo da Participação do Muco na Citoproteção Gástrica.....	51
6- Análise Estatística.....	52
RESULTADOS.....	53
1-Triagem Fitoquímica do EBH 70% de <i>Luehea divarivcata</i>.....	54
2- Análise por CCD do EBH 70%, FA, Fo, FAH e Epigallocatequina Gallato.....	55
3- Teste de Atividade Antiproliferativa do EBH 70%.....	59
4- Triagem da Atividade Geral do EBH 70% de <i>Luehea divaricata</i>.....	61
5- Úlcera Induzida por Indometacina-EBH 70%.....	61
6- Úlcera Induzida por Etanol-EBH 70%.....	62
7- Úlcera Induzida por Etanol- Frações Aquosa (FA) e Orgânica (FO).....	63
8- Úlcera Induzida por Etanol- FA, FAH e Epigallocatequina Gallato.....	64
9- Determinação da Dose Efetiva 50% (DE₅₀).....	66
10- Ligadura do Píloro.....	67
11- Estudo da Participação das Substâncias Sulfidrílicas Não Protéicas na Citoproteção Gástrica.....	67
12- Estudo da Participação de Prostaglandinas na Citoproteção Gástrica....	69
13- Estudo Quantitativo da Participação do Muco na Citoproteção Gástrica.....	70

DISCUSSÃO.....	72
CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

	PÁG.
Tabela 1- Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas na triagem do efeito antiproliferativo.....	44
Tabela 2- Triagem da concentração necessária do EBH 70% para inibir 50% do crescimento celular.....	60
Tabela 3- Efeito do EBH 70% (vo) das cascas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	62
Tabela 4- Efeito da administração do EBH 70% (vo) das cascas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> e da carbenoxolona (vo), em modelo de úlcera induzida por etanol.....	63
Tabela 5- Efeito da administração das frações aquosa (FA) e orgânica (FO) (vo), e da carbenoxolona (vo), em modelo de úlcera induzida por etanol.....	64
Tabela 6- Efeito da administração (vo) das frações aquosa (FA), orgânica (FO), aquosa hidrolisada (FAH) e epigallocatequina, em modelo de úlcera induzida por etanol...	65
Tabela 7- Efeito da administração (vo) das doses 100, 300, 500 e 1000 mg/Kg do EBH 70% de <i>Luehea divaricata</i> , em modelo de úlcera induzida por etanol.....	66
Tabela 8- Efeito da administração intraduodenal do EBH 70% das folhas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro.....	67

Tabela 9-	Efeito do EBH 70% das cascas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com NEM.....	68
Tabela 10-	Efeito do EBH 70% das cascas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com indometacina.....	70

	PÁG.
Figura 1- Exemplo de <i>Luehea divaricata</i> Martus et Zuccarini.....	25
Figura 2- Fluxograma de obtenção do EBH 70% a partir da casca seca e moida de <i>Luehea divaricata</i>	36
Figura 3- Fluxograma de triagem fitoquímica para verificação dos principais grupos químicos presentes no EBH 70%.....	39
Figura 4- Fluxograma de obtenção das FA e FO a partir do EBH 70% de <i>Luehea divaricata</i>	41
Figura 5- Fluxograma de obtenção da FHA a partir da FA de <i>Luehea divaricata</i>	42
Figura 6- Exemplar de placa de cultura celular.....	46
Figura 7- Cromatografia em camada delgada dos EBH 70%, FA, FO, FAH e Epigallocatequina.....	55
Figura 8- Cromatografia em camada delgada dos EBH 70%, FA, FO, FAH e Epigallocatequina.....	56
Figura 9- Cromatografia em camada delgada dos EBH 70%, FA, FO, FAH e Epigallocatequina.....	57
Figura 10- Cromatografia em camada delgada dos EBH 70%, FA, FO, FAH e Epigallocatequina.....	58
Figura 11- Curva concentração-atividade de doxorrubicina sobre linhagens celulares tumorais humanas.....	59

Figura 12-	Curva concentração-atividade do EBH 70% sobre linhagens celulares tumorais humanas.....	60
Figura 13-	Efeito do EBH 70% das cascas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> e da cimetidina (vo), e modelo de úlcera induzida por indometacina.....	61
Figura 14-	Efeito do EBH 70% das cascas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> e da carbenoxolona (vo), em modelo de úlcera induzida por etanol.....	62
Figura 15-	Efeito das frações aquosa (FA) e orgânica (FO) obtidas a partir do EBH 70% e da carbenoxolona (vo), em modelo de úlcera induzida por etanol.....	63
Figura 16-	Efeito das frações aquosa (FA), orgânica (FO), aquosa hidrolisada (FAH) , epigallocatequina gallato e carbenoxolona (vo) em modelo de úlcera induzida por etanol.....	65
Figura 17-	Dose efetiva 50% para as doses 100, 300, 500 e 1000mg/Kg do EBH 70% de <i>Luehea divaricata</i>	66
Figura 18-	Efeito do EBH 70% (vo) das folhas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com NEM.....	68
Figura 19-	Efeito do EBH 70% (vo) das folhas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com indometacina.....	69
Figura 20-	Efeito do EBH 70% (vo) das cascas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> em modelo de úlcera induzida por etanol e coradas com Alcian Blue para a quantificação de muco estomacal.....	70

Figura 21-	Exemplar de estômago tratado com EBH 70% (vo) das cascas secas e moídas de <i>Luehea divaricata</i> em modelo de úlcera induzida por etanol.....	79
Figura 22-	Exemplar de estômago tratado com FAH (vo) a partir do EBH 70% em modelo de úlcera induzida por etanol.....	79
Figura 23-	Exemplar de estômago tratado com epigallocatequina gallato em modelo de úlcera induzida por etanol.....	79

RESUMO

A *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini (Tiliaceae) geralmente é encontrada em alguns estados do Brasil como Rio de Janeiro, Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. Trata-se de uma árvore de 16 metros de altura, com casca fina, de coloração pardo-acinzentada, com numerosos e pequenos sulcos longitudinais e que floresce de dezembro a fevereiro. Conhecida popularmente como “Açoita-cavalo”, sua casca é empregada na medicina popular, na forma de decocto, como antiinflamatório, diurético e anti-reumático. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiulcerogênica de extratos obtidos da *Luehea divaricata*, determinar o possível mecanismo de ação e identificar prováveis substâncias ativas. Para a obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EBH 70%), foram utilizadas as cascas secas e moídas da espécie acima, coletada na reserva florestal de Leme. Esse extrato foi avaliado em modelos de úlcera gástrica induzida por indometacina e etanol. Para estudo do mecanismo de ação avaliou-se a participação de grupos sulfidril, prostaglandinas, inibição da secreção ácida gástrica e quantificação de muco gastroprotetor. Uma triagem fitoquímica foi realizada para identificar substâncias presentes no EBH 70% e placas de CCD também foram feitas para comparar os extratos testados e seus constituintes. O EBH 70% de *L. divaricata* reduziu o índice de lesões ulcerativas produzido por indometacina e etanol. Esse mecanismo de ação antiulcerogênico está parcialmente relacionado com a atividade de radicais sulfidril e pela precipitação de proteínas produzida pela presença de polifenóis (flavonóides, catequinas, antocianinas, taninos), identificados entre os princípios ativos dessa espécie. Além de polifenóis a triagem fitoquímica identificou a presença saponinas, esteróides triterpênicos e antracenosídeos.

ABSTRACT

The *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini (Tiliaceae) is generally found in some States of Brazil such as Rio de Janeiro, Bahia, São Paulo, Minas Gerias, Goiás and Mato Grosso do Sul. It is a sixteen-metre-tall tree with fine bark and greyish colour which blossoms from December to February. It is popularly known as “açoita-cavalo” and its bark is used in popular medicine in the form of decoction as an antiinflammatory, diuretic and rheumatic drug. This work aimed at evaluating the anti-ulcerative activity of the hydro-alcoholic extract and the fractions obtained from the *Luehea divaricata* as well determine the probable mechanism of the action involved. Dried-milled bark was used in order to obtain the hydro-alcoholic extract of *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini (EBH 70%). The EBH 70% was evaluated in models of indomethacin and ethanol induced ulcer in a dose of 1g/kg. For the study of the mechanism action participation of sulfhydryl, prostaglandin, acid gastric secretion and quantification of mucus protector was evaluated.. A phytochemical screening was also carried out to identify the components present in EBH 70%. The result showed that the EBH 70% of *Luehea divaricata* performs an important anti-ulcerative action and that its mechanism of action may be related to the participation of the sulfhydrylic non-protein substances. Moreover, this protective action should be consequence to condensed tannins presents in this extract. These compounds have been described in the literature as responsible for this antioxidan and cicatrizing local action.

Key words – *Luehea divaricata* gastric ulcer, gastro-protection, animal model-ethanol- non-steroidal antiinflammatory drug, gastric mucosal injury.

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais constitui-se muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Este uso e eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não ter seus constituintes químicos conhecidos (Maciel et al., 2002).

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas por povos de várias civilizações há mais de cinco mil anos. Na China, por volta de 140 novas drogas foram descobertas a partir de plantas medicinais (Zhang, 2002).

Na área farmacêutica, as plantas e os extrativos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fármacos (que são de substâncias ativas isoladas), como para a obtenção de adjuvantes (produtos utilizados na formulação de medicamentos) ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (Schenkel et al., 2001).

Na Europa, o consumo de fitoterápicos dobrou nas últimas décadas, demonstrando o grande interesse em plantas medicinais. No entanto, das aproximadamente 250.000 a 500.000 espécies vegetais conhecidas, somente uma pequena percentagem tem sido submetida a estudos farmacológicos e fitoquímicos sistemáticos (Hamburger & Hostettmann, 1991; Hamburger et al. 1991).

As plantas medicinais são utilizadas basicamente de duas formas:

- "*in natura*" como um complexo de seus constituintes, ou

após extração, purificação e isolamento de princípios ativos com estruturas químicas definidas.

Os princípios ativos isolados são geralmente preferidos quando a substância exibe atividade específica com alto índice terapêutico, exigindo dosagem acurada e efeito reprodutível. No entanto, as plantas superiores, as árvores em particular, crescem muito lentamente, o que limita o suprimento de material para obtenção de compostos puros em quantidade. Além disso, estão sujeitas a alterações sazonais e inúmeros outros fatores extrínsecos do ecossistema, o que dificulta o controle da expressão genética dos princípios ativos e conseqüentemente, o controle da eficácia terapêutica a que se propõem (Maciel et al., 2002).

É compreensível, portanto, que nos grandes centros as plantas superiores sejam apenas uma fonte de novos compostos que sirvam de modelo para o desenvolvimento de novas drogas, ou para a obtenção de novos instrumentos de pesquisa. O processo de estudo de uma planta é longo e multidisciplinar envolvendo botânicos, farmacologistas, químicos e toxicologistas, desde os estudos iniciais com o extrato bruto, até a obtenção de um composto puro e biologicamente ativo (Simões e Sckenkel., 2001).

O estudo medicinal de uma planta inicia-se com a seleção da espécie a ser estudada, sendo este um fator crucial no sucesso da investigação. A escolha pode ser baseada em considerações quimiotaxonômicas ou no seu uso etnofarmacológico. As plantas selecionadas pelo uso na medicina popular, em particular, têm grande chance de conter compostos biologicamente ativos. Por exemplo, segundo alguns autores, existe estreita correlação entre a atividade biológica anticancerígena e plantas usadas na medicina popular para este fim (Hamburger & Hostettmann, 1991; Hamburger et al., 1991).

O Brasil, graças ao seu solo riquíssimo em combinação com o clima tropical favorável, é dotado de uma flora variada e, sobretudo, volumosa constituindo uma das mais ricas biodiversidades em todo o mundo. Aqui, como em todo o mundo, o uso popular de plantas nos mais diferentes males é antigo. Contudo, a avaliação da eficácia desse uso ultrapassa as competências locais e numerosas plantas usadas popularmente como medicinais não são reconhecidas como tal pelo sistema de saúde oficial (Hamburger & Hostettmann, 1991).

De acordo com dados presentes no Relatório da Organização Mundial da Saúde, grande parte da população dos países em desenvolvimento fazem uso rotineiro de plantas medicinais. Os produtos de origem vegetal podem atuar de forma similar a medicamentos alopáticos possuindo também efeitos colaterais, sendo necessário reunir conhecimento popular e, principalmente científico para garantir a segurança e eficácia desses produtos (Wargovich, 2001).

As plantas do gênero *Luehea* geralmente são encontradas em alguns estados do Brasil como Rio de Janeiro, Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul.

Conhecida popularmente como “Açoita-cavalo”, trata-se de uma árvore de 16 metros de altura (figura 1), pertencente à família Tiliaceae, com casca fina, de coloração pardo-acizentada, com numerosos e pequenos sulcos longitudinais que floresce de dezembro a fevereiro (Tanaka, et al., 2003).

Possuem folhas alternas, oblongas, membranáceas, irregularmente serradas, com pilosidade brancacenta na face inferior, de 5 a 15 cm de comprimento, pecíolo de 6 a 10 cm de comprimento, com estípulos. Flores brancas ou róseas, providas de calícula. Fruto cápsula, coberto de pilosidade cor castanha, sementes pretas, achatadas e com curta haste em um dos lados (Pio Corrêa, 1942).

As folhas de *L. divaricata* são comercializadas como fitoterápicos contra disenteria, leucorréia, reumatismo, blenorragia e tumores; a infusão de flores é usada contra bronquite e a raiz é depurativa (Tanaka et al., 2005). Já as cascas das espécies do gênero *Luehea* são utilizadas na medicina popular, na forma de decocto, como cicatrizantes de feridas na pele, espinhas e para fazer duchas vaginais. Também são usadas como diurética, anti-reumática e antiinflamatória (Zaccino et al., 1998).

Devido sua indicação popular como cicatrizante, buscou-se avaliar a possível atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico (EBH 70%), em modelos experimentais.



Figura 1-Exemplar de *Luehea divaricata*

REVISÃO DA LITERATURA

O estômago é dividido em quatro regiões anatômicas, denominadas cárdia, fundo, corpo e antro revestidos por uma mucosa, que apresenta uma série de depressões e glândulas. Nas depressões estão as células epiteliais superficiais, enquanto que as glândulas localizadas no fundo e corpo são constituídas por três tipos distintos de células: as parietais (responsáveis pela secreção de ácido clorídrico), as endócrinas (secreção de muco) e as principais (secreção de pepsinogênio). No antro, estão localizadas as células G responsáveis pela secreção de gastrina (Bighetti et al., 2002).

A inervação do estômago compreende fibras extrínsecas e intrínsecas, sendo que a extrínseca é constituída por ramos autonômicos, através de fibras parassimpáticas de origem vagal e terminam no plexo mientérico da parede do estômago. A grande maioria das fibras nervosas gástricas estende-se pelo estômago pela via do nervo vago. A inervação intrínseca compreende neurônios intrínsecos que formam o submucoso, plexo mientérico e gânglio seroso (Ekblom, et al, 2000).

A defesa da mucosa gastroduodenal em virtude da constante redução do pH luminal está subdividida em pré-epitelial, epitelial e subepitelial. Através de fatores endógenos como prostaglandinas (PGs), glutatona reduzida (substâncias sulfidrílicas não protéicas) e óxido nítrico, as ativações dos receptores proteínase-ativadas (PAR 1 e 2) por proteases, promovem hiperemia, aumento de secreção de muco e de bicarbonato de sódio, assim como a inibição da secreção ácida (Kaunits et al., 2004).

O papel dado para o ácido gástrico na patogênese da úlcera gástrica tem mudado significativamente durante os últimos 25 anos. Por décadas acreditou-se que a hipersecreção de ácido era o fator final e dominante na úlcera duodenal e que fatores ulcerogênicos extrínsecos, como estresse, alimentos, e condimentos, operassem como estimulantes da secreção ácida. Muitos mecanismos intrínsecos da secreção ácida foram encontrados anormalmente em pacientes com úlcera duodenal, levando à hipersecreção tais como um aumento do número de células parietais, da sensibilidade das mesmas frente à estimulação, do impulso vagal e da liberação pós-prandial de gastrina (Hojgaard et al., 1996).

Na secreção ácida gástrica estão envolvidos mediadores como histamina, gastrina e acetilcolina (Borocelly et al., 1997). A histamina é um autacóide que aumenta a secreção ácida gástrica através de estimulação dos receptores H_2 presentes nas células parietais da mucosa gástrica (Black et al., 1972; Hersey & Sachs, 1995, 1995). No estômago, a histamina é estocada em células na forma de grânulos enterocromafins residem na metade basal da glândula oxíntica (Schumbert., 2003). Quando administrada sozinha ou em combinação com outros agentes, induz lesões gástricas e/ou duodenal. O mecanismo pelo qual a histamina induz essas lesões gástricas é semelhante à estimulação de um potente ácido e/ou uma vasodilatação que aumenta a permeabilidade vascular (Amagase et al., 2003).

A gastrina é produzida pela célula G antral, sendo o principal hormônio estimulante da secreção ácida durante a ingestão de alimento. Ela regula o desenvolvimento de tecido humano normal e câncer gastrointestinal (Schubert, et al., 2003).

A colecistocinina (CCK), conhecida como um hormônio gastrointestinal, é agonista neural. Juntamente com a gastrina, é liberada pelo estômago e parte do intestino, constituindo-se um mediador fisiológico de várias funções, tais como a secreção e esvaziamento gástrico (Park et al., 2005). Há evidências de que estes peptídeos também possam atuar sobre a manutenção da mucosa gástrica através da ligação a receptores específicos (CCK-A para colecistocinina e CCK-B para a gastrina) localizados em fibras vagais sensíveis à capsaicina (Schumbert, et al., 2000).

No estômago, a somostatina que está presente na célula D inibe diretamente a secreção ácida da célula parietal, indiretamente pela inibição de secreção de histamina dos enterocromafins e da secreção de gastrina pelas células G (Schumbert, 2003).

A pentagastrina corresponde à extremidade funcional da molécula de gastrina, a qual foi acrescentada uma β -alanina substituída. Este composto age sobre os receptores CCK-B de gastrina, aumentando a liberação de ácido gástrico e ainda estimula a secreção de histamina das células enterocromafins (Hersey et al., 1995). A acetilcolina é um agonista seletivo para receptores muscarínicos, que estão envolvidos no aumento da secreção ácida gástrica (Augus et al., 1982).

As prostaglandinas são sintetizadas pela ação da ciclooxigenase sob o ácido aracdônico, liberado dos fosfolipídios de membrana (Eberhart et al., 1995). A sua função citoprotetora não está bem esclarecida, porém sabe-se que as prostaglandinas das séries E, F e I são sintetizadas em grandes quantidades por todo o trato gastrointestinal. No estômago, as prostaglandinas têm um papel vital de proteção através da estimulação da secreção de bicarbonato e muco, manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa e regulação da renovação e proteção das células da mucosa (Batista et al., 2004).

O óxido nítrico é sintetizado por uma reação enzimática entre oxigênio molecular e a L-argenina. Desempenha papel fundamental nos sistemas cardiovascular e nervoso central bem como no sistema de defesa do organismo (Elliot et al., 1995). No trato digestivo atua sobre a secreção de muco, fluxo sanguíneo, secreção de bicarbonato, bem como sobre a resistência da mucosa a agressores (Bighetti et al., 2002). O seu efeito citoprotetor se dá por promover vasodilatação e consequentemente um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, acelerando a retirada dos íons H^+ e aumentando o aporte de nutrientes para a mesma (Kato et al., 1998).

A capsaicina, componente ativo das pimentas vermelhas (páprica), é o ingrediente tirado da pimenta utilizada pelos humanos. A parte usada como tempero na culinária tem um componente com uma grande importância farmacológica. É seletivo para neurônios aferentes dorsais de mamíferos. (G. Mozsik et al., 2001). Foi relatado que em baixas concentrações protege a mucosa gástrica de ratos contra a injúria produzida por diversos agentes antiulcerogênicos, por inibição da secreção ácida gástrica. Em humanos esse efeito foi relatado em alguns estudos, mas ainda necessita de melhor esclarecimento (Salam et al., 1997).

A glutathione está envolvida em várias funções biológicas fundamentais, incluindo captura de radicais livres tóxicos, detoxificação de xenobióticos e carcinogêneos; reduz reações como a síntese do DNA, proteínas e leucotrienos. Elevadas concentrações de glutathione reduzida estão relacionadas com a citoproteção gástrica por impedir a ação desses radicais livres nocivos (Ristoff et al., 2003).

Helicobacter pylori tem adquirido grande importância durante as últimas décadas, ao ser reconhecido como um importante patógeno que infecta uma grande proporção da população humana. Este microrganismo é reconhecido como o principal agente causal da gastrite crônica e da úlcera duodenal, estando associado também ao desenvolvimento do carcinoma gástrico (Pernag et al, 2004).

O fluxo sanguíneo 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 et al., 1996). A manutenção do fluxo sanguíneo na mucosa permite a rápida restituição de uma lesão epitelial (Szabo, 1991). As prostaglandinas são as principais responsáveis pelo aumento desse fluxo sanguíneo na mucosa.

H^+K^+ -ATPase é a bomba de prótons responsável pela secreção ácida gástrica. Esta bombeia íons de hidrogênio através da membrana canalicular da célula parietal contra um gradiente de concentração químico. Transportadores de íon potássio, cloreto e bicarbonato ligados às membranas apicais e basolateral permitem a secreção de íons hidrogênio e cloreto pela bomba de prótons. O HCl é transportado ao lúmen da mucosa por forças hidrostáticas através do gel de muco (Schumbert et al., 2003).

Em estudos recentes foram isolados alguns constituintes químicos do extrato bruto das cascas de *L.divaricata*, o flavonóide (-)-epicatequina, um flavan-3-ol, taninos e saponinas. Foram relatadas atividades antiproliferativa, antifúngica e antibacteriana desse extrato bruto (Tanaka et al., 2005).

Extratos brutos de algumas plantas medicinais ricos em taninos são tradicionalmente usados no tratamento de úlceras gástricas e gastrites. Os taninos condensados possuem dentre suas atividades biológicas efeitos antiinflamatórios e antiulcerogênicos (Khennouf et al., 2003) (Xie et al. 2005).

Existem basicamente dois mecanismos de ação para as drogas antiulcerogênicas. O primeiro deles, refere-se aos mecanismos que controlam o processo de secreção ácida gástrica. O segundo refere-se aqueles mecanismos que aumentam a

resistência das células da mucosa gástrica aos fatores agressivos como o ácido clorídrico, pepsina, ingestão de etanol e drogas antiinflamatórias e/ou limitam o acesso destes agentes às células da mucosa (Allen, 1993).

A maioria das drogas usadas para o tratamento das enfermidades gastrointestinais age como fatores ofensivos, neutralizando a secreção ácida como os antiácidos, bloqueadores dos receptores H_2 como a ranitidina, famotidina, anticolinérgicos como o pirenzepina, telezepina, bloqueadores de bomba de prótons como o omeprazol, lanzoprazol, etc. com interferência do ácido acético (Rao et al., 2004).

Úlcera gástrica e duodenal afeta uma grande proporção da população mundial e são induzidas por vários fatores, incluindo estresse, tabagismo, deficiência nutricional e a ingestão de antiinflamatórios não-esteroidais. A proteção da mucosa gástrica envolve fatores como a secreção de pepsina ácida, ativação das células parietais, barreira mucosa, secreção de muco, fluxo sanguíneo, regeneração celular e a liberação dos agentes endógenos protetores, especialmente prostaglandinas e fatores de crescimento epidermal. Nesse contexto, extratos e princípios ativos de plantas podem levar ao descobrimento de novas drogas. Flavonóides como as catequinas têm ação antiulcerogênica (Batista et al., 2003).

OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivos:

- Avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico a 70% (EBH 70%) das cascas secas e moídas da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini em modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos.
- Estudar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade antiulcerogênica do EBH 70%.
- Identificar os prováveis compostos envolvidos nessa atividade.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Obtenção do Material Vegetal

A *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini foi coletada na cidade de Leme (São Paulo/Brasil), identificada pelo Prof. Dr. Fernando de Oliveira da Universidade São Francisco (USF), Brasil. Uma exsicata da espécie está depositada no Herbário Frei Velloso, sob número VELL-0052, da Universidade São Francisco (USF), Brasil.

Foram utilizadas as cascas de um espécime vegetal cultivado a pleno sol e colhidas no período da manhã. Após a coleta, o material vegetal foi seco a uma temperatura de 45°C durante 24 horas em estufa (Fabbe, modelo 170), com circulação de ar. Posteriormente, as cascas foram moídas em moinho de facas (Stephen, modelo UM 40), produzindo-se partículas de aproximadamente 0,35 mm.

2- Processamento fitoquímico

2.1- Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini.

O pó das cascas de *L. divaricata* (300g) foi submetido à maceração dinâmica por um período de 24 horas, utilizando etanol a 70% (2L). Após este período o extrato foi filtrado à vácuo e o resíduo novamente extraído mais 2 vezes durante 4 horas cada (para esgotamento total da quantidade de droga em extração).

O resíduo vegetal foi descartado e o filtrado resultante foi evaporando sob vácuo e temperatura de 40° C. Em seguida a amostra foi liofilizada, obtendo-se assim o extrato bruto liofilizado. O rendimento de extração foi de 20% (60g) (Figura 2).

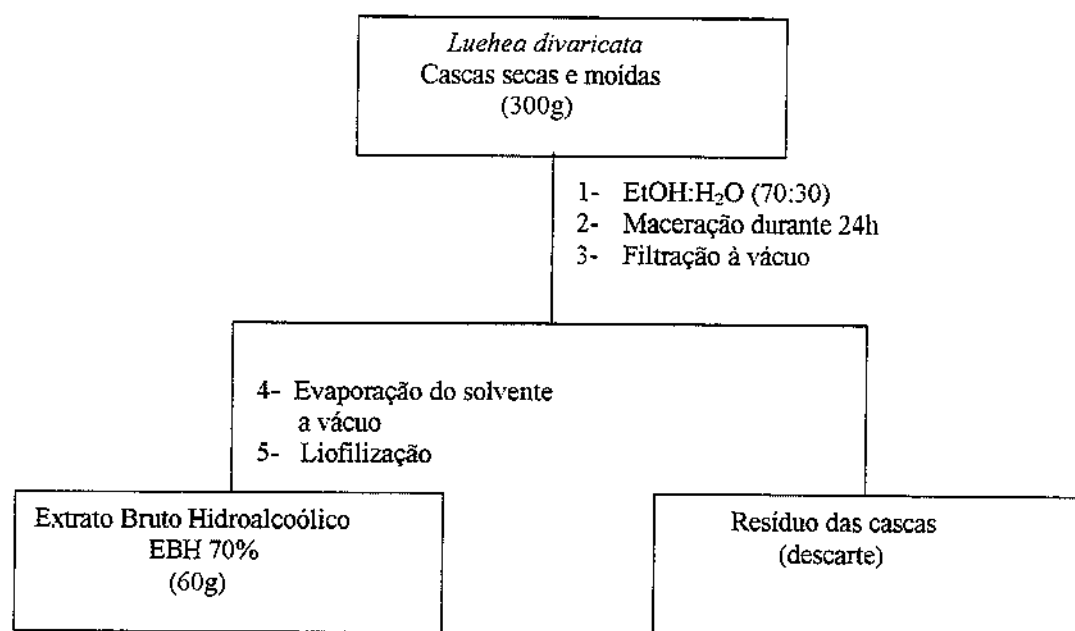


Figura 2- Obtenção do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBH 70%) de *L. divaricata*.

2.2- Triagem Fitoquímica Colorimétrica dos Compostos Presentes no EBH 70%

2.2.1- Preparo das amostras

As análises foram realizadas em duplicata, partindo-se do EBH 70% da casca da *L. divaricata*. Em um balão de fundo redondo de 250 ml contendo o EBH 70% (1g) dissolvido em etanol (50ml) foi adicionado HCl 20% (50ml) e o sistema foi submetido a refluxo por 1h. Após resfriamento, eliminou-se o etanol sob vácuo e adicionou-se H₂O (20ml).

A seguir em extração com éter etílico (3x 20ml), obtendo-se a fase aquosa ácida (FAA) e a fase orgânica etérea (FOE).

2.2.2- Análise de Grupos Químicos

- **Antocianinas**

Transferiu-se uma alíquota da FAA (3ml) para um tubo de ensaio, confirmou-se o pH ácido com papel de tornasol, basificou-se o meio pela adição de NH_4OH concentrado até pH 9-10.

A mudança da coloração avermelhada em pH ácido para coloração azul-esverdeada em pH alcalino, indica a presença de antocianinas.

- **Antracenosídeos**

Transferiu-se 5ml da FOE para um balão de fundo redondo e após evaporação total do solvente em rotaevaporador, adicionou-se NH_4OH 25% (3ml).

A presença da coloração avermelhada indica a presença de antracenosídeos.

- **Cumarinas**

Transferiu-se 5ml da FOE para um balão de fundo redondo e reduziu-se o volume para 1 ml. Duas alíquotas foram tomadas em capilar de vidro e aplicadas em papel de filtro. Foi aplicada 1 gota de solução de KOH 0,5% sobre uma das manchas e ambas foram observadas sob luz UV (365nm) sendo que uma mancha fluorescente indica a presença de cumarinas.

- **Esteróides e triterpenos**

Transferiu-se 10ml da FOE para um balão de fundo redondo e, após redução do volume, adicionou-se reagente de Libermann Burchard (gotas, lentamente pela parede do balão).

O aparecimento de um anel marrom indica a presença de esteróides e triterpenos.

- **Flavonóides**

Transferiu-se 10ml da FOE para um balão de fundo redondo e; após evaporação até secura, o resíduo foi dissolvido em 3 ml de metanol 50% a quente. Adicionou-se algumas limalhas de magnésio e 1ml de HCl 10%. A mudança da coloração para avermelhado indica a presença de flavonóides (figura 3).

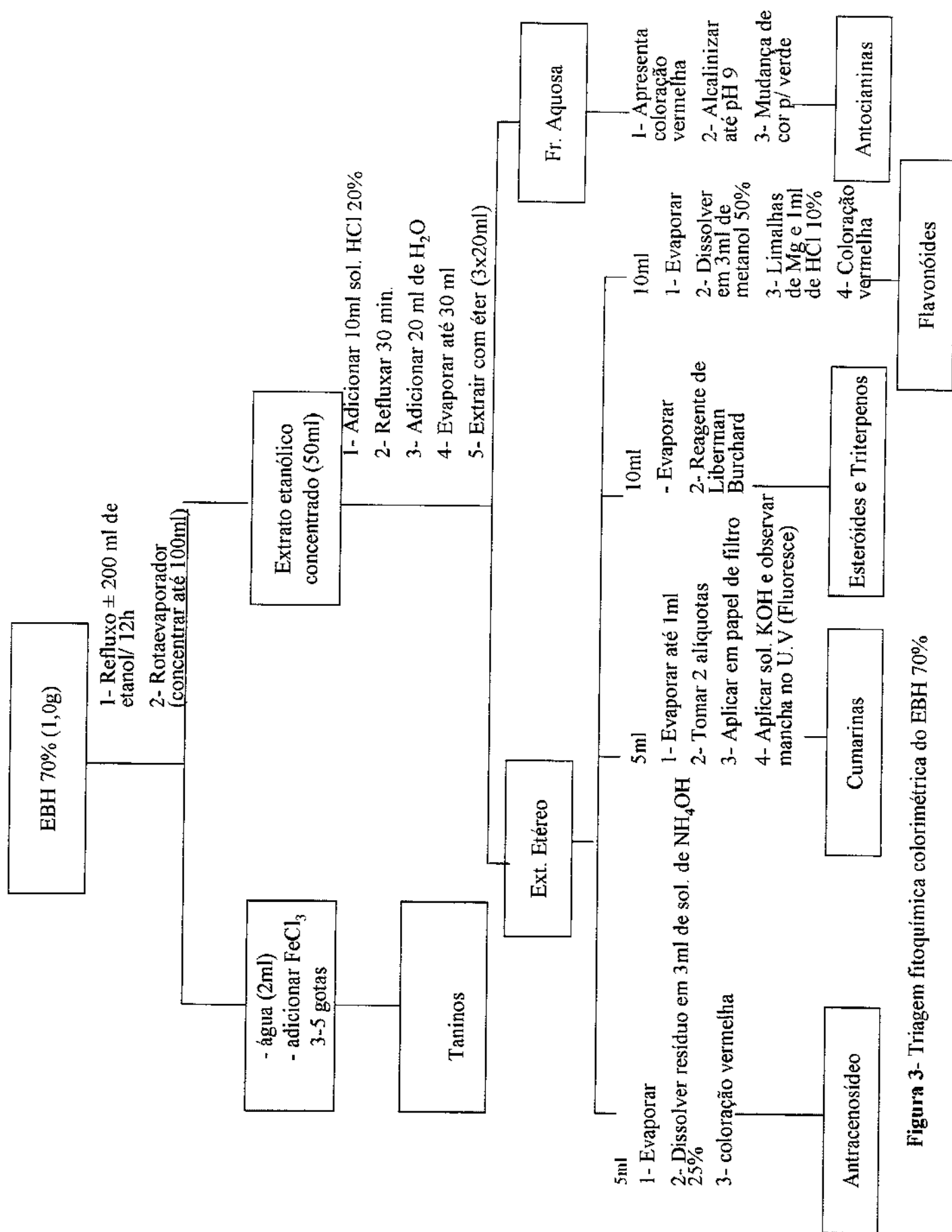


Figura 3- Triagem fitoquímica colorimétrica do EBH 70%

2.3- Obtenção das Frações Aquosa (FA) e Orgânica (FO) a partir do EBH 70% de *L.divaricata*

Em um balão de fundo redondo equipado com sistema de refluxo, adicionou-se o pó da planta seca (50g) em etanol 70% (250ml) deixando em refluxo durante 12 h.

Após resfriamento eliminou-se o etanol sob vácuo. A fase aquosa resultante foi extraída (3x) com acetato de etila (o mesmo volume da fase aquosa) em funil de separação, obtendo-se uma fase aquosa e uma fase orgânica. À fase de acetato de etila foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada em rotaevaporador, obtendo-se a fração orgânica (FO). O rendimento da extração foi de 2,4% (1,2g).

A fase aquosa foi então liofilizada, obtendo-se a fração aquosa (FA). O rendimento da extração foi de 13% (6,5g). (Figura 4).

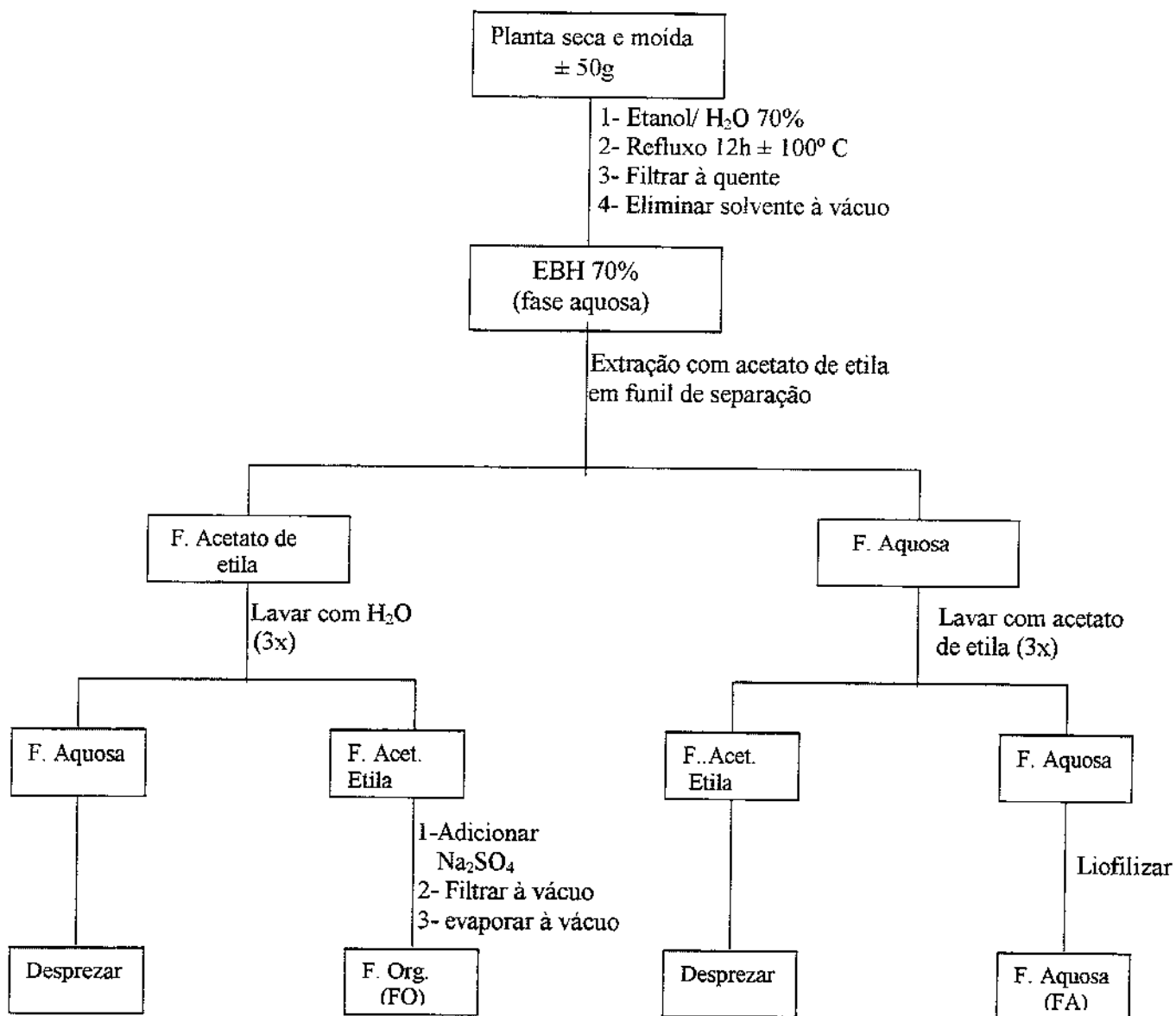


Figura 4- Fluxograma da obtenção das Frações Aquosa e Orgânica a partir do EBH 70% de *L. divaricata*

2.4- Obtenção da Fração Aquosa Hidrolisada (FAH)

Em balão de fundo redondo equipado com sistema de refluxo adicionou-se 4g da FA e uma solução de HCl 20%, mantendo-se o refluxo por aproximadamente 2h. Após resfriamento, extraiu-se com acetato de etila (3x) em funil de separação. As duas fases formadas foram separadas, sendo que a fase aquosa foi neutralizada (pH 7,0) com hidróxido de amônia. Eliminou-se os traços de solvente orgânico da fase aquosa em roatevaporador para posterior liofilização dando origem à Fração Aquosa Hidrolisada (FAH). O rendimento da extração foi de 75% (3,0g).

A fase de acetato de etila foi tratada com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada sob vácuo fornecendo 10% de rendimento (0,42g) (Figura 5).

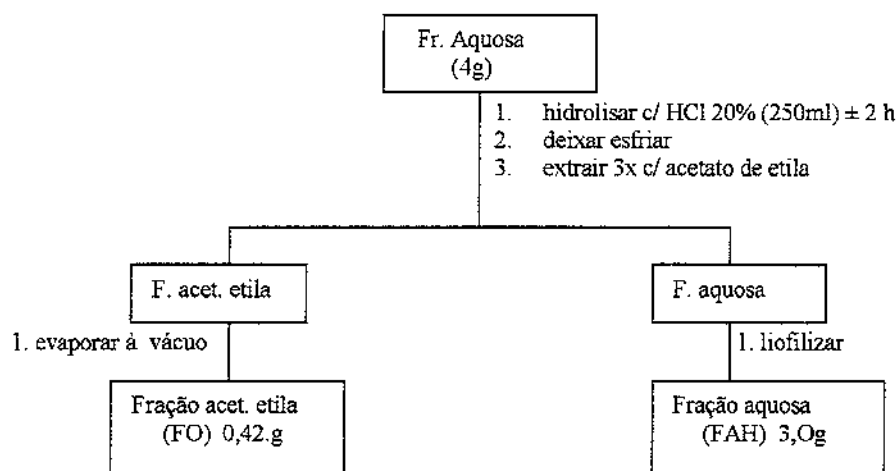


Figura 5- Fluxograma para obtenção da Fração Aquosa Hidrolisada(FAH)

3- Análises Cromatográficas

Cromatografia em Camada Delgada-CCD

Aliquotas de EBH 70%, FA, FO, epigallocatequina galato (DSM), FAH foram diluídas em etanol e analisados por CCD. Foram utilizadas cromatoplasas prontas de alumínio (Merck-artigo 5554) como fase estacionária e uma mistura de Ac. Acético:

Butanol:Água (5:20:25) como fase móvel. As placas foram desenvolvidas em cuba de vidro previamente saturada.

Como método físico para detecção dos compostos foi feita irradiação com lâmpada Ultravioleta (UV) a 254 e 365 nm. Como método químico de detecção foram utilizadas pulverização com solução de anisaldeído e de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) seguida de aquecimento da placa a 100°C, por 15 minutos, em estufa. Foi utilizada também a exposição da placa a vapores de iodo em cuba saturada.

4- Testes de Atividade Antiproliferativa

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram doadas pelo National Cancer Institute (NCI), EUA. Essas linhagens foram enviadas congeladas para o CPQBA/Unicamp, e estoques são mantidos sob congelamento em nitrogênio líquido.

Para descongelamento, o criotubo contendo as células foi mantido à temperatura ambiente, sendo então seu conteúdo transferido para um tubo de centrifuga de 15 ml e o volume completado para 10 ml com RPMI e soro fetal bovino (SFB). O tubo foi centrifugado a 4°C e 2000 rpm, por 4 minutos e o sobrenadante aspirado. O “*pellet*” celular foi ressuspendido cuidadosamente, para evitar a formação de grumos, com 5 ml de RPMI/SFB. A suspensão celular foi transferida para frascos de manutenção de 25cm² (T25) com 5 ml de RPMI-1640 /SFB 5% e incubada a 37°C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. As linhagens utilizadas neste projeto estão relacionadas na tabela 1.

Tabela 1- Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de atividade anticâncer, com as respectivas densidades de inoculação.

Tipo celular	Nome	Tipo de cultura	Densidade de Inoculação
Ovário	OVCAR	Aderida	7×10^4
Renal	786	Aderida	5×10^4
Próstata	PC03	Aderida	$4,5 \times 10^4$
Cólon	HT29	Aderida	5×10^4
Pulmão	NCI460	Aderida	4×10^4
Mama	MCF-7	Aderida	6×10^4
Mama Resistente	NCI ADR	Aderida	5×10^4
Leucemia	K-562	Não aderente	6×10^4
Melanoma	UACC-62	Aderida	4×10^4

4.1- Plaqueamento de Células

A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada nas 9 linhagens tumorais humanas apresentadas na Tabela 1. No primeiro dia de experimento, foi feito o plaqueamento de células nas placas de 96 divisões. Cada linhagem celular foi inoculada em uma placa, totalizando oito placas. Em uma outra placa, a placa controle (T0), foram inoculadas todas as linhagens celulares.

Após a aspiração do meio de cultura, foi adicionado 0,5 ml de tampão de Hank's banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Este líquido foi aspirado e então adicionado 0,5 ml de tripsina a 37°C, foi necessário a tripsinização para o despreendimento das células por ação enzimática. O frasco foi incubado por um período de 25 a 30 segundos sendo logo em seguida banhado com 5ml de meio RPMI/SFB/gentamicina. A partir deste momento, as células se apresentavam em suspensão.

Os frascos foram agitados delicadamente e uma alíquota foi retirada em câmara de Neubauer para contagem do número de células. Os quatro quadrantes externos foram contados e a média aritmética determinada. Este valor foi multiplicado pelo fator de correção da câmara, equivalente a 10^4 , estipulando a quantidade de células presentes em 5ml.

De acordo com a densidade de inoculação de cada linhagem (determinadas previamente) (Tabela 1) e com a quantidade de células presente nos 5 ml de suspensão celular foi calculada a quantidade de meio necessária para diluição das células a serem inoculadas. Esta diluição foi feita em tubos estéreis de 50ml. Foram então inoculadas 100µl de suspensão celular em compartimentos nas placas de 96 compartimentos e a seguir estas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

4.2- Avaliação da atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas

Os extratos e frações (amostras) foram diluídos em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1g/ml resultando em soluções estoques. Para a adição nas placas, as amostras foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, afim de serem adicionadas nas placas de 96 compartimentos nas concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250µg/ml. Neste momento, foi realizada a fixação da placa T0, com a adição de 50 µl de ácido tricloroacético a 50% (TCA), estimando assim a quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram colocadas.

As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, o experimento foi interrompido pela fixação das placas com a adição de 50 µl de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas pôr 1 hora a 4°C e então submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente para a secagem completa.

As placas secas foram coradas pela adição de 50µl de sulforrodamina B (corante protéico) a 0,4 % (peso/volume) em ácido acético a 1 %. Após 30 minutos de incubação a 4 °C, as placas foram lavadas por quatro vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150µl de Trizma Base (10µM) e a leitura espectrofotométrica

da absorbância foi feita em um leitor de microplacas. (ELISA – Molecular Devices Versa Max Microplate Reader.) (Figura 2).

O uso da sulforrodamina B (SRB) avalia a inibição de crescimento por um método colorimétrico que estima indiretamente o número de células presentes pelo doseamento do conteúdo protéico (Skehan et al., 1990).

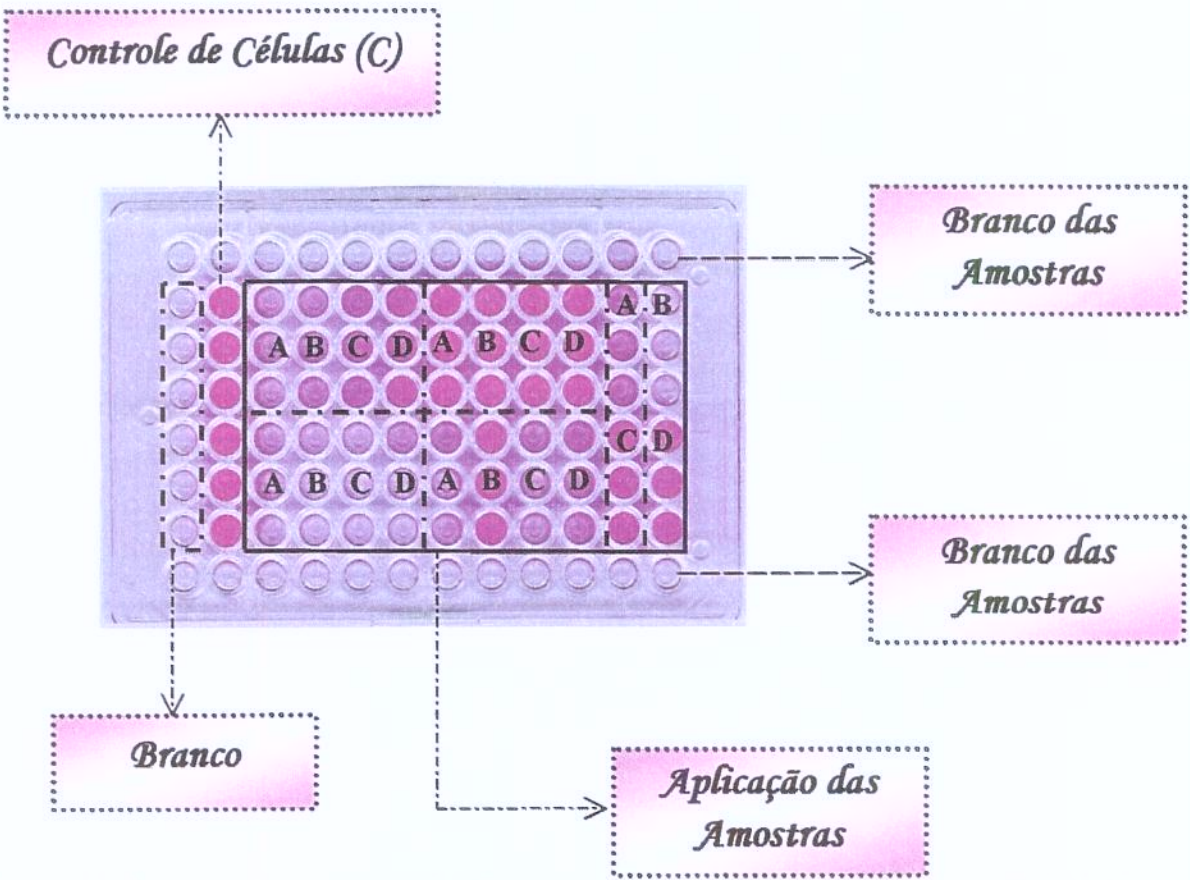


Figura 6- Esquema de uma placa de 96 compartimentos corada com SRB, onde A, B, C e D representam as amostras colocadas em triplicata nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250µg/ml, respectivamente.

5- Testes de atividade farmacológica em modelos experimentais utilizando animais de laboratório

5.1- Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos Wistar machos e camundongos Swiss machos, com peso corporal entre 200 e 250 g e 25 a 30 g, respectivamente. Estas espécies foram fornecidas 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.

5.2- Triagem de atividade geral do EBH 70% de *L.divaricata*

Os camundongos foram divididos em cinco grupos, onde o primeiro grupo experimental (controle negativo) foi tratado, via i.p., com solução salina (solução NaCl 0,9%, na dose de 10 mL/kg). Os quatros demais grupos foram tratados, via i.p., com o EBH 70% de *L. divaricata* nas doses de 100, 300, 1000 e 2000 mg/kg. No período de 5 horas subseqüentes aos tratamentos, foram observados os efeitos gerais mantendo-se os animais em deambulação livre sobre uma superfície plana (Malone, 1977). O período de observação estendeu-se por 15 dias, sendo os animais pesados e avaliados uma vez ao dia.

5.3- Úlcera Induzida por Indometacina

Foram utilizados ratos Wistar machos, divididos em três grupos. 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) na dose de 10,0 ml/kg como controle negativo, outro grupo recebeu solução aquosa de cimetidina na dose de 100,0 mg/kg como controle positivo e o último grupo recebeu EBH 70% na dose de 1000 mg/Kg dissolvido em solução NaCl a 0,9% (solução salina).

Após 30 minutos dos tratamentos, cada animal recebeu uma injeção subcutânea de solução aquosa de indometacina, na dose de 30,0 mg/kg, segundo metodologia descrita por Morimoto et al. (1991).

Após 4 horas da administração da indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução de NaCl a 0,9% para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) foi calculado por meio da somatória dos parâmetros apresentados abaixo, descrita por Gamberini et al. (1991). Com esses valores foram calculados os percentuais de inibição do ILU.

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

5.4- Úlcera Induzida por Etanol

Foram utilizados ratos Wistar machos em jejum de 24 horas de jejum com livre acesso à água. Os animais foram divididos em três grupos, os quais receberam por via oral o tratamento correspondente: o primeiro grupo recebeu solução de NaCl (0,9%) na dose de 10,0 ml/kg como controle negativo, o segundo grupo recebeu solução aquosa de

carbenoxolona na dose de 200,0 mg/kg como controle positivo e o terceiro grupo recebeu o EBH 70% na dose de 1000 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). Após 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução de NaCl (0,9%), para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

O mesmo protocolo de trabalho foi empregado para a FA na dose de 1000 mg/Kg e para a FO na dose de 1000 mg/Kg via oral.

Também se utilizou deste protocolo para a comparação entre a FA, FO, FHA e epigallocatequina galato na dose de 1000 mg/Kg.

5.5- Determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀)

Para a determinação da DE₅₀ do EBH 70% os animais foram tratados oralmente com doses crescentes (100mg/Kg, 300mg/Kg, 500mg/Kg e 1000mg/Kg) utilizando-se o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

Triagem do mecanismo de ação

5.6- Ligadura do Píloro

Foram utilizados ratos Wistar machos em jejum por um período de 24 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em três grupos, anestesiados por inalação de éter etílico para realização de tricotomia, incisão abdominal e a ligadura do píloro com linha cirúrgica de algodão. Logo após a ligadura, cada grupo de animais recebeu por via intraduodenal, o tratamento correspondente: o primeiro grupo recebeu solução de NaCl (0,9%) na dose de 2,5 ml/kg como controle negativo, o segundo grupo recebeu solução aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg, como controle positivo e o último

grupo recebeu o EBH 70%, na dose de 1000 mg/kg diluído em solução de NaCl (0,9%). O abdômen foi então suturado e, após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o abdômen foi aberto e o estômago retirado para determinação do volume do conteúdo estomacal, seu pH e a concentração de íons H^+ (mEq/L/4h), através de titulação com solução de NaOH 0,05N, utilizando-se solução (1%) de fenolftaleína como indicador. A concentração de Ácido Total em mEq/L/4h foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

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

Este experimento foi realizado segundo método desenvolvido por Shay et al. (1945).

5.7- Estudo da Participação das Substâncias Sulfidrílicas não Proteicas sobre a Citoproteção Gástrica

Foram utilizados ratos Wistar machos, em jejum por um período de 24 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em quatro grupos. Dois dos grupos receberam tratamento prévio via subcutânea de N-etilmaleimida na dose de 10,0 mg/Kg. Após 30 minutos da administração subcutânea, cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento: o primeiro grupo recebeu solução de NaCl (0,9%) na dose de 10,0 ml/kg como controle negativo (grupo que não recebeu N-etilmaleimida subcutânea), o segundo grupo recebeu solução de NaCl a 0,9% mais N-etilmaleimida na dose de 10,0 ml/kg, o terceiro grupo recebeu EBH 70% na dose de 1000 mg/Kg (controle positivo) o último grupo recebeu EBH 70% na dose de 1000 mg/kg mais N-etilmaleimida subcutâneo. O EBH 70% foi diluído em solução de NaCl a 0,9%. Após 30 minutos, cada animal recebeu por via oral, 1,0 ml de etanol absoluto.

Após 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução de NaCl (0,9%), para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

5.8- Estudo da Participação de Prostaglandinas na Citoproteção Gástrica

Após um período de 24 horas de jejum com livre acesso à água, os ratos machos foram divididos em 4 grupos. Dois dos grupos receberam tratamento prévio por via intraperitoneal de indometacina na dose de 5,0 mg/Kg. Após 30 minutos cada grupo recebeu por via oral, o respectivo tratamento: o primeiro grupo recebeu solução de NaCl (0,9%) na dose de 10,0 ml/kg (controle negativo), o segundo grupo recebeu salina (0,9%) mais tratamento prévio com indometacina, o terceiro grupo recebeu o EBH 70% na dose de 1000 mg/Kg (controle positivo) e o último recebeu EBH 70% mais indometacina.

Após 30 minutos, cada animal recebeu por via oral, 1,0 ml de etanol absoluto.

Após 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução de NaCl (0,9%), para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

5.9- Determinação Quantitativa de Muco Gastroprotetor

Após um período de 24 horas de jejum com livre acesso à água, os ratos foram divididos em três grupos, os quais receberam por via oral o tratamento correspondente: o primeiro grupo recebeu solução de NaCl (0,9%) na dose de 10,0 ml/kg como controle negativo, o segundo grupo recebeu solução aquosa de carbenoxolona na dose de 200 mg/kg como controle positivo e o último grupo recebeu EBH 70% na dose de 1000 mg/Kg.

Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo os estômagos retirados e abertos ao longo da maior curvatura, e tendo a região fúndica retirada e descartada.

O corpo glandular do estômago foi pesado e mergulhado em 10,0 ml de solução de Alcian Blue 0,1% por 2 horas. Após este período, os estômagos foram submetidos à lavagem com solução tamponada de sacarose 0,25M por duas vezes, sendo a primeira por

15 minutos e a segunda por 45 minutos. Em seguida, os estômagos foram transferidos para 10,0 ml de solução de $MgCl_2$ 0,5 M por 2 horas para a extração do corante complexado com o muco gástrico.

A solução obtida foi extraída com 10,0 ml de éter etílico. Ocorreu formação de emulsão que foi então centrifugada por 15 minutos a 3600 rpm, sendo a fase etérea desprezada e a fase aquosa submetida à leitura espectrofotométrica em 598 nm, conforme método descrito por Corne et al., (1974).

6- Análise Estatística

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

RESULTADOS

1- Triagem fitoquímica do EBH 70% de *L. divarivata*

Os compostos foram identificados pela triagem colorimétrica fitoquímica segundo método descrito por Aloísio Fernandes (1945). A triagem fitoquímica forneceu indicativos para as seguintes classes de compostos:

✓ Teste para Antocianinas: Positivo

A coloração avermelhada da amostra foi modificada para verde-castanho ou azul após alcalinização.

✓ Teste para Antracenosídeos: Positivo

Houve aparecimento de coloração vermelha.

✓ Teste para Cumarinas: Negativo

Não houve fluorescência à luz UV, em 366nm.

✓ Teste para Esteróides Triterpenos: Positivo

A reação de Libermann-Buchard da amostra apresentou anel verde com interface marrom, indicativo da presença de esteróides e triterpenos.

✓ Teste para Flavonóides: Positivo

Houve alteração na coloração da amostra, após a adição de limalhas de ferro e HCL 10%.

✓ Teste para Taninos: Positivo

Houve mudança de coloração para esverdeada, após adição de gotas de solução de cloreto férrico.

2- Análise por CCD do EBH 70%, FA, FO, FH e Epigallocatequina Gallato

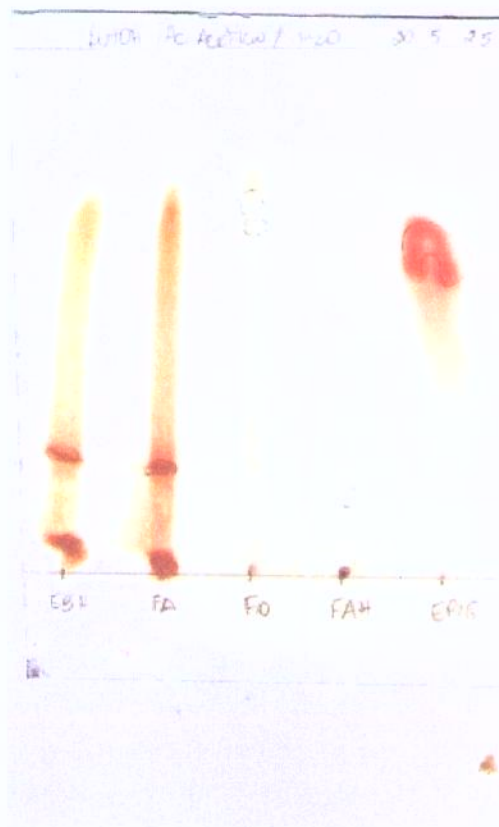


Figura 7- Cromatografia de camada delgada dos EBH 70%, FA, FO, FAH e Epigallocatequina Gallato, utilizando como fase móvel mistura de ácido acético (5): butanol (20): água (25) e como revelador o anisaldeído. Pode-se observar a presença de alguma substância no mesmo Rf.



Figura 8- Cromatografia de camada delgada dos EBH 70%, FA, FO, FAH e epigallocatequina gallato, utilizando como eluente uma mistura de ácido acético (5): butanol (20): água (25) e como revelador o iodo. Pode-se observar a presença de alguma substância no mesmo Rf.

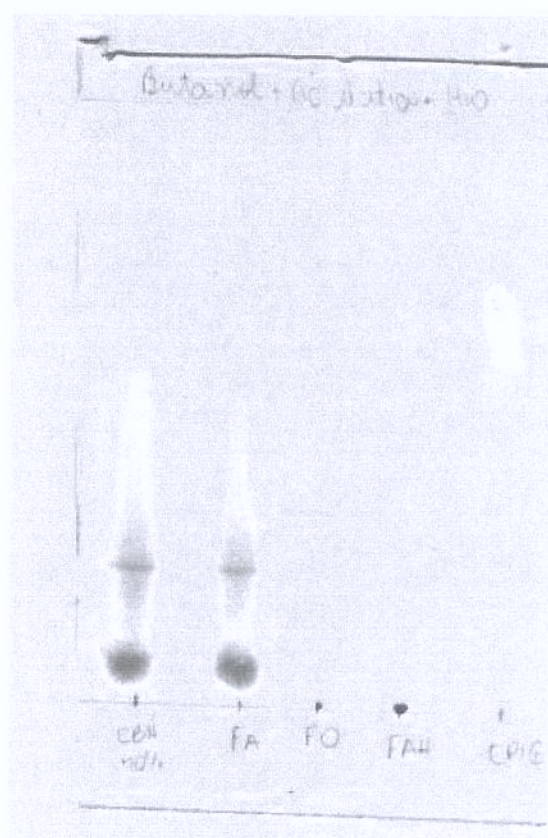


Figura 9- Cromatografia de camada delgada dos extratos EBH 70%, FA, FO, FAH e Epigallocatequina Gallato, utilizando como eluente uma mistura de ácido acético (5): butanol (20): água (25) e como revelador H_2SO_4 / Metanol (1:1).



Figura 10- Cromatografia de camada delgada dos extratos EBH 70% e epigallocatequina gallato, utilizando como eluente uma mistura de ácido acético (5): butanol (20): água (25) e como revelador anisaldeído.

3- Teste de Atividade Antiproliferativa do EBH 70%

Os gráficos resultantes dos ensaios da atividade anticâncer devem ser interpretados considerando as curvas de resposta obtidas a partir da relação da concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$) e a porcentagem de inibição das células tumorais humanas “*in vitro*”. Inibições ocorridas abaixo de 50% serão consideradas como citostáticas, ou seja, inibem o crescimento celular, e abaixo de 0% como citocida. A doxorubicina (Figura 11) foi utilizada como controle positivo e, portanto, controle de qualidade do teste. Na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ apresentou atividade citostática para as linhagens renal, pulmonar, prostática, melanoma, mamária e para leucemia. Em 25 $\mu\text{g/mL}$ foi citostática para rim, próstata e mama resistente e citocida para as demais. Na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$) foi citocida para todas as linhagens.

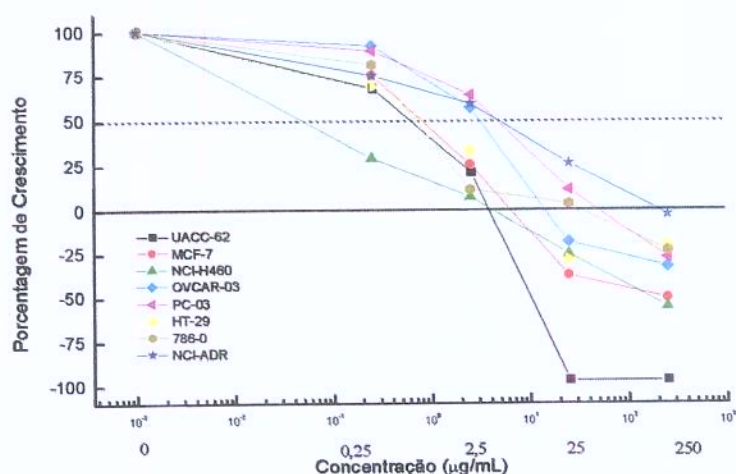


Figura 11- Curva concentração-resposta da doxorubicina sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento e concentração da amostra.

O EBH 70% de *L. divaricata* apresentou atividade citostática (inibição de crescimento) na concentração de 25 µL/ml para adenocarcinoma ovariano (OVCAR-04), adenocarcinoma colorretal (HT-29), carcinoma mamário (MCF-7), carcinoma mamário resistente (NCI-ADR), adenocarcinoma de próstata (PC-03). Na concentração de 250µL/ml foi citocida para todas as linhagens (Figura 12).

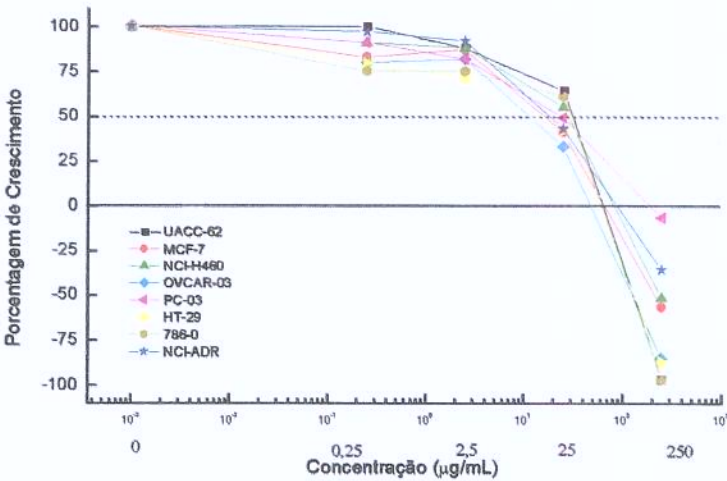


Figura 12- Gráfico da avaliação da atividade antiproliferativa do EBH 70%.

A IC₅₀ , representa a menor concentração necessária para inibir 50% do crescimento das células tumorais. Na Tabela 2 estão expressos os valores de IC₅₀ do EBH 70% e da doxorubicina (Dox).

Tabela 2- Concentração necessária de EBH 70% para inibir de 50% do crescimento das células tumorais.

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)							
	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	PC-03	OVCAR-03	HT-29
EBH	293,4	74,6	46,21	Nc*	125,1	45,16	86,64	158,4
Dox	4,43	3	15,49	0,64	12,47	13,12	4,86	2,84

*Nc: não calculado.

4- Triagem da atividade geral do EBH 70% de *L. divaricata*

O EBH 70% de *L. divaricata*, nas doses de 100, 300, 1000 e 2000 mg/kg, ip, não produziu sinais agudos de toxicidade quando comparado aos animais controle. Estes animais foram então observados durante quinze dias, mantidos em ambiente controlado (com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 20°C, com água mineral e ração *ad libitum*); não sendo observado nenhum óbito.

5- Úlcera induzida por Indometacina

No modelo de úlcera induzida por indometacina, o EBH 70% administrado oralmente, na dose de 1000mg/Kg, reduziu o índice de lesões ulcerativas (ILU) em 62%, enquanto que a cimetidina, administrada pela mesma via na dose de 100mg/Kg, foi capaz de reduzir o ILU em 80%. Os resultados, expressos como média do ILU ± desvio padrão estão demonstrados na Figura 13 e na Tabela 3.

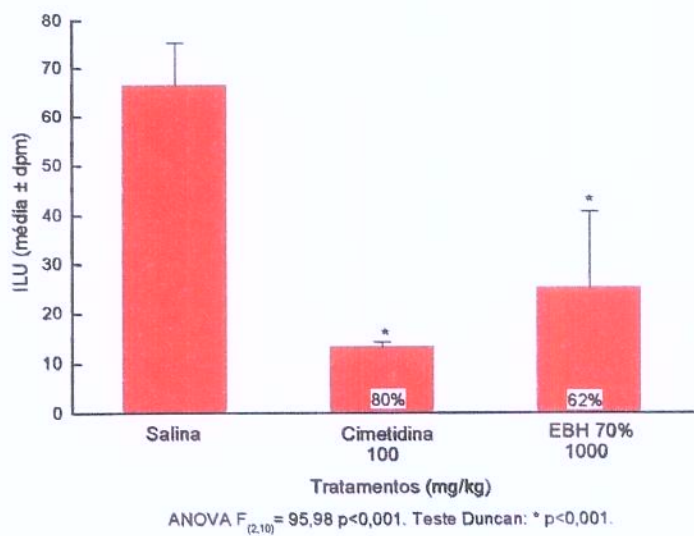


Figura 13- Efeito da administração oral do EBH 70%, e cimetidina em modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA $F_{(2,10)} = 95,58$ $p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,01$).

Tabela 3- Efeito da administração oral do EBH 70% e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU (média±dpm)	Inibição do ILU %
Salina	-----	81,0± 20,7	-----
Cimetidina	100	12,8± 4,2	80,2
EBH 70%	1000	9,4± 3,8	62,4

Anova F (2,10) = 95,98 p<0,001. Teste de Duncan: * p<0,001

6- Úlcera Induzida por Etanol

No modelo de úlcera induzido por etanol, o EBH 70% administrado oralmente, na dose de 1000mg/Kg, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição do ILU de 95%, mesmo índice observado para a carbenoxolona (vo, 200mg/Kg). Os resultados expressos como média do ILU ± desvio padrão estão demonstrados na Figura 14 e na Tabela 4.

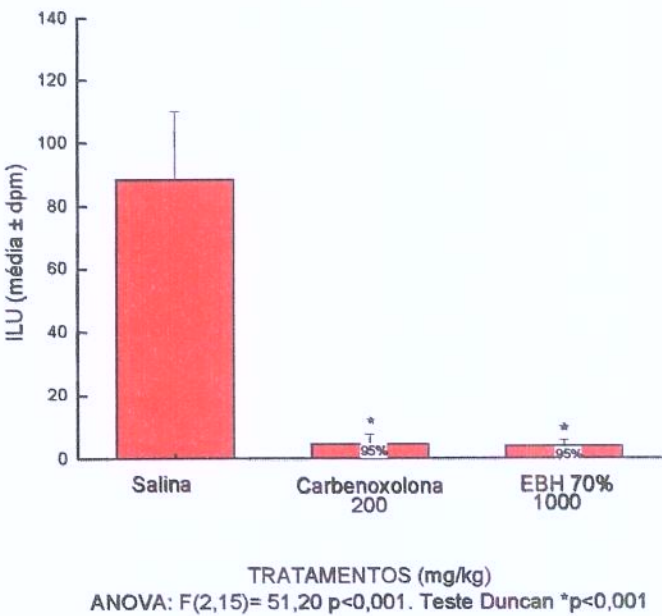


Figura 14- Efeito da administração oral do EBH 70% e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA F (2,15) = 51,20 P<0,001. Teste de Duncan *p<0,001).

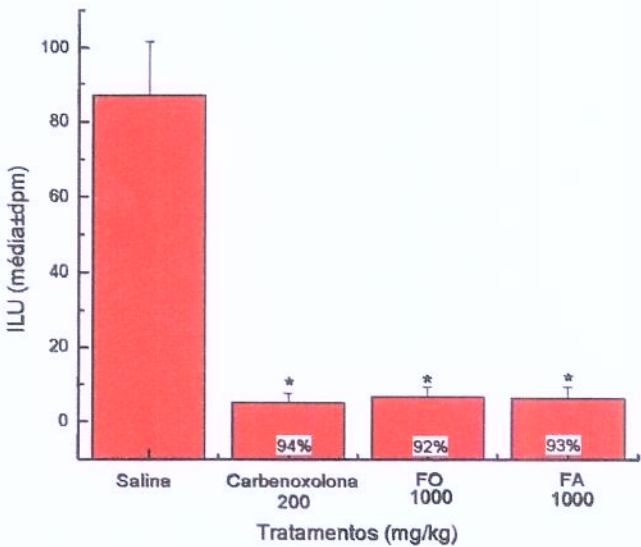
Tabela 4- Efeito da administração oral do EBH 70% e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU (média±dpm)	Inibição do ILU %
Salina	-----	88 ± 22	-----
Carbenoxolona	200	4,6 ± 3,2	95
EBH 70%	1000	4 ± 1,67	95

Anova F_(2,10) = 51,20 p<0,001. Teste de Duncan: * p<0,001

7- Úlcera Induzida por Etanol – Frações Aquosa (FA) e Orgânica (FO)

Neste modelo experimental, a FA e FO de *L.divaricata* na dose de 1000mg/Kg, reduziram o ILU em 93% e 92% respectivamente. A carbenoxolona, utilizada como controle positivo na concentração de 200mg/Kg promoveu uma redução do ILU em 94%. Os resultados são expressos como média do ILU ± desvio padrão estão demonstrados na Figura 15 e na Tabela 5.



ANOVA:F(3,16)=135,81 p<0,001. Teste Duncan *p<0,001.

Figura 15- Efeito da administração oral da FA e da FO de *L.divaricata* e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA: F_(3,16) = 135,81 p<0,001. Teste de Duncan *p<0,001).

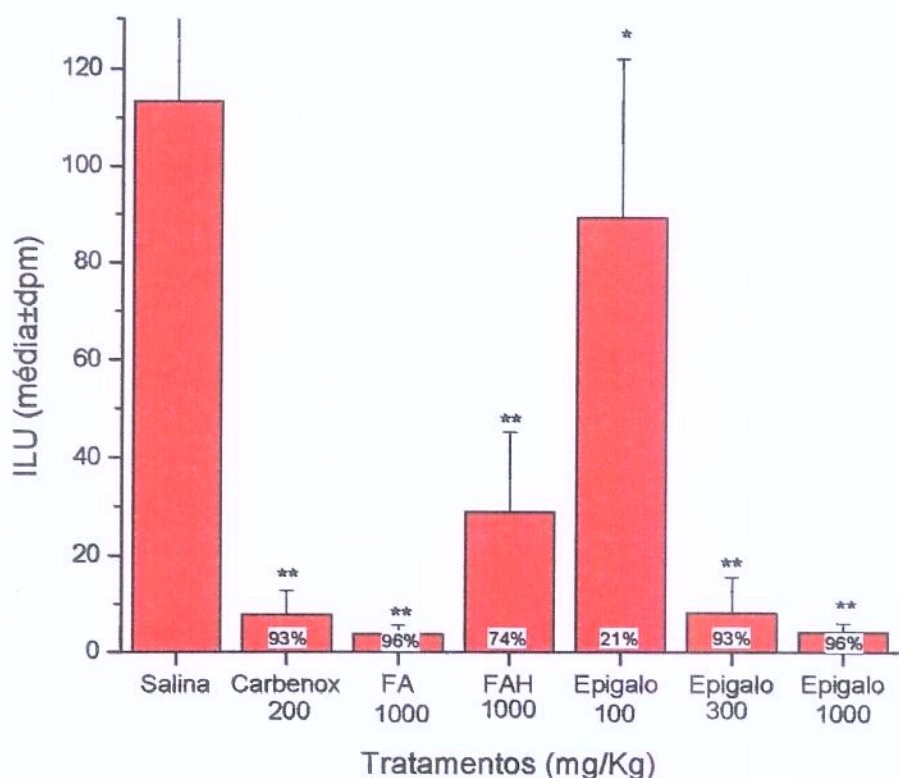
Tabela 5- Efeito da administração oral da FA e FO de *L. divaricata* a da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU (média±dpm)	Inibição do ILU %
Salina	-----	87 ± 15	-----
Carbenoxolona	200	5 ± 2,4	94
Fr. Acetato de etila	1000	6,6 ± 2,6	92
Fr. Aquosa	1000	6,2± 3,0	93

Anova F _(3,16) = 135,81 p<0,001. Teste de Duncan: *p<0,001.

8- Úlcera induzida por etanol- FA, FHA e Epigallocatequina Gallato

Neste modelo experimental, a FA, FHA foram administradas na dose de 1000mg/Kg respectivamente e Epigallocatequina Gallato nas doses de 100mg/Kg, 300mg/Kg e 1000mg/Kg, onde apresentaram atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição do ILU de 96%, 74%, 21%, 93% e 96% respectivamente. A carbenoxolona, utilizada como controle positivo na dose de 200mg/Kg promoveu uma redução do ILU em 93%. Os resultados expressos como média ILU ± desvio padrão estão demonstrados na Figura 16 e na Tabela 6.



ANOVA: $F(6,28)=37,3$ $p<0,001$. Teste Duncan * $p<0,05$ ** $p<0,001$.

Figura 16- Efeito da administração oral da FA, FAH, epigalocatequina e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA $F(6,28)=37,3$ $p<0,001$. Teste de Duncan * $p<0,05$ ** $p<0,001$).

Tabela 6- Efeito da administração oral da FA, FAH, epigalocatequina e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamentos	Dose mg/Kg	ILU (média±dpm)	Inibição do ILU %
Salina	-----	113,4±23,2	-----
Carbenoxolona	200	7,8±5,0	93
FA	1000	3,8±1,8	96
FAH	1000	29,0±16,1	74
Epigalocatequina	100	89,4±32,7	21
Epigalocatequina	300	8,2±7,4	93
Epigalocatequina	1000	4,2±1,8	96

ANOVA $F(6,28)=37,3$ $p<0,001$. Teste de Duncan * $p<0,05$ ** $p<0,001$.

9- Determinação da dose Efetiva 50% (DE₅₀)

O efeito antiulcerogênico apresentado pelo EBH 70% no modelo de úlcera induzida por etanol, quando administrado oralmente nas doses 100, 300, 500 e 1000mg/Kg, apresentou uma dose mais efetiva na dose de 1000mg/kg. (Figura 17) (Tabela 7).

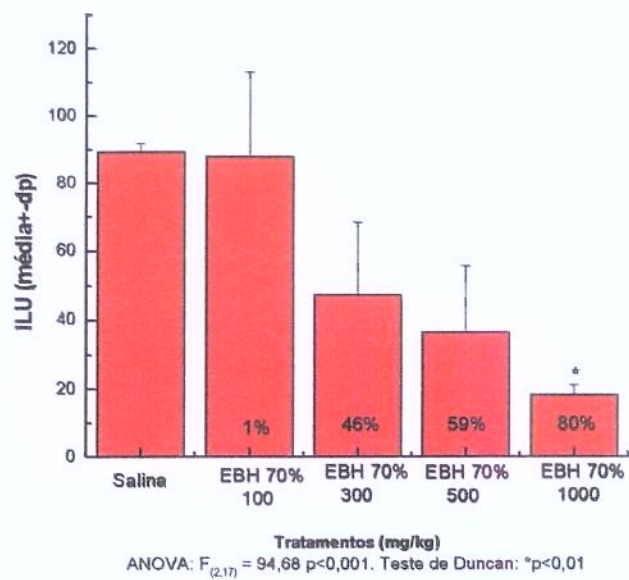


Figura 17- Efeito do EBH 70% das cascas secas e moídas de *Luehea divaricata* nas doses de 100, 300, 500 e 1000mg/Kg em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tabela 7- EBH 70% e DE₅₀ na úlcera induzida por etanol.

Tratamentos	Dose mg/Kg	ILU (média±dpm)	Inibição do ILU %
Salina	*****	89	*****
EBH 70%	100	88	1
EBH 70%	300	47,4	46
EBH 70%	500	36,4	59
EBH 70%	1000	18,4	80

ANOVA: F_(4,25) = 94,68 p< 0,001. Teste de Duncan: *p<0,01.

10- Ligadura do Píloro

No modelo de ligadura do píloro, o EBH 70% administrado por via intraduodenal, na dose de 1000mg/Kg, reduziu o volume da secreção gástrica em 43%. A cimetidina (100mg/Kg) utilizada como controle positivo reduziu a concentração de íons H⁺ em 56%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H⁺ estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Efeito da administração intraduodenal do EBH 70% em modelo de ligadura do píloro em ratos.

Tratamento	Dose	pH	Volume	H ⁺
	(mg/Kg)		(mL)	(mEq/L)
Salina	-----	1,80± 0,83	2,84± 0,61	1,78± 0,41
Cimetidina	100	3,75± 1,70*	2,68± 1,00	0,78± 0,15*
EBH 70%	1000	2,50± 0,58	1,62± 0,99	1,58± 0,82

ANOVA: pH: F_(2,10) = 3,39 p<0,05; Volume: F_(2,10) = 2,45 p>0,05; H⁺: F_(2,10) =4,25 p<0,05. Teste de Duncan *p< 0,05.

11- Estudo da Participação das Substâncias Sulfidrílicas não Proteicas na Citoproteção Gástrica

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de NEM a porcentagem de inibição do ILU do EBH 70% (1000 mg/kg, vo) foi de 60%, enquanto o grupo sem o tratamento prévio a redução foi de 93% (Figura 18 e Tabela 9).

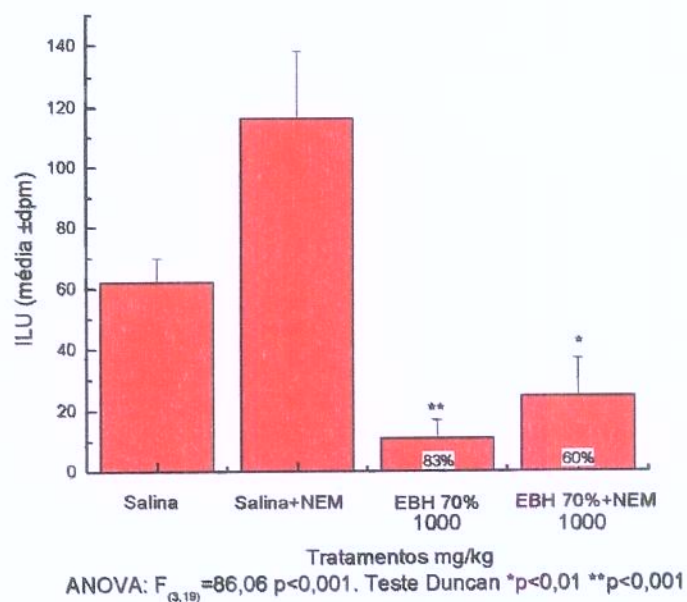


Figura 18- Participação das substâncias sulfidrílicas na citoproteção gástrica em úlcera induzida por etanol (ANOVA: $F_{(2,19)} = p < 0,001$. Teste de Duncan * $p < 0,001$).

Tabela 9- Quantificação da participação das substâncias sulfidrílicas na citoproteção gástrica

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU (média±dpm)	Inibição do ILU %
Salina	-----	68 ± 7,9	-----
Salina + NEM	-----	116,4 ± 21,62	-----
EBH 70%	1000	11 ± 62,4	83,0%
EBH 70% + NEM	1000	24,5± 12,34	59%

Anova $F_{(2,19)} = 86,06$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$.

12- Estudo da Participação de Prostaglandinas na Citoproteção Gástrica

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de indometacina (5mg/Kg, ip), o EBH 70% (1000mg/Kg v.o) apresentou uma porcentagem de inibição do ILU de 91% enquanto o EBH 70% + indometacina apresentou uma porcentagem de inibição do ILU de 88%, mantendo sua atividade antiulcerogênica. Os resultados expressos como média ± desvio padrão da média do ILU estão apresentadas na figura 19 e na tabela 10.

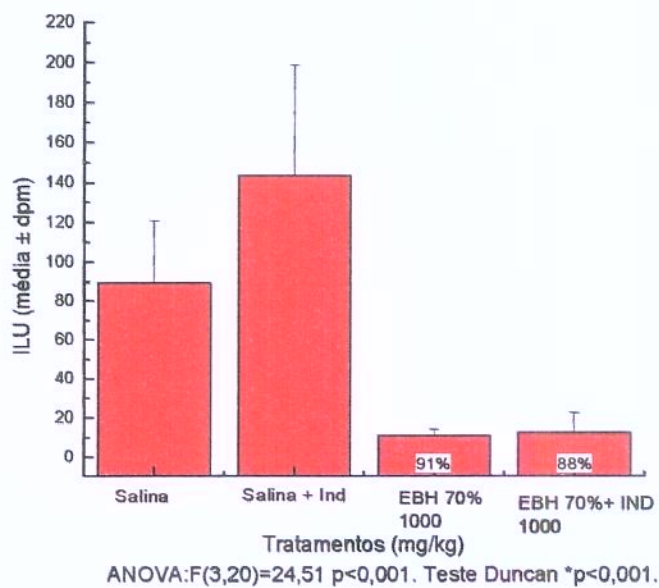


Figura 19- Modelo experimental para avaliação da participação das prostaglandinas na citoproteção gástrica em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA: $F_{(3,20)} = 24,51$ $p<0,001$. Teste de Duncan * $p<0,001$).

Tabela 10- Avaliação da participação das prostaglandinas na citoproteção gástrica.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU (média±dpm)	Inibição do ILU %
Salina	-----	89,5±31,0	-----
Sal.+indo	-----	143,5±55,3	-----
EBH 70%	1000	11,0±3,10	91
EBH70%+ Indom .	1000	12,66±9,83	88

Anova: $F_{(3,20)} = 24,51$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $*p < 0,001$.

13- Estudo Quantitativo da Participação do Muco Gastroprotetor

Em modelo para quantificação do muco aderido a parede gástrica, o EBH 70% (1000mg/Kg) teve sua quantidade de muco medida em 18%, comparada com a carbenoxolona (200mg/Kg) que teve sua quantidade de muco medida em 32%. Mostrando que este não teve seu muco aumentado. Os resultados estão expressos no gráfico 20 e na tabela 11.

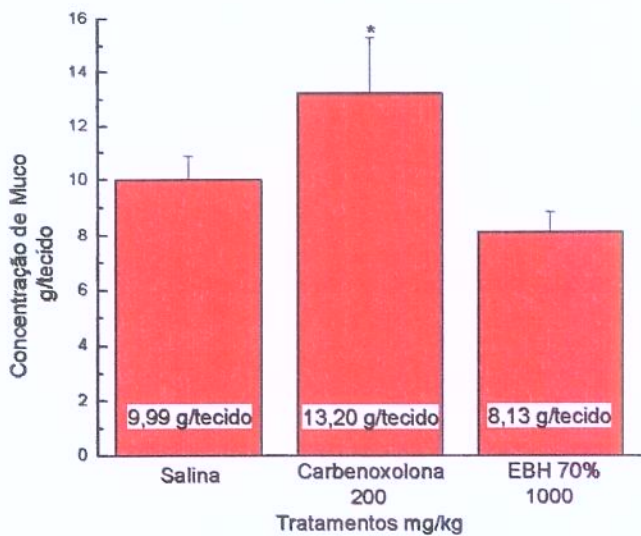


Figura 20- Dosagem de muco aderido à parede gástrica em animais tratados com o EBH 70% e carbenoxolona. Anova: $F_{(18,11)}=32,95$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $* p < 0,001$.

Tabela 11- Dosagem do muco aderido à parede gástrica em animais tratados com EBH 70% e carbenoxolona.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Concentração	muco g/tecido	% de aumento de muco
Salina	-----		9,99±0,87	-----
Carbenox.	200		13,2±2,04	32
EBH 70%	1000		8,13±0,72	18

Anova: $F_{(18,11)}=32,95$ $p<0,001$. Teste de Duncan: * $p<0,001$.

DISCUSSÃO

A ocorrência de gastrite e úlcera péptica é muito freqüente na população humana e apesar dos avanços na terapêutica atualmente sua incidência está entre 3-10% da população. Embora a etiologia exata desta doença não seja totalmente conhecida, um desequilíbrio entre os fatores defensores e agressores incluindo a presença de *Helicobacter pylori* resultam na úlcera péptica (Bose, et al., 2003).

Alterações em mecanismos intrínsecos da secreção ácida foram encontradas em pacientes com úlcera duodenal, entre eles a hipersecreção, o aumento do número de células parietais com secreção aumentada, aumento da atividade vagal e da liberação pós-prandial de gastrina (Hojgaard, et al., 1996). Dessa forma por um longo período acreditou-se que a hipersecreção de ácido era o principal fator etiológico da úlcera duodenal associado a fatores extrínsecos, como estresse, alimentos, condimentos, fumo, álcool e antiinflamatórios não-esteroidais. Recentemente a participação da *H. pylori* nessa afecção foi bem determinada (Rao, et al., 2003).

O EBH 70% de *Luehea divaricata* apresenta coloração avermelhada, podendo produzir resultados falso-positivos em testes fitoquímicos, já que muitas substâncias são identificadas pela mudança na coloração durante as reações, porém são válidos para obtenção de dados preliminares. Nessas condições os principais grupos detectados através da triagem fitoquímica, foram flavonóides, taninos, antocianinas e esteróides e/ou triterpenos.

Os compostos fenólicos apresentam ação antioxidante, anticancerígena, antiinflamatória, e contribuem na manutenção da permeabilidade vascular. Dentre estes foram identificados os flavonóides, antocianinas e os taninos (Midleton et al, 2000).

Alguns estudos revelam que as plantas ricas em antocianinas, quando consumidas diariamente são capazes de retardar a degeneração neurológica e melhorar a visão global em pacientes com retinopatias (Gaujelac et al., 1999, Youdium et al., 2000).

Os flavonóides são substâncias amplamente distribuídas na natureza contribuindo para a coloração das flores, frutos e folhas. Existem muitos trabalhos que descrevem os efeitos farmacológicos dos flavonóides, entre eles: atividade antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana e anticancerígena (Middlenton et al., 2000.).

Os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis, responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais, pois formam complexos insolúveis com alcalóides, gelatinas e outras proteínas. Esta complexação também é responsável pelo controle de crescimento de insetos, fungos e bactérias, bem como para seus usos na indústria. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragia, queimaduras, problemas estomacais, urinários e outros processos inflamatórios (Gaulejac et al., 1999, Simões et al., 1999).

Corroborando com os estudos de Tanaka et al (2005), foi observada a presença da classe química dos terpenos e saponinas nessa espécie vegetal. Outros trabalhos têm demonstrado atividade hipocolesterolemiantes, antiinflamatória e antiviral das saponinas isoladas de *Glycyrrhiza glabra* e da *Calendula arvensis* Ferreira et al. (1997).

Neste trabalho, inicialmente foi realizada uma triagem da atividade geral do EBH 70% de *L. divaricata* para uma avaliação das ações sobre o estado de consciência e disposição, capacidade exploratória, coordenação motora, tônus muscular, reflexos e demais ações sobre o sistema nervoso central (SNC) e autônomo. Os resultados preliminares, sobre os possíveis efeitos do extrato no organismo, permitem um direcionamento das investigações científicas posteriores (Malone, 1977). O EBH 70% não produziu morte e nem efeitos observáveis nos animais tratados, durante os quinze dias de observação.

O EBH 70% de *L. divaricata* quando avaliado em cultura de células tumorais humanas apresentou atividade citostática (inibição de crescimento) na concentração de 25 µL/ml para adenocarcinoma ovariano (OVCAR-04), adenocarcinoma colorretal (HT-29), carcinoma mamário (MCF-7), carcinoma mamário resistente (NCI-ADR), adenocarcinoma de próstata (PC-03). Na concentração de 250 µL/ml foi citocida para todas as linhagens. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo neste experimento. A IC_{50%} mostrou que o EBH 70% precisa de concentrações elevadas para promover a inibição do crescimento das células tumorais. Dessa forma somente o trabalho de isolamento e purificação dos princípios ativos poderá aumentar a atividade específica, necessitando de quantidades elevadas de material vegetal.

Devido ao uso popular como cicatrizante esse trabalho avaliou a atividade do extrato bruto em modelos experimentais de úlcera gástrica induzidos por indometacina e etanol. Apesar de atuar nos dois modelos o extrato bruto hidroalcoólico (EBH 70%) de *L. divaricata* foi mais eficaz no modelo de úlcera por etanol.

As drogas antiulcerogênicas basicamente atuam por estímulo dos fatores citoprotetores ou por diminuição da secreção ácida estomacal (Bighetti et al, 2002). No estômago, as prostaglandinas têm papel vital nessa citoproteção, pois estimulam a secreção de bicarbonato e muco, mantêm o fluxo sanguíneo da mucosa e regulam a renovação e o reparo celular. A supressão da síntese de prostaglandinas por antiinflamatórios não-esteroidais, como a indometacina, leva a uma redução na produção de muco citoprotetor facilitando o contato do ácido com a mucosa e conseqüentemente desenvolvendo o processo ulcerogênico (Batista et al., 2003).

Na dose de 1000mg/Kg, o EBH 70% reduziu o ILU em 95% enquanto a carbenoxolona (controle positivo) inibiu o ILU em 95%, sugerindo que o EBH 70% atua por estimular os fatores citoprotetores da mucosa gástrica. O etanol é considerado um agente irritante da mucosa gástrica que promove a depleção de radicais sulfidrílicos não proteicos (glutathione), encontrados em grande quantidade no estômago com destacado papel na citoproteção neutralizando os radicais livres (Oliveira et al., 2004).

Esses resultados estimularam o prosseguimento do trabalho direcionado para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis por essa atividade e para a identificação dos grupos químicos envolvidos. Para isso a atividade do extrato foi avaliada sobre a secreção ácida, síntese de prostaglandinas, radicais sulfidrílicos não proteicos e síntese de muco gastroprotetor.

Para averiguar a participação sobre a secreção ácida gástrica, o EBH 70% foi testado em modelo de ligadura de piloro, que possibilitou a avaliação de parâmetros como volume e concentração de íons H^+ do conteúdo gástrico. Após o tratamento com o EBH 70% (1000 mg/kg) o volume do conteúdo gástrico e a concentração de íons H^+ não foram reduzidos significativamente. A cimetidina, controle positivo reduziu a concentração de íons H^+ em 56%. Esse resultado sugere que o EBH 70% de *L. divaricata* não possui uma ação anti-secretora significativa.

No modelo experimental para avaliar a participação das prostaglandinas, que aumentam a proteção da mucosa gástrica através da estimulação da produção de muco protetor, foi utilizado o tratamento prévio com um antiinflamatório não esteroide a indometacina (10mg/kg) administrada subcutaneamente para inibir somente a síntese de prostaglandinas sem provocar ulceração da mucosa gástrica, mas potencializando a ação do etanol (Konturek, et al., 1995). O EBH 70% administrado após o tratamento com a indometacina não teve sua atividade antiulcerogênica modificada excluindo, dessa maneira, a participação da síntese de prostaglandinas no efeito observado.

O epitélio gástrico é recoberto por uma camada contínua de muco que em associação com o bicarbonato secretado pelo epitélio constitui uma barreira que impede o contato do ácido clorídrico com a mucosa gástrica. Drogas que aumentam a produção de muco, como a carbenoxolona, oferecem um aumento da proteção gástrica (Batista et al., 2003). A possível participação do extrato bruto de *L. divaricata* foi avaliada em modelo de indução de úlcera por etanol que após a retirada e lavagem dos estômagos foi realizado o doseamento do conteúdo de muco através do uso do corante Alcian Blue (Corne, et al 1974). Os resultados demonstraram que o EBH 70% não aumenta a produção de muco citoprotetor gástrico, excluindo também esse mecanismo de ação.

A participação de substâncias sulfidrílicas não-proteicas (glutathione reduzida) na citoproteção gástrica, está relacionada com a atividade antioxidante que impede a ação de radicais livres tóxicos sob a mucosa e diminui a permeabilidade vascular (Szabo, 1981). Neste modelo experimental, os animais foram previamente tratados com um agente alquilante das substâncias sulfidrílicas não proteicas, a N-etilmaleimida (NEM), ocasionando inativação das mesmas e conseqüentes perdas da capacidade antioxidante (Takeuchi et al, 1989). O EBH 70% de *L. divaricata* administrado nesses animais previamente tratados com NEM, teve seu índice de inibição do ILU diminuído em comparação com o EBH 70% administrado sem esse tratamento prévio (59% e 83% respectivamente), indicando que o mecanismo de citoproteção da mucosa gástrica desse extrato pode estar pelo menos parcialmente relacionado com a participação das substâncias sulfidrílicas.

O processo de purificação do EBH 70% foi iniciado com uma partição acetato de etila/ água, obtendo-se Frações Orgânica (FO) e Aquosa (FA) na tentativa de separar os compostos menos polares dos hidrofílicos para avaliação nos modelos experimentais de indução de úlcera gástrica.

No modelo de úlcera induzido por etanol, utilizado para avaliação dessas frações, FO e FA, reduziram o ILU de 92% e 93% respectivamente, comparadas com a carbenoxolona (controle positivo) que apresentou inibição do ILU em 94%. Esses resultados sugerem a participação de princípios ativos diferentes na atividade antiulcerogênica observada. O resultado parcial observado com o bloqueio dos grupamentos sulfidríla reforça essa hipótese, com substâncias diferentes agindo sinergicamente por mecanismos diversos.

A presença de compostos fenólicos nessa espécie e a atividade observada com a FA o trabalho foi direcionado para esses compostos. Como uma das possibilidades seria a presença de compostos fenólicos glicosilados a FA foi hidrolisada dando origem a uma fração rica em agliconas (FAH). A atividade antiulcerogênica de FAH, EBH 70%, e FA foram comparadas à atividade da epigallocatequina galato (DSM), obtida do chá verde (*Camellia sinensis*).

Nos países da Ásia, o chá verde é conhecido pelos seus benefícios à saúde e é tradicionalmente utilizado para desintoxicação, melhora do fluxo sanguíneo e aumento da resistência às infecções. Mais recentemente, estudos científicos demonstraram que a fração de catequina do chá verde é importante na prevenção de diversas doenças incluindo doenças cardiovasculares, câncer desordens gastrintestinais doenças periodontais e cáries (Nakachi K et al., 2000).

A epigallocatequina galato, isolada do chá verde, foi utilizada a fim de comparar sua atividade gastroprotetora com o EBH 70% devido à presença da epicatequina entre os princípios ativos do extrato bruto das cascas de *L. divaricata* (Tanaka, et al, 2005).

Para isso foi feita uma comparação entre as Frações aquosa (FA), Aquosa Hidrolisada (FAH) e epigallocatequina galato no modelo de úlcera induzida por etanol. (Figuras 21, 22 e 23). Nesse experimento FA, FAH e epigallocatequina galato reduziram o ILU em 96% e 74% e 93% de inibição do ILU respectivamente. Estes resultados sugerem

que a FA quando sofreu hidrólise (FAH), teve sua atividade antiulcerogênica diminuída devido à liberação da aglicona presente em sua estrutura que tem como uma de suas características promover a citoproteção gástrica. Já comparando a FA com a epigallocatequina galato, o resultado encontrado foi muito semelhante quando foram observadas as alterações produzidas por esses dois produtos na mucosa gástrica. Os estômagos dos animais tratados com esses dois compostos apresentaram uma camada aderida à sua parede provavelmente resultado de precipitação de proteínas. A precipitação de proteínas é um dos efeitos característicos das catequinas e derivados. Dessa forma parte dos efeitos antiulcerogênicos podem ser consequência da precipitação de proteína formando uma camada que, além de proteger facilita o processo de cicatrização.



Figura 21- Tratamento com FA

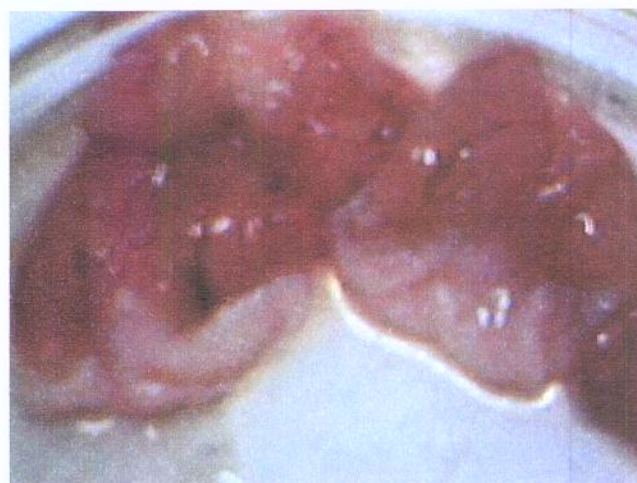


Figura 22- Tratamento com FAH



Figura 23- Tratamento com epigallocatequina galato

As placas de cromatografia em camada delgada (CCD) mostraram que o EBH 70% e as frações FA, FO, FAH comparadas juntamente com a epigallocatequina galato, apresentam compostos bastante polares, com grande afinidade pela fase estacionária de sílica. Os reveladores usados são considerados universais, sendo o iodo um indicador da presença de dupla ligação nos compostos. Apesar de se observar uma semelhança entre os compostos na placa de CCD, ainda serão necessários outros testes para identificar e isolar os compostos responsáveis por essa ação antiulcerogênica.

O conjunto de resultados obtidos demonstra que a *L.divaricata* possui polifenóis com atividade antiulcerogênica relacionada à precipitação de proteínas e provavelmente ação antioxidante, característica desses compostos (Middlenton et al., 2000). Também possui substâncias que provavelmente aumentam a produção de glutathione.

Muitos produtos citotóxicos, geralmente com radicais livres, quando administrados em animais de experimentação são inativados pela conjugação com glutathione. Dessa forma doses elevadas dessas substâncias induzem a um aumento da produção de glutathione como resposta à esse estímulo agressivo. Muitos desses produtos, principalmente contendo terpenóides, têm demonstrado elevada atividade antiulcerogênica associada a uma ação citotóxica em cultura de células (Dias et al, 2000, Bighetti, 2004).

Nesse trabalho também foi observado um efeito antiulcerogênico relacionado ao aumento da produção de glutathione, presença de terpenóides no EBH 70% e atividade citotóxica em cultura de células tumorais humanas. Portanto, é muito provável que a atividade antiulcerogênica relacionada com glutathione esteja diretamente relacionada a um mecanismo de citoproteção, em virtude da citotoxicidade observada.

CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos nesta pesquisa revelou que:

- O extrato bruto hidroalcoólico da *L. divaricata* reduziu de forma dose-dependente as lesões gástricas produzidas em ratos por indometacina e etanol.
- Essa atividade antiulcerogênica aparentemente não é consequência de ação sobre a secreção ácida, produção de muco gastroprotetor e síntese de prostaglandinas.
- O aumento de síntese de radicais sulfidríla não protéicos deve estar parcialmente envolvido nesse mecanismo de ação. No entanto a atividade citotóxica observada em cultura de células pode indicar um aumento de produção de glutathione como resposta citoprotetora.
- Tanto a fração aquosa, rica em compostos hidrofílicos, como a orgânica, rica em lipofílicos, apresentaram atividade antiulcerogênica, evidenciando a presença de mais de um princípio antiulcerogênico.
- Parte dos princípios ativos da fração aquosa são compostos glicosilados, que perderam parte de sua atividade após hidrólise.
- A fração aquosa apresentou o mesmo padrão de atividade obtido com a epigallocatequina galato obtida do chá verde, que além de atividade antioxidante produzem extensa precipitação de proteínas na mucosa gástrica. Essa semelhança, aliada aos dados de cromatografia e à literatura sugere que substâncias pertencentes ao grupo das catequinas são responsáveis por parte do efeito antiulcerogênico observado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, G.R., Ayala, G., Zatare, G.F. *Helicobacter pylori* Recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Pública de México*/ vol. 43. No. Mayo-junio de 2001.

Al Mountaery, 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., Flemstrom, G., Garner, A., Kivilaakso, E. Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol. Rev.*, 73, 823-857, 1993.

Amagase, K., Okabe, S. On the Mechanism Underlying Histamine Induction of Gastric Mucosal Lesions in Rats with Partial Gastric Vascular Occlusion. *Journal of Pharmacological Sciences* 607-8414, 2003.

Angus, J.A., Black, J.M. The interaction of choline esters, vagal stimulation and H₂ receptor blockade on acid secretion in vivo. *Eur J Pharmacol* 80, 217-224, 1982.

Antonio, J.M., Gracioso, J.S., Toma, W., Lopez, L.C., Oliveira, F., Brito, A.R.M. Antiulcerogenic activity of ethanol extract of *Solanum variabile* (false jurebaba). *Journal of Ethnopharmacology* 93, 83-88, 2004.

Batista, L.M., Almeida, A.B.B., Magri, L.P., Toma, W., Calvo, T.R., Vilegas, W., Brito, A.R.M. Gastric Antiulcer Activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (3) 328-332 (2004).

Bighetti, A.E., Antonio, M., Possenti, A., Foglio, M.A., Siqueira, M.G., Carvalho, J.E. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. *Lecta*, v. 22, n.1/2, p. 53-58, jan/dez.2004.

Bighetti, A.E., Antonio, M., Carvalho, J.E. Regulação e modulação da secreção ácida gástrica. *Ver. Ciênc. Med.*, 2002.

Bighetti, A.E., Antonio, M.A., Kohon, L.K., Rehder, M.A., Foglio, M.A., Possenti, A., Vilela, L., Carvalho, J.E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania leavigata* Schultz Bip. *Phytomedicine* 12 (2005) 72-77.

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., Chivarini, M., Ballabeni, V., Barlocco, D., Vianello, P., Dal Piaz, V., Impicciatore, M., Study of antisecretory and antiulcer mechanism of a new indenopyridazinone derivate in rats, *Pharmacological Research*, 35 (5), 1997.
- Chan, E.C., Chang, C.C., Li, Y.S., Chang, C.A., Chiou, C.C., Wu, T.Z. Purification and Characterization of Neural Sphingomyelinase from *Helicobacter pylori*. *Biochemistry*, 39, 4838-4845; 2000.
- Chang, C.C., Chen, S.H., Lien, G.S., Lou, H.Y., Hsieh, C.R., Fang, C.L., Pan, S. Eradication of *Helicobacter pylori* significantly reduced gastric damage in nonsteroidal anti-inflammatory drug-treated Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol*. 2005; 11 (1): 104-108.
- Corne, S.J., Morrissey, S.M., Woods, R.J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J. Physiol. Lond.*, 242: 116-117P, 1974.
- Corrêa MP. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, 1926-1987. Rio de Janeiro: Imprensa nacional; 1984. p-266-7.
- Deshpande. S.S., Shad. G.B., Parmar. N.S. Antiulcer activity of *Tephrosia purpurea* in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 35, 168-172. 2003.
- Dias, P.C., Foglio, M.A., A, Possenti., Carvalho, J.E. Antiulcerogenic activity of crude extract of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 69. 57-62; 2000.
- Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., Fachim, D.C., Carvalho, J.E. *Phytotherapy Research* 15 670-675; 2001.
- Ekblad, E., Mei, Q., Sundler, F. Innervation of the Gastric Mucosal. *Microscopy Research and Technique* 48:241-257; 2000.
- Ferreira, F., Vásquez, A. Gunter, C., Moyna, P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguaiensis*. St. Hill, Saponins. *Phytotherapy. Res.* 11: 79-81. 1997.
- 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: Supl. II, 137-139, 1991.

Gaulajac, N.S.C., Giores, Y., Vivas, N. Free Radical Scavenging effects of anthocyanins in red wines. Food Research International. 32: 327-333, 1999.

Glavin, G.B., Szabo.S. Experimental Gastric mucosal injury, laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. FASEB Journal 6, 825-831, 1992.

Glavin, G.B., Szabor, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. FASEB J. 6. 825-831; 1992.

Goulart, Y.C., Sela, V.R., Obici, S., Martins, J.V.C., Otobone, F., Cortez, D.A., Audi, E.A. Evaluation of gastric Anti-ulcer Activity in a Hydroethanolic Extract from *Kielmeyera coriacea*. Brazilian Archives of Biology and Technology Vol 48, n.1: pp. 211-216, January 2005.

Gupta, M., Mazumber, U.K., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Senthilkumar, G.P., Suresh. Anti-ulcer activity of ethanol extract of *Terminalia pallida* Brandis. In Swiss albino rats. Journal of Ethnopharmacology 97 (2005) 405-408.

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.

Hojgaard, L., Nielson, A.M., Rune, S.J. peptic Ulcer Pathophysiology: Acid, Bicarbonate, and Mucosal Function, Scand J Gastroenterol 31, suppl 216:10-15, 1996.

Hoppenkamps.R. Thies. E., Yonnes. M., Siergers.E.P. Glutathione and GSH dependant enzymes in the human gastric mucosa. Klinwochenschr 62, 183-186. 1984.

Howiriny, T.A., Sohaibani, A., Said, M.S., Yahya, M.A., Tahir, K.E. Effect of *Commiphora opobalsamum* (L.) Engl. (Balessan) on experimental gastric ulcers and secretion in rats. Journal of Ethnopharmacology 98 (2005) 287-294.

Howiriny, T.A., Sohaibani, M.A., Said, M.a., Yahya, M.A., Thair, K.E., Rafatullah, S. Effect of *Commiphora opobalsamum* (L.) Engl. (Balessan) on experimental gastric ulcers and secretion in rats. Journal of Ethnopharmacology 98, 287-294. 2005.

- Kanatani, K., Ebata, M., Murakami, M., Okabe, S. Effects of Indomethacin and Rofecoxib on gastric Mucosal Damage in Normal and Helicobacter pylori Infected Mongolian Gerbils. *Journal of Pharmacology*, 55, 1, 207-222; 2004.
- Kato, S., Kitamura, M., Korolkiewicz, R.P., Takeuchi, K. Role of nitric oxid in regulation of gastric acid secretion in rats: Effects of NO donors and NO Synthase inhibitor, *BR J Pharmacol* 123 (5), 839-846,1998.
- Kaunitz,JD., Akiby. Gastroduodenal mucosal defense: role of endogenous mediators. *Curr Opin Gastroenterol*. 2004 Nov;20(6):526-32.
- Khenouf, S., Benabdallah, H., Gharzouli, K., Amira, S., Ito, H., Kim, T.H., Yoshida, T., Gharzouli, G. Effect of Tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* Leaves on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1469-1473, 2003.
- Loguercio.C. Taranto.D., Beneduce.F. Balance. C.V., Vicentis.A. Glutathione prevents ethanol-induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut* 34, 161-164, 1993.
- Maciel, M.A. Pinto.P.C.,Veiga.V.F. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. *Quím. Nova* v.25 n.3 São Paulo,2002.
- Marimoto, 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, s compared to those of teprenone and cimetidine. *Japan. J. Pharmacol.*57: 495-505,1991.
- Mazumder, M.G. Manikandan.L. Bahattacharya.S. Senthilkumar.G.P. Suresh. Anti-ulcer activity of ethanol extract of *Terminalia pallida* Brandis. In Swiss albino rats. *Journal of Ethono-Pharmacology*, 2004.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.
- Medleton, E., Kandaswami, C., Thioharides, T.C. The effects of Plants Flavonoids on Mammalian Cells. Implication Heart Disease and cancer *Pharmacological Reviews* 52: 547-590, 2002.

- Mozsik, G., Vincze, A., Szolcsanyi. Four response stages of capsaicin-sensitive primary afferent neurons to capsaicin and its analog: gastric acid secretion, gastric mucosal damage and protection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001 Oct;16(10):1093-7. Review.
- Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 13:49-54, 2000.
- Park, S.J., Seo, S.W., Choi, O.S., Park, S.C. α -Lipoic acid protects against cholecystokinin-induced acute pancreatitis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 11(31):4883-4885, 2005.
- Perneng, C.H., Lin, H.J., Lo, C.W., Tseng, G.Y., Sun, I.C., Ou, Y.H. *World Journal of Gastroenterology* February 15;10(4):602-605; 2004.
- Qui, B.S., Mei, Q.B., Liu, L., Meng, K. Effects of Nitric Oxide on Gastric ulceration induced by nicotine and cold-restraint stress. *World Journal of Gastroenterology*, 10(4):594-597; 2004.
- Rao, C.V., Ojha, S.K., Radhakrishnan, K., Govindarajan, R., Rastogi, S. Antiulcer activity of *Urtica salicifolia* rhizome extract. *Journal of Ethnopharmacology* 91 (2004) 243-249.
- Robert, A. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology*, 77, 761-767, 1979.
- Rosaneli, C.F., Bighetti, A.E., Antonio, 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.
- Schenckel, K. Approaching Western scientific standards. *Learning acupuncture in Peking* MMW Fortschr Med. 2001 Jan 11;143(1-2):57. German. No abstract available.
- Schumbert, Mitchell. Gastric Secretion. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Volume 19(6), November 2003 pp 519-525.
- Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M., Splet, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*, 5: 43-61, 1945.

Simões, C.M. Schenkel.E.P. A Pesquisa e a Produção Brasileira de Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais: A Necessária Interação da Indústria com a Academia.Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFSC, 2001.

Souza, G.C., Haas, A.P.S., Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. Journal of Ethnopharmacology 90:135-143, 2004.

Tanaka, J.C.A., Vidotti, G., Silva, C.C. A New Tormentilic and Derivated from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). J.Bras.Chem.Soc., Vol.14,NO. 3,475-478. 2003.

Tanaka, Júlio C. A. Tanaka, JCA, C.C, Silva, D. Benedito, Nakamura.Celso, Carvalho,J.E., Foglio,MA. Constituintes Químicos da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini (Tiliaceae). Química Nova. Vol28, N.5. 2005.

Wargovich, MG. Herbals and cancer. Adv Exp Med Biol. 2001;492:195-202. Review.

Xie, Y.X., Dixon, R.A. Proanthocyanidin biosynthesis- still more questions than answer Phytochemistry 66. (2005) 2127-2144.

Yodium, K.A., Martin, A., Joseph. J.A. Incorporation of the Elderberry Anthocyanins by Endothelial Cells Increases Protection Against Oxidative Stress. Free RadicalBiology and Medicine. 29: 51-60, 2000.

Szabo, S. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. Science, 214, 201-202, 1981.

Zhang, XL., HU, GD. Determination of major flavor components in chinese spirits using a special domestic gas chromatograph with DNP packed column]Se Pu. 2002 Sep;20(5):471-3. Chinese.