

PATRÍCIA CORRÊA DIAS

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA
DOS EXTRATOS BRUTOS E DAS FRAÇÕES
SEMIPURIFICADAS DE
Artemisia annua L.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós Graduação em Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Mestre em Ciências na Área de Farmacologia

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

Campinas
1997



N.º CPD
DATA
PREÇO
C ☐ D ☐
PROC.
TOMBO BC/
V. Ex.
N.º CHAMADA
UNIDADE

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	
DATA	
V. Ex.	
TOMBO BC/	32159
PROC.	893/98
C ☐ D ☐	
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/03/98
N.º CPD	

CM-00107389-1

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

D543a Dias, Patrícia Corrêa
 Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e das frações
 semipurificadas de *Artemisia annua* L. / Patrícia Corrêa Dias .
 Campinas, SP : [s.n.], 1997.

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

1. Plantas Medicinais. 2. Úlcera péptica. I. João Ernesto de
 Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Membros:

1. Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

2. Prof. Dr. Edson Antunes

3. Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

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

Data: 29/10/97

A Deus, pela vida e por ter sempre guiado e
iluminado meu caminho,

Aos meus pais, Tarciso e Neusa, por
estarem sempre ao meu lado
incondicionalmente, em todos os momentos de
minha vida. Pelo amor e incentivo sempre
constantes, dedico-lhes este trabalho.

Amo vocês.

Às minhas irmãs, Cristiana e Rogéria, pelo
carinho e apoio sempre presentes.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela
oportunidade de trabalho, seriedade, profissionalismo
e amizade que conquistamos nestes anos.
Por tudo, agradeço e ofereço-lhe este trabalho,
Mestre.

Agradecimentos

Ao CPQBA/UNICAMP, pelo oferecimento de sua infraestrutura, o que proporcionou a plena execução deste trabalho,

Ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela acolhida,

À Dra. Mary Ann Foglio, pela realização do trabalho fitoquímico, além da consideração, apoio e inestimável amizade que sempre dispensou a mim,

À Débora Christian Fachim Nogueira, pela colaboração indispensável na realização dos experimentos e inestimável amizade,

À Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, bioterista do Laboratório de Ensaios Biológicos do CPQBA / UNICAMP, pela amizade e apoio técnico sempre presentes,

À Ana Possenti, pela colaboração indispensável na realização dos experimentos, além do apoio e amizade,

À Márcia Aparecida Antônio, pelo apoio técnico prestado e amizade presente em todos estes anos,

Aos amigos Cáritas de Jesus Silva Mendonça, Paulo Eduardo Pizão, Luciana Konecny Kohn e Mirtes Costa, pela agradável convivência diária,

À Cláudia Picolli, pelo apoio na realização dos experimentos e pela dedicação e profissionalismo que sempre dispensou a este trabalho,

À Suse Mary Bonzanini, pela colaboração na obtenção dos extratos e frações,

Ao Laboratório Agrícola do CPQBA/UNICAMP pelo fornecimento da espécie vegetal estudada,

À Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, pela colaboração no trabalho fitoquímico, além da agradável convivência,

À Cármem Lúcia Rodrigues Arruda, pelo apoio na elaboração do material de apresentação desta Dissertação,

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

À Gislaine E. Alípio e Solange A. S. Basso, secretárias do Curso de Pós Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela atenção dispensada a mim e a todos os alunos deste departamento,

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP/UNICAMP), pelo apoio financeiro,

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

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

Sigmund Freud

Lista de gráficos

	Página
GRÁFICO 1: Efeito da administração oral da cimetidina e das frações aquosa e diclorometânica, obtidas do extrato hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	38
GRÁFICO 2: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	39
GRÁFICO 3: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto etanólico e suas frações, obtidos das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	41
GRÁFICO 4: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto diclorometânico e suas frações, obtidos das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> no modelo de úlcera induzida por indometacina	42
GRÁFICO 5: Efeito da administração oral da cimetidina e da fração lactonas, obtida do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	43
GRÁFICO 6: Efeito da administração oral da cimetidina e das frações apolar, de média polaridade e polar, obtidas a partir da fração lactonas das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	44
GRÁFICO 7: Efeito da administração oral da fração diclorometânica, obtida do extrato hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i> e da atropina em modelo de úlcera induzida por reserpina	48
GRÁFICO 8: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da fração lactonas, obtida do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por estresse	49
GRÁFICO 9: Efeito da administração oral da fração diclorometânica, obtida do extrato hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i> em modelo de úlcera induzida por etanol	51
GRÁFICO 10: Efeito da administração subcutânea da fração lactonas, obtida do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> no modelo de úlcera induzida por etanol	52
GRÁFICO 11: Efeito da administração oral da fração de polaridade média, obtida das frações lactonas, obtida das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por etanol com administração prévia de L-name	55

GRÁFICO 12: Efeito da administração oral do extrato bruto diclorometânico obtido das raízes de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com a administração prévia de N- etilmaleimida	48
GRÁFICO 13: Efeito da administração oral do extrato bruto diclorometânico obtido das raízes e da fração de polaridade média das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com e sem a administração prévia de indometacina	49

Lista de figuras

	Página
FIGURA 1: Exemplar de <i>Artemisia annua</i> cultivada no CPQBA/UNICAMP	21
FIGURA 2: Perfil cromatográfico do extrato bruto diclorometânico obtido das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	61
FIGURA 3: Perfil cromatográfico do extrato bruto etanólico obtido das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	61
FIGURA 4: Perfil cromatográfico da fração acetonitrílica obtida a partir do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	62
FIGURA 5: Perfil cromatográfico da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas obtida das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	63
FIGURA 6: Perfil cromatográfico da fração de média polaridade obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	63

Lista de tabelas

	Página
TABELA 1: Efeito da administração oral da cimetidina e das frações aquosa e diclorometânica, obtidas do extrato hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	38
TABELA 2: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	39
TABELA 3: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto etanólico e suas frações, obtidos das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	41
TABELA 4: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto diclorometânico e suas frações, obtidos das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> em modelo de úlcera induzida por indometacina	42
TABELA 5: Efeito da administração oral da cimetidina e da fração lactonas, obtida do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por indometacina	43
TABELA 6: Efeito da administração oral da cimetidina e das frações apolar, de média polaridade e polar, obtidas a partir da fração lactonas das partes aéreas de <i>A. annua</i> L., no modelo de úlcera induzida por indometacina	45
TABELA 7: Principais substâncias identificadas na fração flavonoidica, obtida das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , sem atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por indometacina	46
TABELA 8: Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , sem atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por indometacina ..	47
TABELA 9: Efeito da administração oral da fração diclorometânica obtida do extrato hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i> em modelo de úlcera induzida por reserpina	49
TABELA 10: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da fração lactonas, obtida do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> , no modelo de úlcera induzida por estresse	50
TABELA 11: Efeito da administração oral da fração diclorometânica, obtida do extrato hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i> em modelo de úlcera induzida por etanol	51

TABELA 12: Efeito da administração subcutânea da fração lactonas, obtida do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	52
TABELA 13: Efeito da administração intraduodenal do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes de <i>Artemisia annua</i> , sobre a secreção gástrica em modelo de ligadura do piloro	53
TABELA 14: Efeito da administração intraduodenal do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes de <i>Artemisia annua</i> sobre a secreção gástrica em modelo de ligadura do piloro em animais pré tratados com histamina	54
TABELA 15: Efeito da administração oral da fração de polaridade média, obtida das frações lactonas, obtida das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> em modelo de úlcera induzida por etanol com administração prévia de L-name	55
TABELA 16: Efeito da administração oral do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes de <i>Artemisia annua</i> em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com a administração prévia de N-etilmaleimida	57
TABELA 17: Efeito da administração oral do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes e da fração de polaridade média, das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i> em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com e sem a administração prévia de indometacina	58
TABELA 18: Efeito da administração oral da fração de média polaridade, obtida da fração lactonas. na produção de muco protetor aderido à mucosa gástrica	59

Lista de Esquemas

ESQUEMA 1: Obtenção dos extratos brutos	24
ESQUEMA 2: Obtenção das frações aquosa e diclorometânica a partir do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i>	25
ESQUEMA 3: Obtenção das frações hexânica, acetonitrílica e aquosa a partir dos extratos brutos etanólico e diclorometânico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	26
Obtenção da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas a partir do extrato bruto metanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	27
ESQUEMA 5: Purificação da fração lactonas	28

Sumário

	Página
1. Resumo	1
2. Introdução	5
3. Objetivos	10
4. Revisão bibliográfica	12
5. Materiais e métodos	
5.1. Obtenção do material vegetal	20
5.1.2. Descrição botânica da espécie	22
5.2. Fitoquímica	
5.2.1 Obtenção dos extratos brutos	23
5.2.2. Obtenção das frações aquosa e diclorometânica a partir do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i>	24
5.2.3 Obtenção das frações hexânica, acetonitrílica e aquosa a partir dos extratos brutos etanólico e diclorometânico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	25
5.2.4. Obtenção da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas a partir do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	26
5.2.5. Purificação da fração lactonas	27

5.2.6. Análise cromatográfica	
5.2.6.1. Cromatografia em camada delgada	28
5.2.6.2. Análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	29
5.3. Testes de atividade farmacológica	
5.3.1. Animais	29
5.3.2. Úlcera induzida por indometacina	29
5.3.3. Úlcera induzida por etanol	31
5.3.4. Úlcera induzida por reserpina	31
5.3.5. Úlcera induzida por estresse	32
5.3.6. Estudo da participação das prostaglandinas na citoproteção gástrica	32
5.3.7. Estudo da participação das substâncias sulfidrílicas não proteicas na citoproteção gástrica.	33
5.3.8. Estudo da participação do óxido nítrico na citoproteção gástrica.	33
5.3.9. Ligadura do piloro	34
5.3.10. Determinação quantitativa do muco gastroprotetor .	34
5.4. Análise estatística	35
6. Resultados	
6.1. Úlcera induzida por indometacina	
6.1.1. Frações aquosa e diclorometânica obtidas do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i>	37
6.1.2. Extrato bruto diclorometânico obtido das raízes de <i>Artemisia annua</i>	39

6.1.3. Extratos brutos etanólico e diclorometânico e respectivas frações, obtidos das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	40
6.1.4. Fração lactonas	43
6.1.5. Frações obtidas da purificação da fração enriquecida rica em lactonas sesquiterpênicas	44
6.1.6. Fração flavonoídica e substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	45
6.2. Úlcera induzida por reserpina	
6.2.1. Fração diclorometânica obtido do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i>	48
6.3. Úlcera induzida por estresse	
6.3.1. Fração de polaridade média obtida a partir da fração lactonas	49
6.4. Úlcera induzida por etanol	
6.4.1. Fração diclorometânica obtido do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de <i>Artemisia annua</i>	50
6.4.2. Fração lactonas	51
6.5. Ligadura do piloro	
6.5.1. Extrato bruto diclorometânico das raízes de <i>Artemisia annua</i>	53
6.6. Estudo da influência do óxido nítrico sobre a citoproteção gástrica	
6.6.1. Fração de polaridade média	54

6.7. Estudo da influência dos grupos sulfidríla não proteicos sobre a citoproteção gástrica	
6.7.1. Extrato bruto diclorometânico das raízes de <i>Artemisia annua</i>	56
6.8. Estudo da influência das prostaglandinas sobre a citoproteção gástrica	
6.8.1. Extrato bruto diclorometânico das raízes e fração de polaridade média das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	57
6.9. Determinação quantitativa do muco protetor aderido à mucosa gástrica	
6.9.1 Fração de polaridade média obtida das fração lactonas das partes aéreas de <i>Artemisia annua</i>	59
6.10. Análise cromatográfica de extratos brutos e frações com atividade antiulcerogênica	60
7. Discussão	64
8. Conclusões	74
9. Summary	76
10. Referências bibliográficas	80

1. Resumo

A *Artemisia annua* L. (Asteraceae) é originária de regiões de clima temperado da Ásia e tem sido utilizada pela medicina tradicional chinesa há vários séculos no tratamento da malária. Esta atividade é devida à presença de uma lactona sesquiterpênica na espécie, denominada artemisinina.

Outra espécie deste gênero, a *Artemisia douglasiana*, apresentou atividade antiulcerogênica em modelo de úlcera induzida por etanol, devido à presença da dehidroleucodina, substância também pertencente à classe das lactonas sesquiterpênicas. Portanto, os objetivos deste trabalho foram a avaliação da atividade antiulcerogênica da *Artemisia annua*, a determinação de frações e ou princípios ativos e ainda, a sugestão de um provável mecanismo de ação antiulcerogênica.

Foram utilizadas, para a obtenção dos extratos brutos (EBs) e frações, as partes aéreas e as raízes da espécie, separadamente. Os extratos brutos de ambas as partes, apresentam atividade antiulcerogênica equivalente em modelo de úlcera induzida por

indometacina, porém o trabalho com as raízes é mais vantajoso, pois estas não apresentam clorofila e graxas, substâncias que dificultam a separação dos princípios ativos e não apresentam interesse farmacológico específico.

Os mecanismos de ação antiulcerogênica envolvem os fatores que controlam a secreção ácida ou aqueles que promovem a citoproteção, aumentando a resistência da mucosa contra agentes agressores ou ainda, limitando o acesso destes agentes à ela.

A ação antissecreatória da *Artemisia annua* foi avaliada em modelo de ligadura do piloro com e sem o tratamento com histamina, substância de conhecida atividade estimulatória da secreção ácida. O tratamento intraduodenal com o EB diclorometânico das raízes não alterou o volume e a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico nos grupos de animais tratados e não tratados com a histamina.

Alguns extratos e frações foram ativos em modelo de úlcera induzida por etanol, sugerindo a participação de algum mecanismo citoprotetor. A fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas foi ativa neste modelo quando administrada por via subcutânea, descartando a hipótese de citoproteção adaptativa, um efeito local e inespecífico, no qual substâncias ligeiramente irritantes da mucosa podem desencadear a produção de prostaglandinas.

Alguns mecanismos citoprotetores foram avaliados. Entre eles, a participação do óxido nítrico (NO), substância endógena que aumenta a resistência da mucosa por promover a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo local. Em modelo de úlcera induzida por etanol com administração prévia de L-name, um inibidor da NO sintase, a fração de média polaridade (FPM), obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas, manteve sua atividade antiulcerogênica, sugerindo que esta atividade não está relacionada com o óxido nítrico.

Outra hipótese seria a interferência com os grupos sulfidril não proteicos da mucosa. Estas substâncias, provavelmente promovem citoproteção por atuarem junto à microvasculatura, diminuindo o aumento da permeabilidade vascular ou ainda por impedir o ataque de radicais livres sobre a mucosa. Para isto, foi utilizado o modelo de úlcera induzida por etanol, com administração prévia de N-etilmaleimida, um

alquilante de grupos sulfidril. Nestas condições, o tratamento oral com o EB diclorometânico das raízes manteve a atividade, sugerindo que estas substâncias também não estão envolvidas no processo de citoproteção.

As prostaglandinas são substâncias importantes no processo de citoproteção gástrica, mediando principalmente a produção de muco e bicarbonato. A participação destas substâncias foi avaliada em modelo de úlcera induzida por etanol, com e sem a administração prévia de indometacina, uma droga antiinflamatória não esteroideal, que inibe a ciclooxigenase, enzima envolvida na síntese de prostaglandinas. Nos grupos que não receberam a indometacina, o EB diclorometânico das raízes e a FPM apresentaram atividade antiulcerogênica, sendo que esta atividade desapareceu quando foi realizado o tratamento prévio com a indometacina. Este resultado sugere que o mecanismo de ação antiulcerogênica do(s) princípio(s) ativo(s) da *Artemisia annua* está diretamente relacionado com a síntese de prostaglandinas. Esta hipótese foi reforçada quando o muco protetor aderido à mucosa foi quantificado, tendo sido observado um aumento na produção de muco nos grupos de animais tratados com a FPM por via oral.

2. Introdução

As plantas medicinais constituem uma rica fonte de novas moléculas a serem exploradas terapeuticamente no futuro (Lewis & Hanson, 1991). Muitos princípios ativos isolados de plantas continuam sendo as drogas de escolha em suas respectivas áreas da terapia, como por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos a partir da *Digitalis purpurea*, utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva.

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem aumentado significativamente. Várias empresas privadas e organizações governamentais, têm instituído projetos de pesquisas nesta área. É importante salientar que, na década de 70, nenhuma das 250 maiores companhias do ramo farmacêutico do mundo, mantinham qualquer programa de pesquisa na área de produtos naturais e atualmente, pelo menos metade delas introduziram este tipo de pesquisa como uma de suas prioridades (Fellows, 1992).

Alguns fatores têm contribuído para este aumento de interesse e entre eles está a grande eficácia clínica de algumas substâncias antitumorais obtidas de plantas, como os alcalóides da vinca, extraídos da espécie vegetal *Catharanthus roseus* e os taxóides, extraídos de *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata* (Cragg *et al.*, 1993).

Outro aspecto importante, é a obtenção de compostos que, apesar de apresentarem potencial terapêutico limitado, podem ser utilizados como matéria prima inicial para a obtenção de produtos semi sintéticos com maior atividade terapêutica. Como exemplo, pode ser citado o desenvolvimento do atracúrio a partir dos alcalóides do curare, obtidos de *Chondrodendron tomentosum* (Waigh, 1988).

A espécie vegetal, alvo de estudo deste trabalho, a *Artemisia annua* L. (Asteraceae) é utilizada pela medicina tradicional chinesa há vários séculos no tratamento da malária. Os estudos científicos, para avaliação da atividade antimalárica, foram realizados com os extratos de mais de trinta espécies do gênero *Artemisia*, sendo que a somente a *Artemisia annua* e a *Artemisia apiecea* foram eficazes em combater o *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*, agentes etiológicos da malária (Klayman, 1985). Esta atividade é devida à presença da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada no início da década de 70 (Sharma, 1991).

A artemisinina apresenta um grupamento endoperóxido na molécula, que parece ser essencial para sua atividade esquizonticida e possui fundamental importância no tratamento de formas de malária resistentes à terapia convencional com drogas como a cloroquina e a mefloquina (Meshnick, 1993). A partir da artemisinina, já foram obtidos outros derivados semi-sintéticos com maior potência antimalárica, como o artesunato de sódio e o arteméter. Em relação às características de solubilidade destas substâncias, o artesunato de sódio é mais solúvel em água, por apresentar caráter polar e o arteméter, devido ao caráter apolar, é solúvel em veículos oleosos.(Ding, 1988).

Em países onde a doença é endêmica, como o Brasil, o desenvolvimento de novas drogas na categoria é muito interessante, desde que apresente vantagens terapêuticas e viabilidade econômica.

A úlcera gástrica é uma doença que acomete grande parte da população e por isto torna-se importante o uso de novos medicamentos. Sua incidência tem aumentado devido principalmente ao estresse, ingestão de bebidas alcoólicas e drogas antiinflamatórias. Em laboratório, por meio de modelos experimentais em animais, tenta-se reproduzir, a ação dos agentes causadores de úlceras gástricas, para avaliar a atividade de novas drogas frente aos diferentes agentes ulcerogênicos.

No que diz respeito aos fármacos de origem natural com atividade antiulcerogênica, vários princípios ativos tiveram sua atividade comprovada através de modelos experimentais em animais. A mais importante delas é a carbenoxolona sódica (sal sódico do hemisuccinato do ácido glicirretínico), obtida a partir das raízes e rizomas do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*). Esta substância também está presente em várias espécies do gênero *Abrus* (*A. precatorium*, *A. melanospermum* e *A. pulchellus*). Seu mecanismo de ação foi extensamente estudado e sabe-se que esta droga aumenta os níveis de PGs na mucosa gástrica por inibir as enzimas que promovem o catabolismo das PGs (15-hidroxi-PG-dehidrogenase e Δ^{13} -PG-redutase), além de inibir a secreção de pepsina (Lewis *et al.*, 1991).

Os extratos da *Artemisia douglasiana*, diminuíram consideravelmente o aparecimento de lesões em modelos experimentais de úlcera induzida por etanol absoluto e outros agentes necrotizantes da mucosa. Acredita-se que esta atividade é devida à presença de uma lactona sesquiterpênica na espécie, denominada dehidroleucodina. Provavelmente a ação antiulcerogênica desta substância está relacionada com o aumento dos níveis de prostaglandinas e de grupos sulfidril não proteicos da mucosa gástrica (Guardia & Guzman 1994). Lactonas sesquiterpênicas pertencentes ao grupo das guaianolidas e pseudoguaianolidas, isoladas de partes aéreas de *A. douglasiana*, apresentaram atividade citoprotetora contra o desenvolvimento de úlcera péptica (Giordano *et al.*, 1990). Com base nestas informações, foi avaliada a atividade antiulcerogênica da *Artemisia annua*.

O desenvolvimento deste trabalho trouxe algumas vantagens, pois foi possível a obtenção das frações ativas nos modelos experimentais de úlcera gástrica, sem que

houvesse comprometimento na obtenção de artemisinina, objetivo de outros projetos de pesquisa do CPQBA/UNICAMP. É importante salientar que, muitas das frações ativas nos modelos experimentais de úlcera gástrica são provenientes do processo de extração da artemisinina.

3. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- A avaliação da atividade antiulcerogênica gástrica dos extratos brutos, frações semipurificadas e ou princípios ativos presentes na *Artemisia annua*,
- A identificação de frações ativas e ou substâncias responsáveis pela atividade antiulcerogênica gástrica e
- A sugestão de um provável mecanismo de ação antiulcerogênica para o(s) princípio(s) ativo(s) presentes na *Artemisia annua*.

4. Revisão bibliográfica

A camada mucosa do estômago e duodeno está constantemente exposta à ação do ácido clorídrico e da pepsina. Em condições normais, esta mucosa possui mecanismos que a defendem da autodigestão causada por estes agentes, além de protegê-la também contra fatores agressivos exógenos, como o estresse, a hiperosmolaridade dos alimentos e ainda, a ingestão de etanol e drogas antiinflamatórias. Estes mecanismos, denominados citoprotetores, aumentam a resistência das células e limitam o acesso dos agentes agressores a elas (Allen *et al.*, 1993).

As prostaglandinas são produtos do metabolismo do ácido aracdônico, que é liberado a partir dos fosfolipídeos das membranas celulares pela atividade da fosfolipase A₂, em resposta a estímulos químicos, físicos e neuro-hormonais. As prostaglandinas dos tipos E, F e I são sintetizadas em quantidades substanciais por todo o trato gastrointestinal e são os principais agentes endógenos responsáveis pela

citoproteção (Konturek & Pawlik, 1986). A PGE_2 e a $\text{PGF}\alpha$ são os tipos mais abundantes na mucosa gástrica humana.

Além de possuírem efeitos anti-secretórios, as prostaglandinas estimulam a secreção de muco e bicarbonato e aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa, possibilitando a remoção mais rápida de substâncias tóxicas, além de aumentar, consequentemente, a oferta de oxigênio e nutrientes para as células (Felix, 1986).

Os receptores capazes de ligarem-se às prostaglandinas foram caracterizados recentemente e foi observado que eles apresentam sete domínios transmembrana, comuns à família de receptores acoplados à proteína G. Estes receptores dividem-se em subtipos específicos de acordo com a especificidade que apresentam pelos diferentes tipos de prostaglandinas e são relacionados a diferentes vias de transdução de sinal, como o AMP cíclico, trifosfato de inositol e diacilglicerol (Eberhart & Dubois, 1995).

O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago e pelo duodeno em resposta a vários estimulantes, como as prostaglandinas, peptídeos gastrointestinais e contato com o ácido gástrico. O bicarbonato permanece em grande parte abaixo ou na camada mucosa. Deste modo, a superfície mucosa está em contato com um líquido com pH mais elevado do que o observado na luz do estômago. Em condições normais o bicarbonato neutraliza os íons H^+ enquanto se difunde através da camada de muco, estabelecendo um gradiente de pH entre a luz e as células epiteliais superficiais (Smedfors & Johansson, 1986).

Existem basicamente dois tipos de muco no estômago. O muco luminal, que pode ser facilmente removido, não apresenta propriedades citoprotetoras específicas, participando somente como lubrificante, protegendo a mucosa contra forças mecânicas do processo de digestão. Já o muco aderido à mucosa, é constituído por uma camada de glicoproteínas em forma de gel, denominada mucina. Esta camada é insolúvel em água e protege a mucosa do contato direto com ácido clorídrico e a pepsina (Sellers *et al.*, 1986).

A injúria gástrica por agentes necrotizantes, como o etanol, pode resultar no acúmulo de radicais livres tóxicos para as células. Existe, na mucosa gástrica, uma alta concentração de glutathione reduzida, o maior componente do grupo de substâncias sulfidrílicas não proteicas endógenas. Tióis, como a glutathione reduzida, são capazes de ligarem-se a estes radicais, impedindo sua ação nociva sobre a mucosa gástrica. Outra hipótese para a citoproteção conferida pelas substâncias sulfidrílicas é o aumento da síntese de prostaglandinas ou ainda a diminuição na degradação destas substâncias. (Szabo, 1981). Existem ainda outras possibilidades que explicam a ação citoprotetora das substâncias sulfidrílicas. A prevenção do aumento da permeabilidade microvascular, fator patogênico inicial no desenvolvimento de úlceras induzida por etanol e ainda a inibição da motilidade gastrointestinal (Takeuchi *et al.*, 1989).

A colecistocinina e a gastrina são liberadas endogenamente pelo estômago e parte proximal do intestino constituindo-se em mediadores fisiológicos de várias funções, tais como a secreção e esvaziamento gástricos (Konturek *et al.*, 1995)

Há evidências de que estes peptídeos também possuam ação sobre a manutenção da integridade da mucosa gástrica através da ligação em receptores específicos (CCK-A para a colecistocinina e CCK-B para a gastrina) localizados em fibras vagais sensíveis à capsaicina. Em animais pré tratados com CCK-8, pentagastrina e oleato de sódio, uma substância liberadora da colecistocinina endógena, houve redução do índice de lesões gástricas produzidas pela administração oral de etanol. A associação de CCK-8 e pentagastrina diminuiu ainda mais o índice de lesões sugerindo uma interação destas duas substâncias na citoproteção. É provável que a ação citoprotetora destes peptídeos seja devido à interferência dos mesmos com as substâncias sulfidrílicas não proteicas e com o óxido nítrico. O óxido nítrico, substância endógena liberada pela NO-sintase, é uma substância que promove intensa vasodilatação, com consequente aumento do fluxo sanguíneo da mucosa (Konturek *et al.*, 1995). É ainda atribuída ao óxido nítrico, a inibição da liberação de metabólitos oxigenados e proteases a partir de leucócitos no interior da microcirculação gástrica, sendo estes, os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento de úlceras causadas pelas drogas antiinflamatórias não esteroideais. O

óxido nítrico também parece modular a secreção de alguns fatores de crescimento, celular, principalmente o fator de crescimento epidermal (Elliot *et al.*, 1995).

A colecistocinina e a gastrina também aumentam o conteúdo luminal de somatostatina, substância citoprotetora que inibe a secreção ácida e suprime a geração de leucotrienos e a liberação da substância P ou peptídeo vasoativo intestinal. Todos os efeitos citoprotetores da colecistocinina e da gastrina são antagonizados pelo loxiglumide e L-365,260 que atuam inibindo os receptores CCK-A e CCK-B, respectivamente (Konturek *et al.* 1995).

A secreção ácida gástrica é controlada por mecanismos complexos e interativos que atuam nos níveis central, periférico e celular. O sistema nervoso central, participa da iniciação do processo secretório, pois alguns fatores emocionais e mentais desencadeiam a secreção. Algumas regiões como o núcleo dorsomotor do vago, o hipotálamo e núcleo do trato solitário, são responsáveis por este processo. Estas regiões apresentam grande concentração de receptores para substâncias pertencentes à família dos polipeptídeos pancreáticos, que agem estimulando a secreção ácida gástrica. Existem também outras substâncias que agem no sistema nervoso central, inibindo a secreção, como a interleucina 1, a neurotensina e a dopamina (Schubert, 1994).

Na periferia as principais substâncias que desencadeiam o processo secretório são a histamina, acetilcolina e gastrina.

A acetilcolina age diretamente sobre a célula parietal, estimulando-a, por meio de ligação ao receptor muscarínico do tipo M₃, presente nesta célula. A ativação deste tipo de receptor leva à hidrólise de fosfolipídeos, que culminam na produção do 1,4,5 trifosfato de inositol e diacilglicerol. Estas duas substâncias promovem o aumento do cálcio intracelular, importante segundo mensageiro celular no processo de secreção ácida.

A acetilcolina também estimula as células enterocromafins na liberação de histamina, substância que estimula a secreção por interagir com receptores histaminérgicos do tipo H₂. A estimulação da secreção ácida pela histamina é mediada

pelo aumento de cálcio intracelular e pela ativação da adenilatociclase, com consequente aumento nos níveis de AMP cíclico. A acetilcolina também aumenta a secreção de gastrina pelas células G e ainda inibe a secreção de somatostatina pelas células D, uma substância que inibe a produção de ácido pela célula parietal, através de um receptor do tipo SSTR₂ (Schubert, 1994).

O ácido gástrico é produzido e excretado pelas células parietais, através da estimulação de alguns receptores localizados em sua superfície. Uma vez ativados, estes receptores geram mudanças em segundos mensageiros celulares, determinando assim, a atividade da bomba protônica, H⁺, K⁺ ATPase. Esta enzima é composta das subunidade α , responsável pela atividade catalítica e da subunidade β , aparentemente com a função de estabilização da subunidade α (Hirschowitz *et al.*, 1995).

O ácido clorídrico exerce um importante papel na patogênese da úlcera gástrica causada por diferentes agentes e portanto, a inibição da secreção ácida é de grande importância na prevenção e tratamento desta patologia.

O tratamento das úlceras gástricas inicialmente era realizado apenas com substâncias antiácidas, que neutralizam o ácido clorídrico, formando sal e água. O bicarbonato de sódio é o mais antigo deles, sendo sua utilização desaconselhada pela curta duração de ação. Existem ainda os sais de magnésio e alumínio, que são mais utilizados, porém, atualmente em associação com outras drogas de mecanismo de ação mais específico.

Dentre os agentes antissecretores gástricos, do tipo antagonistas dos receptores H₂ de histamina (Black *et al.*, 1972), a cimetidina é um dos mais utilizados. Porém outros análogos, como a ranitidina, a famotidina e a nizatidina também apresentam utilização clínica. (Hirschowitz *et al.*, 1995).

O misoprostol, pertencente à classe dos análogos das prostaglandinas, é um exemplo típico de droga citoprotetora, apresentando atividade antissecretória e estimuladora da produção de muco e bicarbonato (Monk & Clissold, 1987).

Foram desenvolvidas drogas do tipo derivados benzimidazólicos, como o omeprazol, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da bomba protônica, a H^+ , K^+ ATPase. No ambiente ácido do estômago, o omeprazol é convertido num composto que reage com os grupamentos tióis presentes nas moléculas de cisteína que fazem parte da H^+ , K^+ ATPase, enzima responsável pela etapa final da secreção ácida gástrica (Lindberg *et al.*, 1986). Outras drogas com mesmo mecanismo de ação já foram desenvolvidas, podendo ser citado como exemplo, o lansoprazol, que é mais ativo que o omeprazol em inibir a secreção ácida (Morini *et al.*, 1995). O lansoprazol também aumenta tanto a secreção basal de bicarbonato, quanto aquela estimulada pela presença do ácido luminal, por estimular neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina, possivelmente através da liberação do peptídeo vasoativo intestinal (Inada & Satoh, 1996).

Recentemente, os compostos de bismuto e alguns outros antimicrobianos têm sido associados ao tratamento medicamentoso das gastrites e ulcerações gástricas, pois, geralmente as ulcerações estão infectadas pelo *Helicobacter pylori*. A infecção por esta bactéria causa um aumento da gastrina liberada e uma diminuição do conteúdo de somatostatina, culminando em excesso de acidez no estômago (Shubert, 1994). Nesses casos, a associação de antimicrobianos tem diminuído significativamente o número de recidivas desta patologia. (Graham, 1989).

5. Materiais e Métodos

5.1. Obtenção do material vegetal

Foram utilizadas as raízes e as partes aéreas da espécie vegetal *Artemisia annua*, cultivadas pela Área de Agrotecnologia no campo experimental do CPQBA/UNICAMP. Os exemplares foram obtidos a partir de híbridos desenvolvidos em 1991. Estes híbridos foram resultantes da clonagem de sementes chinesas e vietnamitas, denominadas SI/FI e SII/FII, fornecidas ao CPQBA pela “Mediplant (Centre de Recherches sur les Plantes Médicinales et Aromatiques)”, órgão suíço, responsável pelo trabalho de melhoramento das sementes. Após a coleta, o material vegetal foi seco à sombra e posteriormente triturado em triturador de facas, produzindo-se partículas de aproximadamente 0,35 mm. A figura 1 mostra um exemplar de *Artemisia annua* cultivada no CPQBA / UNICAMP



FIGURA 1: Exemplar de *Artemisia annua* L. cultivada no CPQBA/UNICAMP

5.1.2. Descrição botânica da espécie

A *Artemisia annua* é uma Asteraceae, tribo Anthemidia, sub gênero Abrotanum. É uma planta herbácea, anual, ereta, haste cilíndrica, longitudinalmente estriada, verde pálida, com pilosidade simples, curta, unicelular e alvotranslúcida. Folhas simples, profundamente partidas, pinatisssectas, membranáceas; as inferiores rosuladas, as superiores alternadas, de dimensões progressivamente menores à medida que se aproximam do ápice da planta; na face superior, verde claras, pilosas e com nervura principal proeminente. Pecíolo longo, triangulado, verde claro, piloso, superiormente leve canaliculado.

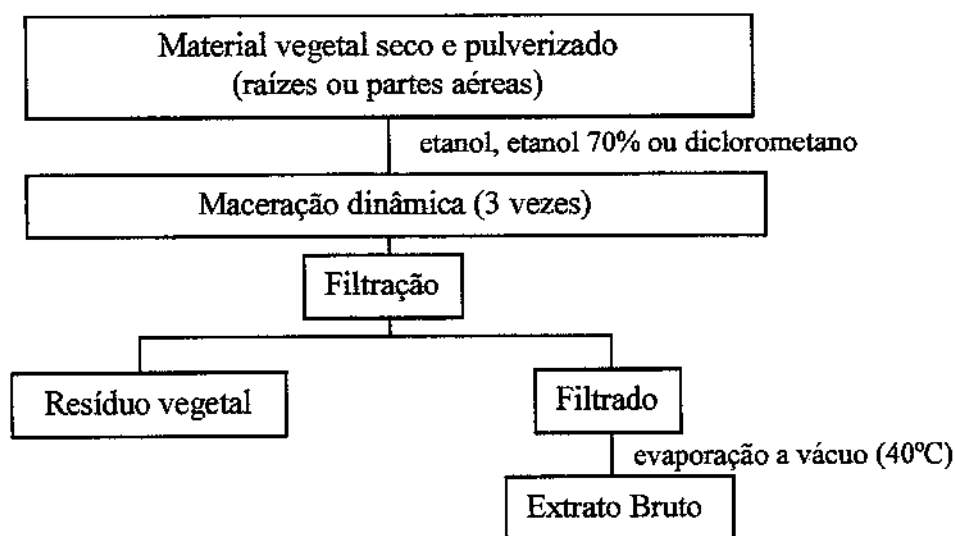
Inflorescência em panícula de capítulos pequenos e multiflores, distribuídos ao longo de toda a haste. Invólucro composto por brácteas em duas séries, sendo as inferiores, maiores, todas verdes, glabras e de bordos hialinos. Receptáculo floral convexo, com em média 50-60 flores pediceladas. Flores marginais femininas, férteis, tubuloso-liguladas e numa só série, glabras e de coloração verde amarelada. Gineceu de ovário ínfero, unilocular, uniovulado. Estilete simples, com estigma bifido; flores centrais hermafroditas, tubulosas, com cinco lobos triangulados, amarelas e glabras. Gineceu de ovário ínfero, unilocular, uniovulado. Estilete simples, com estigma bifido, deflexo fimbriado. Androceu formado por cinco estames sinanteros, inseridos no fundo da corola, com anteras brancacentas, glabras e apiculadas. Fruto do tipo aquênio, acastanhado quando da maturação. Reproduz-se exclusivamente por sementes (Jahn, 1988).

5.2. Fitoquímica

Os extratos brutos e as frações foram obtidos de acordo com técnicas de extração e purificação usuais do Laboratório de Fitoquímica do CPQBA/UNICAMP, exceto no caso da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas, que foi obtida segundo metodologia descrita em literatura.

5.2.1. Obtenção dos extratos brutos de *Artemisia annua*

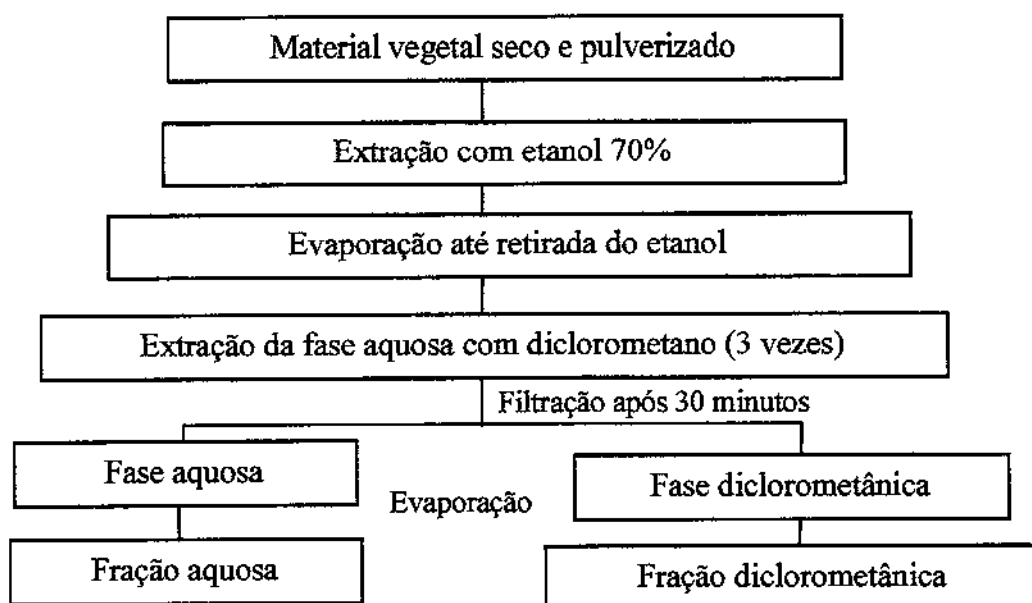
Cinquenta gramas de raízes ou partes aéreas de *Artemisia annua*, foram submetidos à maceração dinâmica por um período de 4 horas, com 500 ml de solvente adequado, ou seja, etanol absoluto, etanol 70% ou diclorometano, por 3 vezes consecutivas. A cada período de 4 horas, foi realizada uma filtração em papel, sendo que, ao final de três destes períodos, o resíduo do material vegetal foi descartado e o filtrado resultante foi submetido à evaporação a vácuo, sob temperatura de 40°C, resultando nos extratos brutos etanólico, hidroalcoólico ou diclorometânico, de acordo com o solvente utilizado durante o processo de maceração. Os rendimentos de extração foram de 12 a 20%, de acordo com a parte do vegetal e o solvente, utilizados no processo de extração. Estes procedimentos estão descritos no esquema 1.



ESQUEMA 1: Obtenção dos extratos brutos de *Artemisia annua*

5.2.2. Obtenção das frações aquosa e diclorometânica a partir do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua*

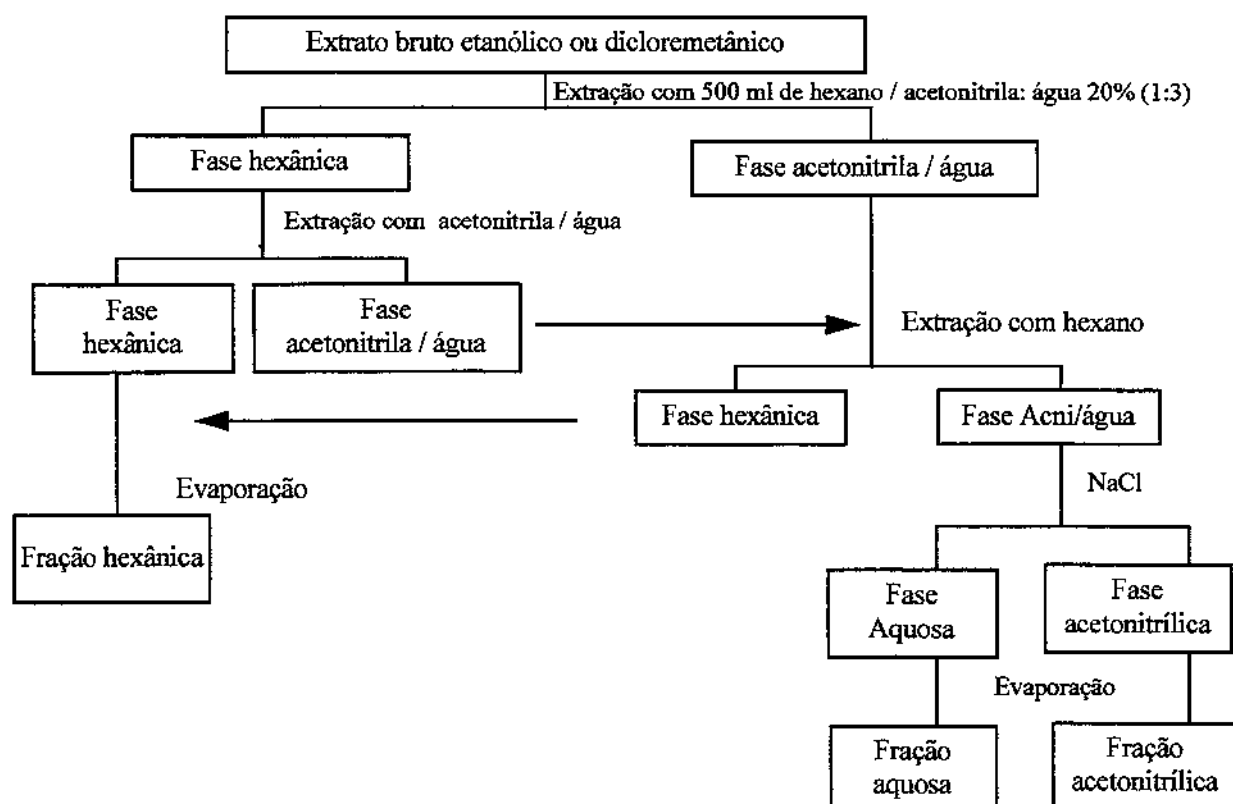
O filtrado resultante da maceração de 50 g de raízes com 1,5 l de etanol 70%, foi evaporado a vácuo sob temperatura de 40° C até que todo o etanol fosse esgotado e restasse apenas a fase aquosa. Esta fase foi extraída por três vezes consecutivas com 200 ml de diclorometano, sendo portanto, obtidas duas outras, denominadas aquosa e diclorometânica. Após separação em funil, a fase diclorometânica foi evaporada a vácuo, sob temperatura de 40°C. A fase aquosa também foi evaporada a vácuo, sob temperatura de 60°C, com adição de etanol absoluto, para facilitar a retirada da água. Desta forma, foram obtidas as respectivas frações, denominadas aquosa (7,2) e diclorometânica (4,4 g). Estes procedimentos estão descritos no esquema 2.



ESQUEMA 2: Obtenção das frações aquosa e diclorometânica a partir do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua*

5.2.3. Obtenção das frações hexânica, acetonitrílica e aquosa a partir dos extratos brutos etanólico e diclorometânico das partes aéreas de *Artemisia annua*

Doze gramas dos extratos brutos diclorometânico e etanólico foram obtidos de acordo com a metodologia previamente descrita, sendo posteriormente ressuspensos em 500 ml de uma mistura de hexano-(acetonitrila-água 20%) (1:3) resultando nas respectivas frações, hexânica e acetonitrila-água. A fase hexânica foi submetida à evaporação a vácuo, sob temperatura de 40 °C e a fase acetonitrila-água foi tratada com cloreto de sódio, possibilitando assim, a separação das fases aquosa e acetonitrílica, que foram evaporadas, fornecendo as respectivas frações. Foram obtidos 2,4, 5,1 e 3,1 g, das frações hexânica, acetonitrílica e aquosa, respectivamente. Estes procedimentos estão descritos no esquema 3.



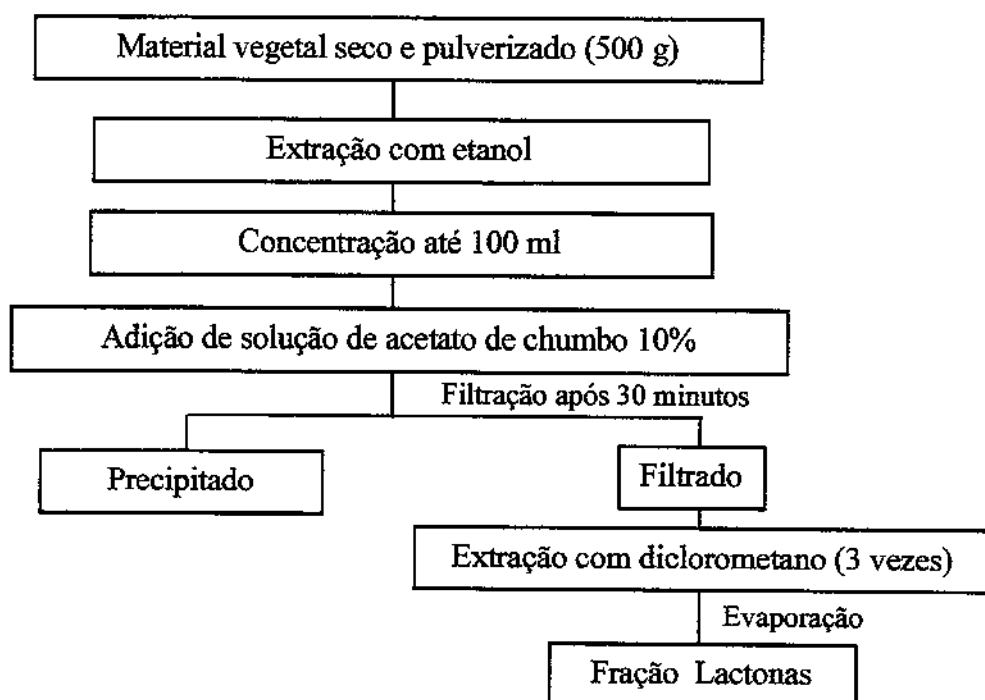
ESQUEMA 3. Obtenção das frações hexânica, acetonitrílica e aquosa a partir dos extratos brutos etanólico e diclorometânico das partes aéreas de *Artemisia annua*

5.2.4. Obtenção da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas a partir do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua*

Esta fração foi obtida de acordo com a metodologia descrita por Lonergan *et al.*, 1992.

O filtrado resultante da maceração de 500 gramas de folhas com dois litros de etanol (3 vezes), foi concentrado até um volume de 100 ml. Posteriormente, foi adicionado 1 litro de solução de acetato de chumbo 10%, para que ocorresse a precipitação de clorofila e substâncias graxas. Após um período de 12 horas em geladeira, sob temperatura de 4° C, foi realizada uma filtração sobre 35 g de terra

diatomita (Celite®). O resíduo foi descartado e a fase aquosa (filtrado) resultante foi extraída por três vezes sucessivas com 1 litro de diclorometano. Após separação das fases em funil, a fração diclorometânica foi evaporada até secura, a vácuo, sob temperatura de 40°C, fornecendo a denominada fração lactonas, na quantidade de 2,5 g. Estes procedimentos estão descritos no esquema 4.

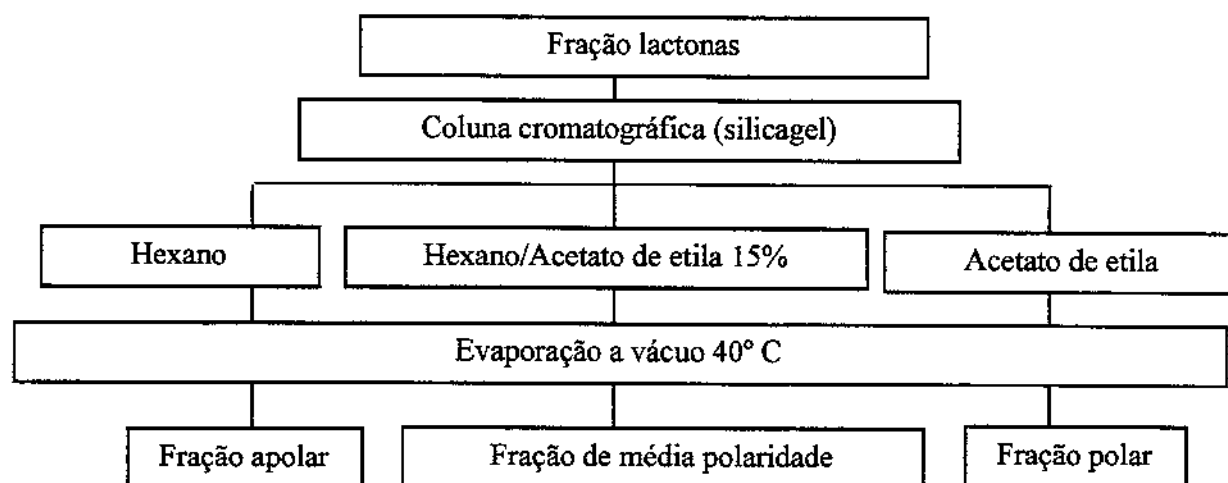


ESQUEMA 4: Obtenção da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas a partir do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua*

5.2.5. Purificação da fração lactonas

A fração lactonas (2,5 g) foi submetida a um processo de purificação através de coluna cromatográfica filtrante, contendo 5 g de silicagel como fase estacionária. Esta coluna foi eluída com solventes de gradientes crescentes de polaridade. Foram obtidas três frações distintas denominadas apolar (0,6 g), de média polaridade (1,0 g) e polar (0,9 g), de acordo com a ordem dos solventes utilizados na eluição da coluna, ou seja,

hexano (100 ml), hexano/acetato de etila 10% (100 ml) e acetato de etila puro (200 ml). Estes procedimentos estão descritos no esquema 5.



ESQUEMA 5: Purificação da fração lactonas

5.2.6. Análise cromatográfica

5.2.6.1. Cromatografia em camada delgada

Foram utilizados reagentes e solventes p.a. das marcas Aldrich, Carlo Erba, Fischer, Fluka e Merck

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

5.2.6.2. Análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

As frações e substâncias puras foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detetor de massas (CG Hewlett Packard 5890, série II, diretamente acoplado a um detetor seletivo de massa Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30m x 0,25 mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). Nas análises das amostras, foram coinjetados n-alcenos de cadeia linear para o cálculo do índice de retenção de van den Dool & Kratz, 1967. As condições de análise para lactonas sesquiterpênicas foram: temperatura de injeção: 250°C; temperatura do detetor: 300°C; programa de temperatura: 40(2 min)-240°C, 5°C/min, 240-300°C, 10°C/min; com ou sem razão de split 1:100 (dependendo da concentração da amostra); gás de arraste He 0,7 bar, 1ml/min; volume da amostra 1-2 µl.

5.3. Testes de atividade farmacológica

5.3.1. 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.

5.3.2 Úlcera induzida por indometacina

Neste experimento, foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de aproximadamente 7 animais. Após

um período de 24 horas em jejum, com acesso livre à água, cada grupo de animais recebeu por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina (10 ml/kg) como controle negativo, cimetidina (100 mg/kg), como controle positivo e o extrato vegetal. Após 30 minutos, foi feita a administração subcutânea de indometacina na dose de 30 mg/kg, segundo a metodologia descrita por Morimoto *et al.*, 1991. Decorridas 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9% para contagem e avaliação das lesões produzidas. O índice de lesões ulcerativas foi calculado por meio da somatória dos parâmetros abaixo, de acordo com o esquema descrito por Gamberini *et al.*, 1991.

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

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

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

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

5.3.3. Úlcera induzida por etanol

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

5.3.4. Úlcera induzida por reserpina

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g. Após um período de 24 horas em jejum, com acesso livre à água, cada grupo de animais recebeu por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina (10 ml/kg) como controle negativo, atropina (10 mg/kg), como controle positivo e o extrato vegetal. Após 30 minutos, foi realizada a administração intraperitoneal de reserpina na dose de 10 mg/kg, segundo a metodologia modificada de Gupta *et al.*, 1974. Decorridas 20 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9% para posterior contagem e avaliação das lesões ulcerativas. O índice de lesões ulcerativas foi calculado de acordo com o esquema descrito por Gamberini *et al.*, 1991.

5.3.5. Úlcera induzida por estresse

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água. Cada grupo de animais recebeu inicialmente, por via oral, o respectivo tratamento, ou seja salina 0,9% (10 ml/kg), como controle negativo, carbenoxolona (200 mg/kg), como controle positivo e o extrato vegetal. Após 30 minutos do tratamento, os animais tiveram as patas dianteiras e traseiras imobilizadas com fitas de esparadrapo e posteriormente foram colocados no interior de contêntores. Estes, foram colocados em câmara fria a uma temperatura de 4° C por 2 horas, segundo a metodologia de Levine *et al*; 1971. Após este período, os animais foram sacrificados, tendo seus estômagos retirados e abertos ao longo da maior curvatura, para avaliação das lesões e posterior determinação do índice de lesões ulcerativas, de acordo com a metodologia descrita por Gamberini *et al.*, 1991.

5.3.6. Estudo da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica

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

5.3.7. Estudo da participação das substâncias sulfidrílicas não proteicas sobre a citoproteção gástrica

Neste ensaio, foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água. Após 30 minutos da administração subcutânea N-etilmaleimida (10 mg/kg), cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento, ou seja, solução salina 0,9% (10 ml/kg) e o extrato vegetal. Após 30 minutos, cada animal recebeu por via oral, 1 ml de etanol absoluto. Ao final de 1 hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9%, para posterior contagem e avaliação das lesões produzidas. O índice de lesões ulcerativas foi então calculado através da metodologia descrita por Gamberini *et al.* 1991.

5.3.8. Estudo da participação do óxido nítrico sobre a citoproteção gástrica

Neste ensaio, foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal variando entre 200 e 250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água. Após 30 minutos da administração endovenosa de L-name na dose de 5 mg/kg, cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento, ou seja, solução salina 0,9% (10 ml/kg) e o extrato vegetal. Após 30 minutos, cada animal recebeu por via oral, 1 ml de etanol absoluto. Ao final de 1 hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9%, para posterior contagem e avaliação das lesões produzidas. O índice de lesões ulcerativas foi então calculado através da metodologia descrita por Gamberini *et al.* 1991.

5.3.9. Ligadura do piloro

Este experimento foi realizado segundo a metodologia de Shay *et al.*, 1945. Após um período de jejum de 24 horas, com fornecimento de água *ad libitum*, camundongos *Swiss*, machos, com peso corporal entre 25 e 30 g, foram anestesiados por intermédio da inalação de éter etílico. Após tricotomia e incisão da parede abdominal, foi realizada a ligadura do piloro com linha cirúrgica de algodão. Logo após a ligadura, cada grupo de animais recebeu por via intraduodenal, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina (2 ml/kg), como controle negativo, cimetidina ou atropina (100 e 10 mg/kg, respectivamente), como controle positivo e o extrato vegetal. O abdômen foi então suturado e após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o abdômen foi reaberto para a retirada do estômago. Foi determinado o volume do conteúdo estomacal, seu pH e a quantidade de íons H^+ (mEq/l/4 h), através de titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1N. Neste modelo experimental, a influência dos extratos e princípios ativos sobre a atividade estimulatória da histamina sobre a secreção ácida foi avaliada, através da administração desta substância, na dose de 25 mg/kg, por via subcutânea, 1 hora após o tratamento por via intraduodenal.

5.3.10. Determinação quantitativa do muco gastroprotetor

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso entre 200-250 g, submetidos a um período de jejum de 24 horas, com livre acesso à água.

Estes animais foram divididos em grupos, de acordo com o respectivo tratamento, ou seja, controle (10 ml/kg), carbenoxolona (200 mg/kg) e amostra a ser testada em dose previamente determinada.

Após 30 minutos do tratamento, feito por via oral, os animais foram submetidos ao processo de indução de úlcera gástrica por imobilização a baixa temperatura (estresse).

Após o sacrifício dos animais, o estômago foi retirado e aberto ao longo da maior curvatura, tendo a região fúndica retirada e descartada.

O corpo glandular do estômago foi pesado e mergulhado em 10 ml de solução de Alcian Blue 0,1% por um período de 2 horas.

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

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

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

5.4. Análise estatística

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

6. Resultados

6.1. Úlcera induzida por indometacina

6.1.1. Frações aquosa e diclorometânica obtidas do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua*

No modelo de úlcera induzida por indometacina, os animais foram tratados com estas frações, por via oral na dose de 500 mg/kg. Somente a fração diclorometânica apresentou atividade antiulcerogênica, reduzindo em 47,1%, o índice de lesões ulcerativas. Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 1 e na tabela 1, como média $\pm$ erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

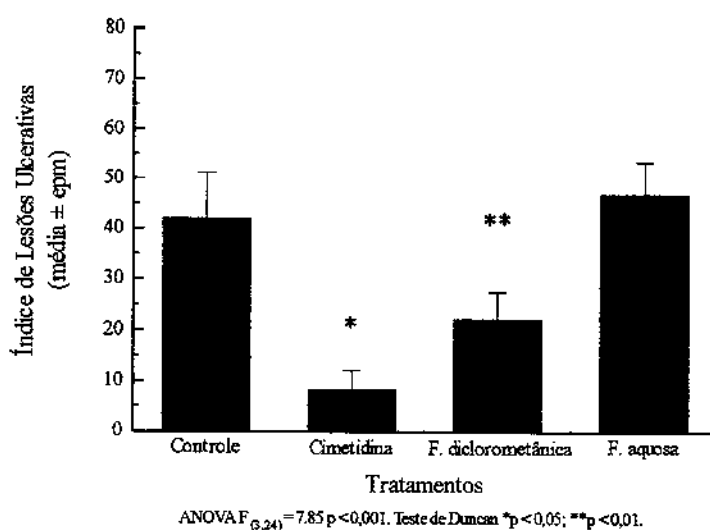


GRÁFICO 1: Efeito da administração oral da cimetidina e das frações aquosa e diclorometânica, obtidas do extrato hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	¹ ILU (média ± epm)	Inibição do ¹ ILU (%)
Controle		7	42,0 ± 9,1	
Cimetidina	100	7	8,4 ± 3,6 **	80,0
F. aquosa	500	8	47,0 ± 6,3	---
F. diclorometânica	500	6	22,2 ± 5,1 *	47,1

ANOVA $F_{(3,24)} = 7,85$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

TABELA 1: Efeito da administração oral da cimetidina e das frações aquosa e diclorometânica, obtidas do extrato hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

¹ILU: Índice de Lesões Ulcerativas

6.1.2. Extrato bruto diclorometânico obtido das raízes de *Artemisia annua*

Com as raízes de *Artemisia annua*, foi obtido um extrato bruto, por meio de maceração direta do material vegetal com diclorometano. Este extrato, quando administrado por via oral na dose de 500 mg/kg, no modelo de úlcera induzida por indometacina, apresentou uma redução de 72,9% do índice de lesões ulcerativas. Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 2 e na tabela 2, como média $\pm$ erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

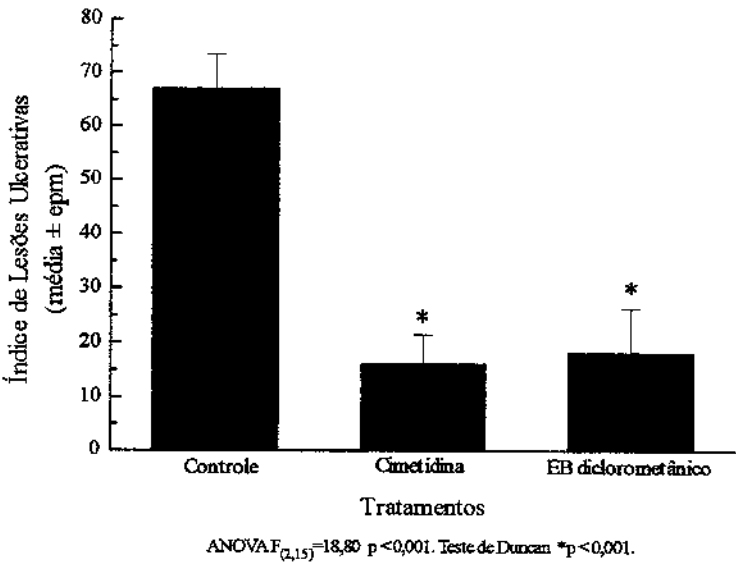


GRÁFICO 2: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média $\pm$ epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		7	67,1 $\pm$ 6,4	
Cimetidina	100	5	16,2 $\pm$ 5,2 *	75,9
EB diclorometânico	500	7	18,2 $\pm$ 8,1 *	72,9

ANOVA $F_{(2,15)} = 18,80$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$.

TABELA 2: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

6.1.3. Extratos brutos etanólico e diclorometânico e respectivas frações, obtidos das partes aéreas de *Artemisia annua*

Com as partes aéreas de *Artemisia annua*, foram obtidos dois extratos brutos, por meio de maceração do material vegetal com etanol e diclorometano, respectivamente. Ambos foram fracionados, fornecendo, cada um deles, três frações distintas, denominadas hexânica, acetonitrílica e aquosa. Estes extratos brutos e suas frações, foram testados por via oral na dose de 500 mg/kg, no modelo de úlcera induzida por indometacina. Os extratos etanólico e diclorometânico apresentaram, respectivamente, 53,8 e 76,7% de inibição do índice de lesões ulcerativas. Das frações obtidas do extrato etanólico, somente a hexânica e a acetonitrílica apresentaram atividade antiulcerogênica, com diminuição do índice de lesões ulcerativas de 39,4 e 71,4%, respectivamente. O mesmo ocorreu com as frações obtidas a partir do extrato diclorometânico, variando apenas a porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas, que foram equivalente a 65,0 e 50,8%, para as frações hexânica e acetonitrílica, respectivamente. Os resultados obtidos com o extrato etanólico e suas frações estão expressos no gráfico 3 e na tabela 3, e aqueles obtidos com o extrato diclorometânico, no gráfico 4 e na tabela 4, respectivamente, como média $\pm$ erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

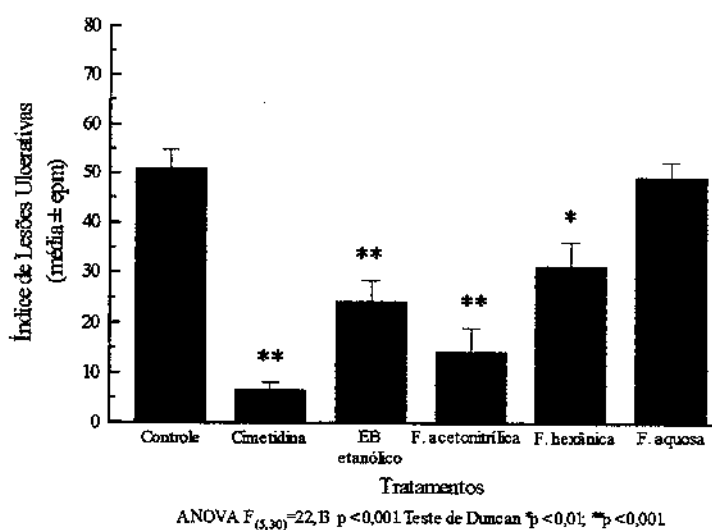


GRÁFICO 3: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto etanólico e suas frações, obtidos das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		6	51,0 ± 3,8	
Cimetidina	100	6	6,6 ± 1,4 **	88,8
EB etanólico	500	6	24,2 ± 4,2 **	53,8
F. acetoneítrilica	500	6	14,3 ± 4,6 **	71,4
F. hexânica	500	6	31,3 ± 4,8 *	39,4
F. aquosa	500	6	49,2 ± 3,1	1,7

ANOVA $F_{(5,30)} = 22,13$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

TABELA 3: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto etanólico e suas frações, obtidos das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

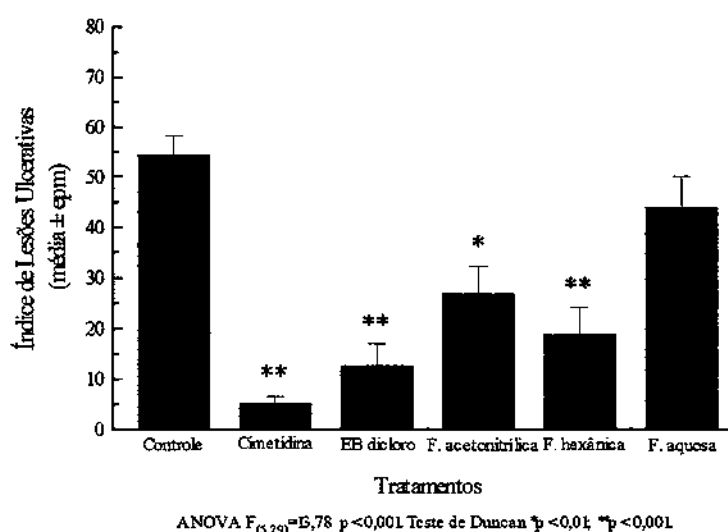


GRÁFICO 4: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto diclorometânico e suas frações, obtidos das partes aéreas de *Artemisia annua* no modelo de úlcera induzida por indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		6	54,5 ± 6,7	
Cimetidina	100	6	5,1 ± 0,5 **	90,6
EB diclorometânico	500	6	12,7 ± 4,0 **	76,7
F. acetonitrílica	500	6	26,8 ± 5,4 *	50,8
F. hexânica	500	6	18,8 ± 5,3 **	65,5
F. aquosa	500	5	44,0 ± 6,0	19,3

ANOVA $F_{(5,29)} = 13,78$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

TABELA 4: Efeito da administração oral da cimetidina e do extrato bruto diclorometânico e suas frações, obtidos das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

6.1.4. Fração lactonas

A fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas, no modelo de úlcera induzida por indometacina, foi administrada por via oral na dose de 500 mg/kg, apresentando 86,0 % de redução no aparecimento de lesões ulcerativas. Os resultados estão expressos no gráfico 5 e na tabela 5, como média ± erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

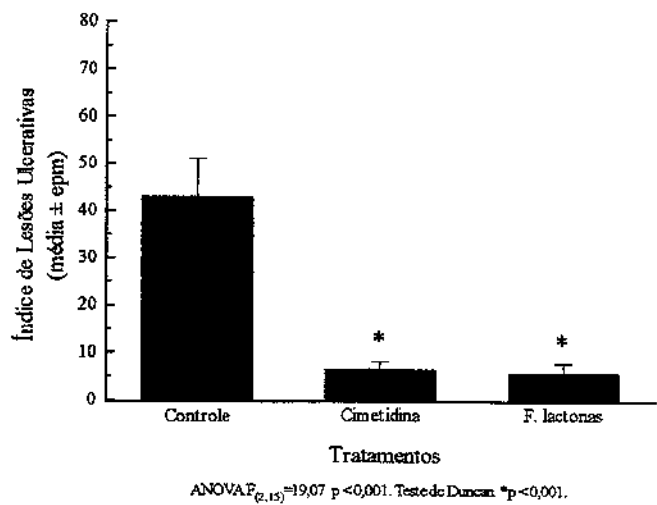


GRÁFICO 5: Efeito da administração oral da cimetidina e da fração lactonas, obtida do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		6	43,2 ± 7,9	
Cimetidina	100	6	6,7 ± 1,6 *	84,5
F. lactonas	500	6	6,0 ± 1,8 *	86,1

ANOVA $F_{(2,15)} = 19,07$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$.

TABELA 5: Efeito da administração oral da cimetidina e da fração lactonas, obtida do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

6.1.5. Frações obtidas da purificação da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas

A fração lactonas foi submetida a um processo de purificação específico, através de coluna cromatográfica. Este procedimento forneceu três novas frações, denominadas apolar, de média polaridade e polar. Quando submetidas ao modelo de úlcera induzida por indometacina, foi observada inibição do índice de lesões ulcerativas nos grupos de animais tratados com as frações apolar e de média polaridade e polar. As porcentagens de inibição foram de 88,1 e 57,7 e 31,1 %, respectivamente. Os resultados estão expressos no gráfico 6 e na tabela 6, como média $\pm$ erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

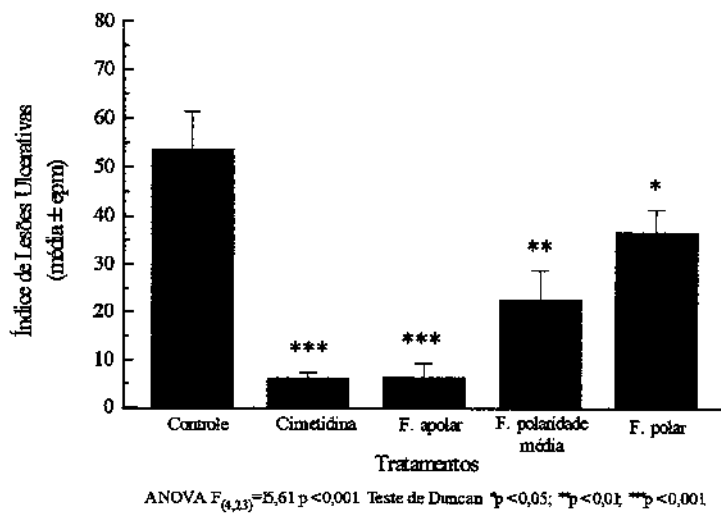


GRÁFICO 6: Efeito da administração oral da cimetidina e das frações apolar, de média polaridade e polar, obtidas a partir da fração lactonas das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		6	53,7 ± 7,7	
Cimetidina	100	6	6,3 ± 1,0 ***	88,3
F. apolar	500	5	6,4 ± 2,9 ***	88,1
F. polaridade média	500	6	22,7 ± 6,2 **	57,7
F. polar	500	5	37,0 ± 14,4 *	31,1

ANOVA $F_{(4,23)} = 15,61$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$.

TABELA 6: Efeito da administração oral da cimetidina e das frações apolar, de média polaridade e polar, obtidas a partir da fração lactonas das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por indometacina

6.1.6. Fração flavonoídica e substâncias isoladas das partes aéreas de *Artemisia annua*

Das partes aéreas de *Artemisia annua*, foi obtida uma fração enriquecida em flavonóides, através de projetos de pesquisa já existentes no CPQBA/UNICAMP. Esta fração, quando submetida ao modelo de úlcera induzida por indometacina, não apresentou atividade antiulcerogênica. Os compostos majoritários presentes, a dose e a via de administração utilizadas no experimento, estão representados na tabela 7.

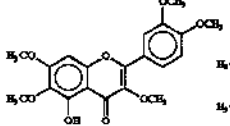
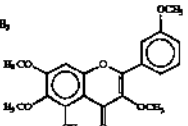
Fração	Dose (mg/kg)	Flavonóides identificados	Via de administração
Flavonoídica	500	 artemetina  3,6,7,3' tetra- o - -5 - hidroxiflavona	oral

TABELA 7: Principais substâncias isoladas da fração flavonoídica, obtida das partes aéreas de *Artemisia annua*, sem atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por indometacina

Algumas substâncias também isoladas das partes aéreas da espécie, como a artemisinina, a artenuína B, o ácido artemisinínico, o α -copaeno e o β -sitosterol, foram submetidos ao modelo de úlcera induzida por indometacina, não apresentando, também, atividade antiulcerogênica. Estas substâncias foram obtidas através de outros projetos de pesquisa do CPQBA/UNICAMP. As estruturas químicas, as doses e as vias de administração utilizadas nos experimentos estão representados na tabela 8.

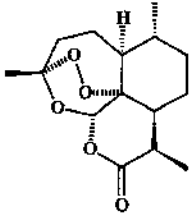
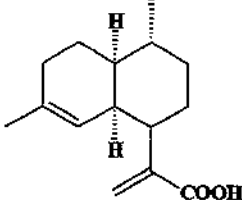
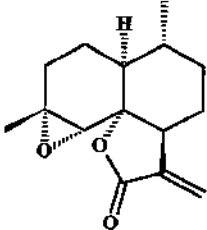
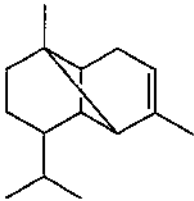
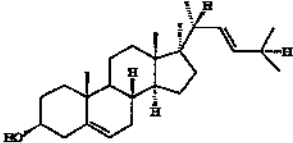
Substância	Estrutura molecular	Classe química	Dose (mg/kg)	Via de administração
Artemisinina		lactona sesquiterpênica	200	oral
Ácido artemisinínico		sesquiterpeno	200	oral
Artenuína B		lactona sesquiterpênica	100	intraperitoneal
α copaeno		sesquiterpeno	200	oral
β sitosterol		esteróide	200	oral

TABELA 8: Substâncias isoladas das partes aéreas de *Artemisia annua*, sem atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por indometacina

6.2. Úlcera induzida por reserpina

6.2.1. Fração diclorometânica obtida do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua*

Esta fração, administrada por via oral na dose de 500 mg/kg no modelo de úlcera induzida por reserpina, reduziu o índice de lesões ulcerativas em 47,1%. A atropina, droga padrão utilizada para prevenir o aparecimento das úlceras provocado pela reserpina, apresentou redução do índice de lesões ulcerativas equivalente a 62,3%. Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 7 e na tabela 9, como média $\pm$ erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

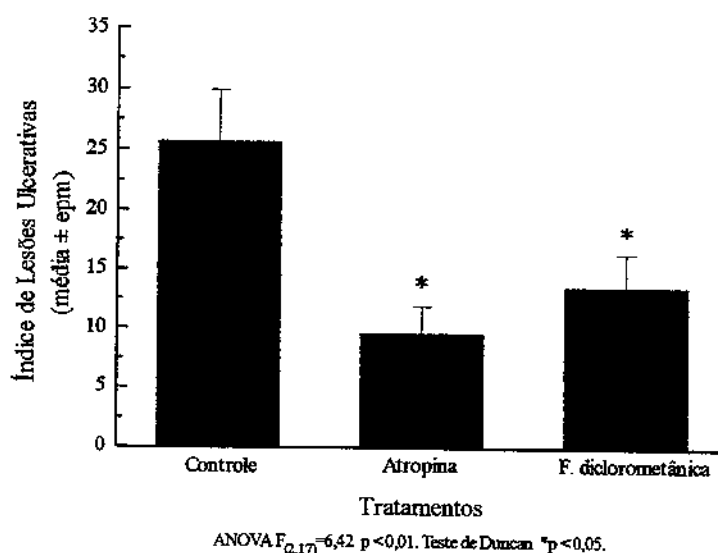


GRÁFICO 7: Efeito da administração oral da fração diclorometânica, obtida do extrato hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua* e da atropina no modelo de úlcera induzida por reserpina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		7	25,7 ± 4,2	
Atropina	10	6	9,6 ± 2,3 *	62,6
F. diclorometânica	500	7	13,6 ± 2,8 *	47,1

ANOVA $F_{(2,17)} = 6,42$ $p < 0,01$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$.

TABELA 9: Efeito da administração oral da fração diclorometânica, obtida do extrato hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua* no modelo de úlcera induzida por reserpina

6.3. Úlcera induzida por estresse

6.3.1. Fração de polaridade média obtida a partir da fração lactonas

Esta fração, no modelo de úlcera induzida por estresse, com imobilização à baixa temperatura, produziu uma inibição do índice de lesões ulcerativas de 29,4%. Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 8 e na tabela 10, como média ± erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

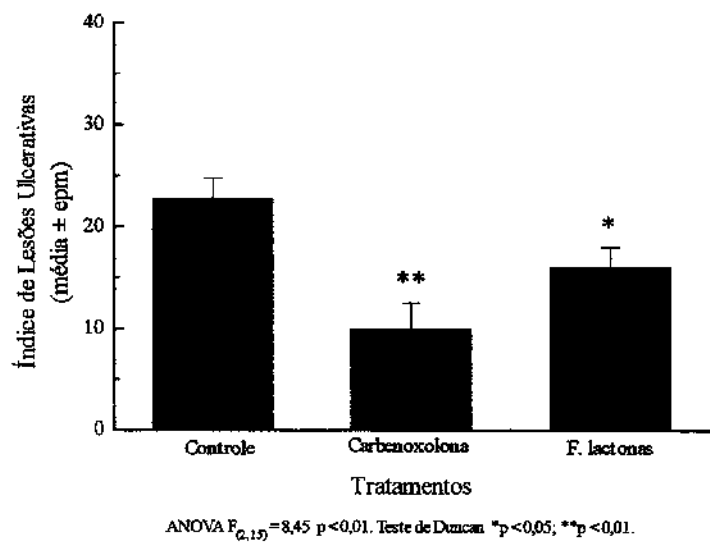


GRÁFICO 8: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da fração lactonas, obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua* no modelo de úlcera induzida por estresse

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		6	22,8 ± 1,9	
Carbenoxolona	200	6	10,0 ± 2,5 **	56,1
F. lactonas	100	6	16,1 ± 1,9 *	29,4

ANOVA $F_{(2,17)} = 6,42$ $p < 0,01$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$.

TABELA 10: Efeito da administração oral da carbenoxolona e da fração lactonas, obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por estresse

6.4. Úlcera induzida por etanol

6.4.1. Fração diclorometânica obtida do extrato bruto hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua*

Esta fração, administrada na dose de 500 mg/kg, por via oral, reduziu o índice de lesões ulcerativas em 89,3%, enquanto que a cisteamina, droga padrão utilizada neste experimento, apresentou 92,1%. Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 9 e na tabela 11, como média ± erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

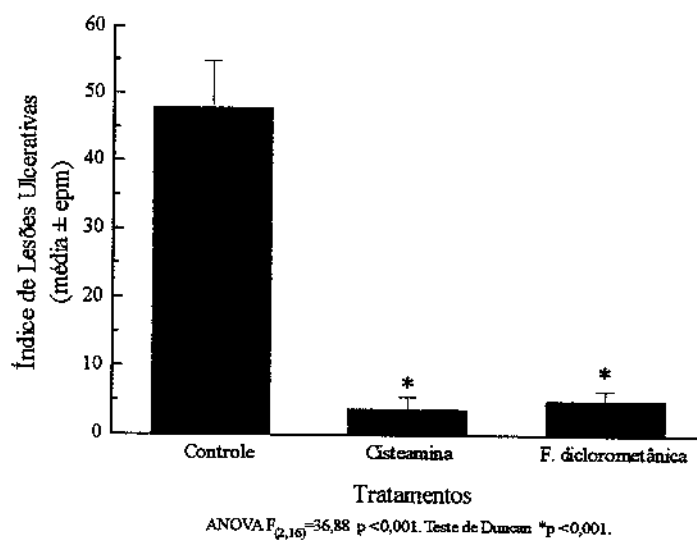


GRÁFICO 9: Efeito da administração oral da fração diclorometânica, obtida do extrato hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua* no modelo de úlcera induzida por etanol

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		6	47,8 ± 7,0	
Cisteamina	100	6	3,8 ± 1,8 *	92,1
F. diclorometânica	500	7	5,1 ± 1,5 *	89,3

ANOVA $F_{(2,16)} = 36,88$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,001$.

TABELA 11: Efeito da administração oral da fração diclorometânica, obtida do extrato hidroalcoólico das raízes de *Artemisia annua* no modelo de úlcera induzida por etanol

6.4.2. Fração lactonas

Esta fração, quando administrada na dose de 500 mg/kg, por via subcutânea, apresentou 59,8% de inibição do índice de lesões ulcerativas. Os resultados obtidos

estão expressos no gráfico 10 e na tabela 12, como média ± erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

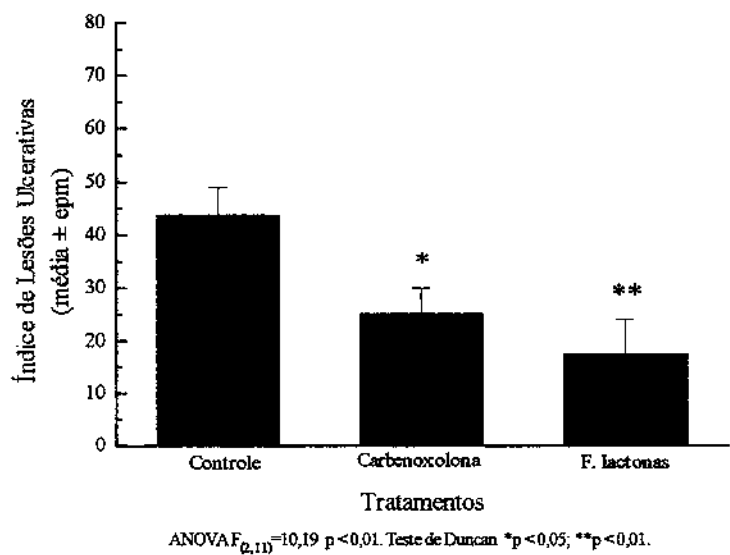


GRÁFICO 10: Efeito da administração subcutânea da fração lactonas, obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua* no modelo de úlcera induzida por etanol

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		5	43,8 ± 5,1	
Carbenoxolona	200	4	25,3 ± 4,7 *	42,2
F. lactonas	500	5	17,6 ± 3,1 **	59,8

ANOVA $F_{(2,11)} = 10,19$ $p < 0,01$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

TABELA 12: Efeito da administração subcutânea da fração lactonas, obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua* no modelo de úlcera induzida por etanol

6.5. Ligadura do piloro

6.5.1. Extrato bruto diclorometânico das raízes de *Artemisia annua*

Este extrato foi administrado por via intraduodenal na dose de 500 mg/kg, para a avaliação de sua atividade sobre a secreção ácida gástrica. Foi utilizado o modelo de ligadura de piloro, com e sem o tratamento prévio dos animais com histamina na dose de 25 mg/kg, por via subcutânea. Não foi observada atividade anti-secretória, pois o volume e a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico dos animais tratados com o extrato bruto diclorometânico não foram alterados. Os resultados estão expressos nas tabelas 13 e 14, respectivamente, como média $\pm$ erro padrão da média do volume de secreção e da concentração hidrogeniônica, para cada grupo de tratamento.

Tratamento	n	Volume de secreção (ml)	H ⁺ (mEq/l/4h)
Controle	4	0,51 $\pm$ 0,06	430,95 $\pm$ 146,70
Histamina	4	0,50 $\pm$ 0,27	912,53 $\pm$ 110,15 *
EB CH ₂ Cl ₂ (sem histamina)	4	0,70 $\pm$ 0,11	680,90 $\pm$ 32,72

Volume: ANOVA $F_{(2,9)} = 0,42$ $p > 0,05$.

H⁺: ANOVA $F_{(2,9)} = 5,01$ $p < 0,05$. Teste de Duncan * $p < 0,05$.

TABELA 13: Efeito da administração intraduodenal do extrato bruto diclorometânico (EB CH₂Cl₂), obtido das raízes de *Artemisia annua* sobre a secreção gástrica em modelo de ligadura do piloro

Tratamento	n	Volume de secreção (ml)	H ⁺ (mEq/l/4h)
Controle	4	0,51 ± 0,06	430,95 ± 146,70 *
Controle + Histamina	4	0,50 ± 0,27	912,53 ± 110,15
EB CH ₂ Cl ₂ (com histamina)	4	0,68 ± 0,22	1328,25 ± 185,26

Volume: ANOVA $F_{(2,9)} = 0,22$ $p > 0,05$.

H⁺: ANOVA $F_{(2,9)} = 8,90$ $p < 0,01$. Teste de Duncan * $p < 0,05$.

TABELA 14: Efeito da administração intraduodenal do extrato bruto diclorometânico (EB CH₂Cl₂), obtido das raízes de *Artemisia annua* sobre a secreção gástrica no modelo de ligadura do piloro em animais pré tratados com histamina

6.6. Estudo da influência do óxido nítrico sobre a citoproteção gástrica

6.6.1. Fração de polaridade média

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia dos animais com L-name na dose de 5 mg/kg por via endovenosa, a fração de polaridade média, obtida da fração lactonas, manteve sua atividade antiulcerogênica apresentada anteriormente sem a administração desta substância, inibindo o índice de lesões ulcerativas em 87,1%. Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 11 e na tabela 15, como média ± erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

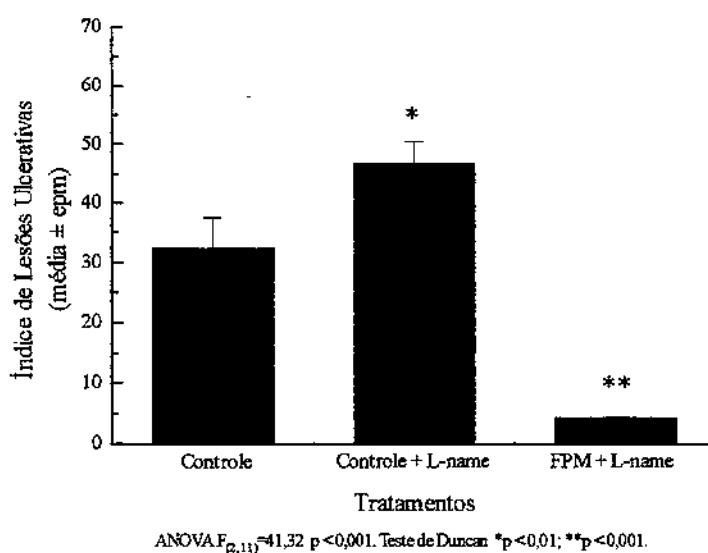


GRÁFICO 11: Efeito da administração oral da fração de polaridade média (FPM), obtida da purificação da fração lactonas das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com administração prévia de L-name

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		4	32,5 ± 4,9	
FPM + ¹ L-name	100	6	4,2 ± 0,3 **	87,1
Controle + L-name		4	46,8 ± 3,7 *	---

ANOVA $F_{(2,11)} = 41,32$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

TABELA 15: Efeito da administração oral da fração de polaridade média (FPM), obtida da purificação da fração lactonas das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com administração prévia de L-name

¹L-name: N ω - nitro - L - arginine methyl ester

6.7. Estudo da influência dos grupos sulfidrila não proteicos sobre a citoproteção gástrica

6.7.1. Extrato bruto diclorometânico das raízes de *Artemisia annua*

Este extrato bruto, no modelo de úlcera induzida por etanol com administração prévia de N-etilmaleimida, apresentou atividade antiulcerogênica inibindo o índice de lesões ulcerativas em 83,6%. Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 12 e na tabela 16, como média ± erro padrão da média para cada grupo de tratamento.

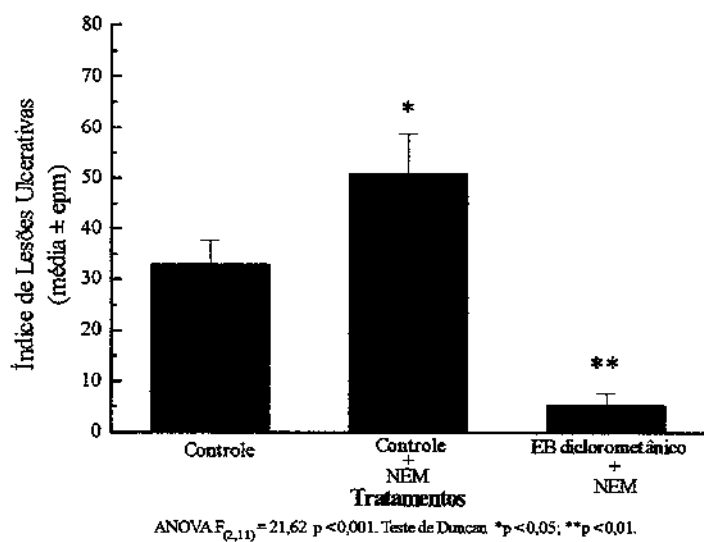


GRÁFICO 12: Efeito da administração oral do extrato bruto diclorometânico obtido, das raízes de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com a administração prévia de N-etilmaleimida (NEM)

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média ± epm)	Inibição do ILU (%)
Controle		5	33,0 ± 4,6	
EB CH ₂ Cl ₂ + NEM	500	5	5,4 ± 2,2 **	96,3
Controle + NEM		4	51,0 ± 7,7 *	

ANOVA F_(2,11) = 21,62 p < 0,001. Teste de Duncan: *p < 0,05; **p < 0,01.

TABELA 16: Efeito da administração oral do extrato bruto diclorometânico, obtido das raízes de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com a administração prévia de N-etilmaleimida (NEM)

6.8. Estudo da influência das prostaglandinas sobre a citoproteção gástrica

6.8.1. Extrato bruto diclorometânico das raízes e fração de polaridade média, obtida da fração lactonas, das partes aéreas de *Artemisia annua*

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, a administração oral do extrato bruto diclorometânico obtido das raízes na dose de 250 mg/kg a fração de média polaridade na dose de 100 mg/kg, obtida da fração lactonas das partes aéreas de *Artemisia annua*, diminuíram o índice de lesões ulcerativas em 84,0 e 71,2%, respectivamente. Neste mesmo modelo experimental, porém com administração prévia dos animais com indometacina na dose 5 mg/kg, por via intraperitoneal, o extrato bruto diclorometânico e a fração de média polaridade não mais apresentaram a atividade antiulcerogênica apresentada anteriormente. Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 13 e na tabela 17, respectivamente, como média ± erro padrão da média do índice de lesões ulcerativas, para cada grupo de tratamento.

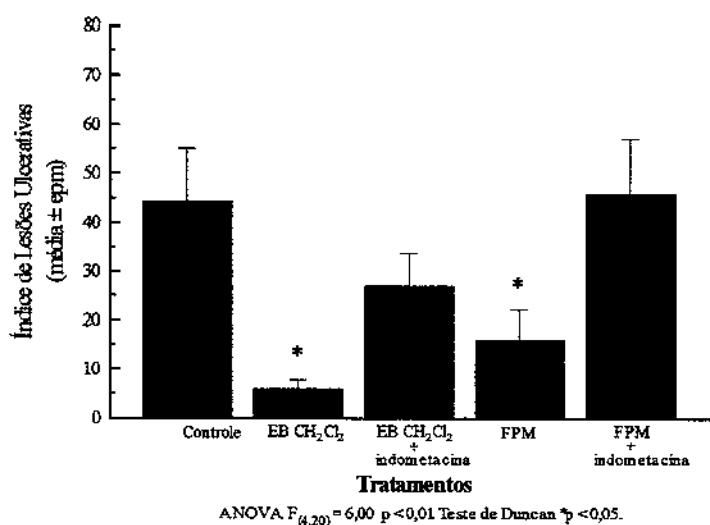


GRÁFICO 13: Efeito da administração oral do extrato bruto diclorometânico (EB CH_2Cl_2), obtido das raízes e da fração de polaridade média (FPM), obtida da fração lactonas, das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com e sem a administração prévia de indometacina

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	ILU (média $\pm$ epm)	Inibição do ILU (%)
EB diclorometânico	250	5	6,0 $\pm$ 1,8 *	86,5
EB CH_2Cl_2 + indometacina	250	6	27,0 $\pm$ 6,7	39,2
FPM	100	5	16,0 $\pm$ 6,2 *	64,0
FPM + indometacina	100	4	46,0 $\pm$ 11,1	---
Controle		5	44,4 $\pm$ 10,7	

ANOVA $F_{(4,20)} = 6,00$ $p < 0,01$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$.

TABELA 17: Efeito da administração oral do extrato bruto diclorometânico (EB CH_2Cl_2), obtido das raízes e da fração de polaridade média (FPM), obtida da fração lactonas, das partes aéreas de *Artemisia annua*, no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com e sem a administração prévia de indometacina

6.9. Determinação quantitativa do muco protetor aderido à mucosa gástrica

6.9.1 Fração de polaridade média obtida das fração lactonas das partes aéreas de *Artemisia annua*

A fração de média polaridade, no modelo de úlcera induzida por estresse, produziu um aumento de 46,7% na quantidade de muco protetor aderido à parede gástrica. A carbenoxolona, produziu um aumento de 57,2%. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 18, como média ± erro padrão da média da quantidade de Alcian Blue complexada ao muco, para cada grupo de tratamento.

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	Quantidade de muco (µg Alcian Blue / g tecido)	Aumento do muco (%)
Controle		5	370,0 ± 16,0	
Carbenoxolona	200	4	581,8 ± 61,0 *	57,2
FPM	100	6	542,8 ± 48,0 *	46,7

ANOVA $F_{(2,12)} = 5,19$ $p < 0,05$. Teste de Duncan * $p < 0,05$.

TABELA 18: Efeito da administração oral da fração de média polaridade, obtida da fração lactonas das partes aéreas de *Artemisia annua*, na produção de muco protetor aderido à mucosa gástrica

6.10. Análise cromatográfica dos extratos brutos e frações com atividade antiulcerogênica

Os extratos brutos diclorometânico e etanólico e a fração acetonitrílica, obtida do fracionamento deste último, todos obtidos das partes aéreas de *Artemisia annua*, foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Na análise dos três cromatogramas obtidos, foi observada a presença de compostos coincidentes na faixa de tempo de retenção de 15 a 30 minutos. A espectrometria de massas revelou a presença de duas lactonas sesquiterpênicas, a artemisinina e a artenuína-b e de um sesquiterpeno, o ácido artemisinínico, nesta faixa de tempo de retenção. Os cromatogramas e a indicação da localização destas três substâncias estão representados nas figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

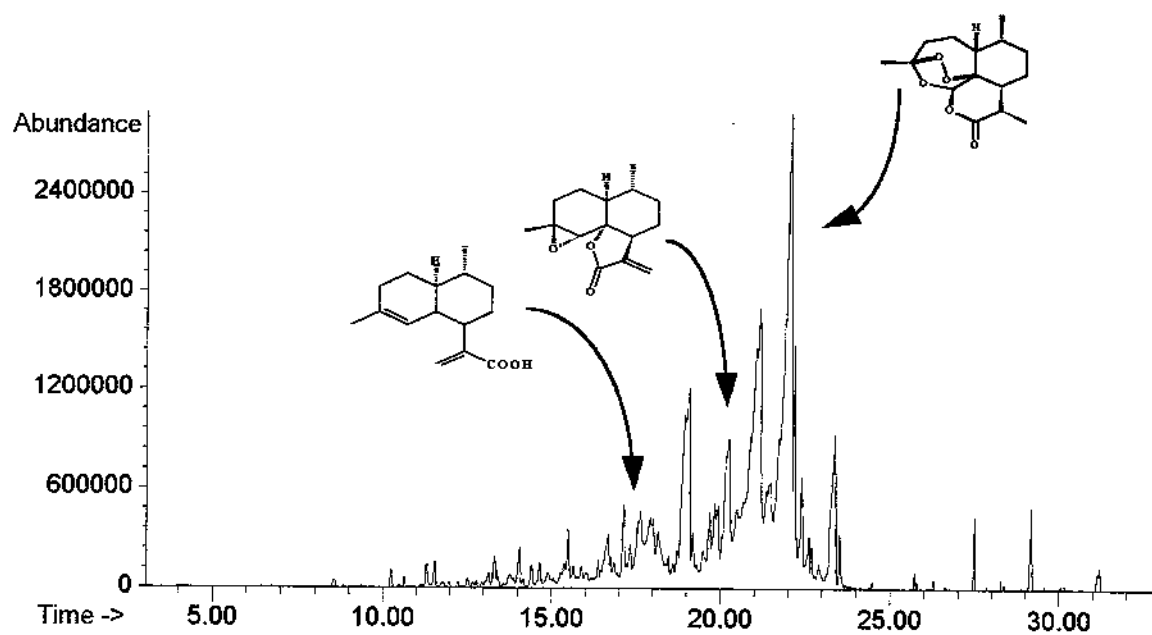


FIGURA 2: Perfil cromatográfico do extrato bruto diclorometânico obtido das partes aéreas de *Artemisia annua*

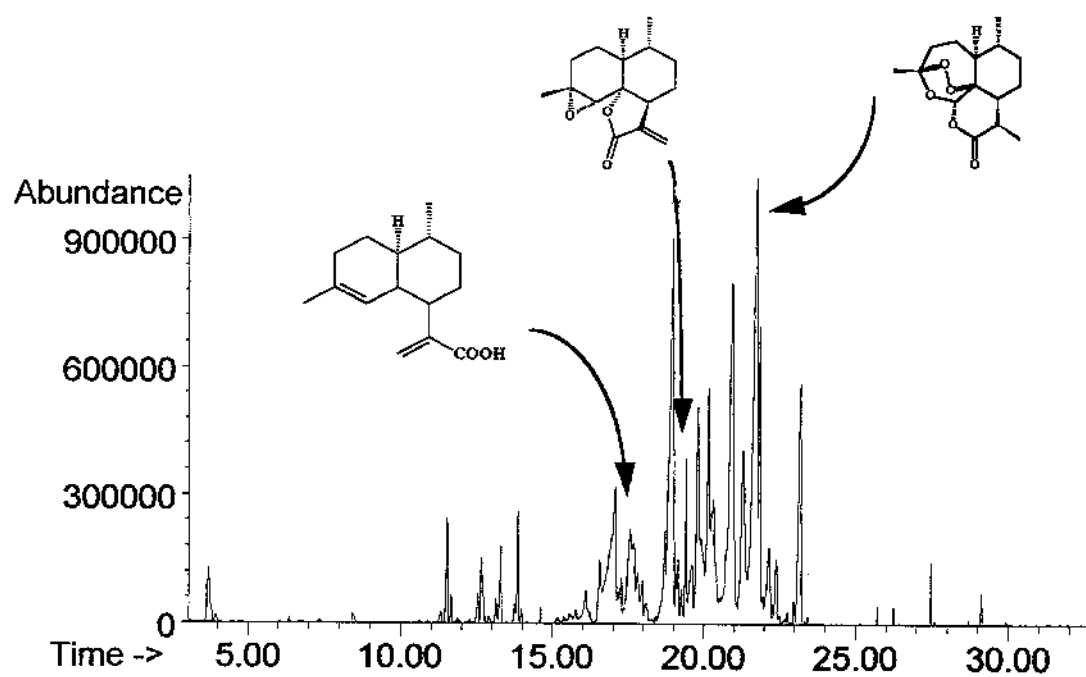


FIGURA 3: Perfil cromatográfico do extrato bruto etanólico obtido das partes aéreas de *Artemisia annua*

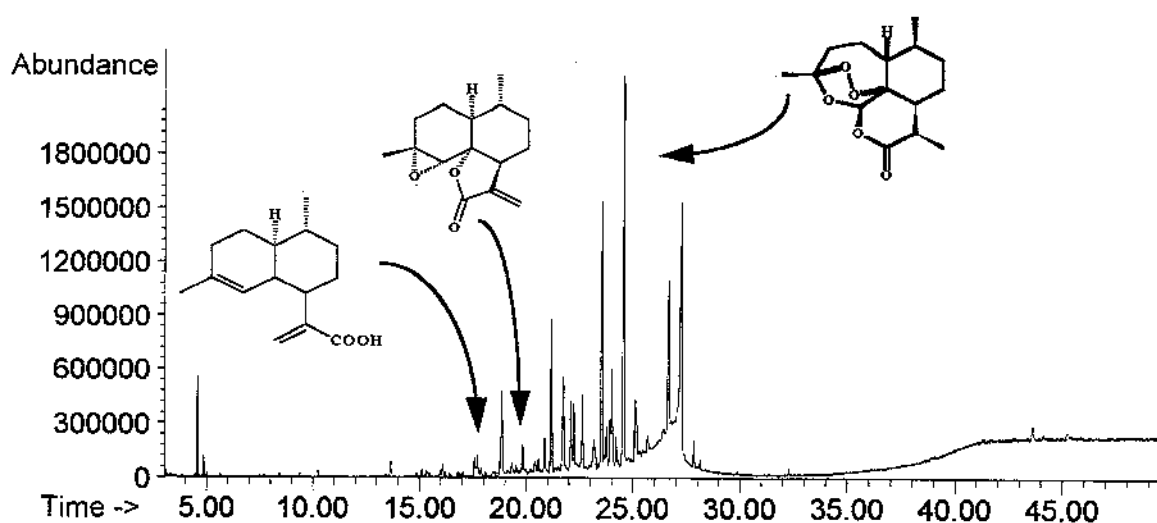


FIGURA 4: Perfil cromatográfico da fração acetonitrílica obtida a partir do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Artemisia annua*

A fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas e a fração de média polaridade, obtida do fracionamento desta última, também foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os cromatogramas obtidos e a localização das três substâncias já citadas anteriormente, estão representados nas figuras 5 e 6, respectivamente.

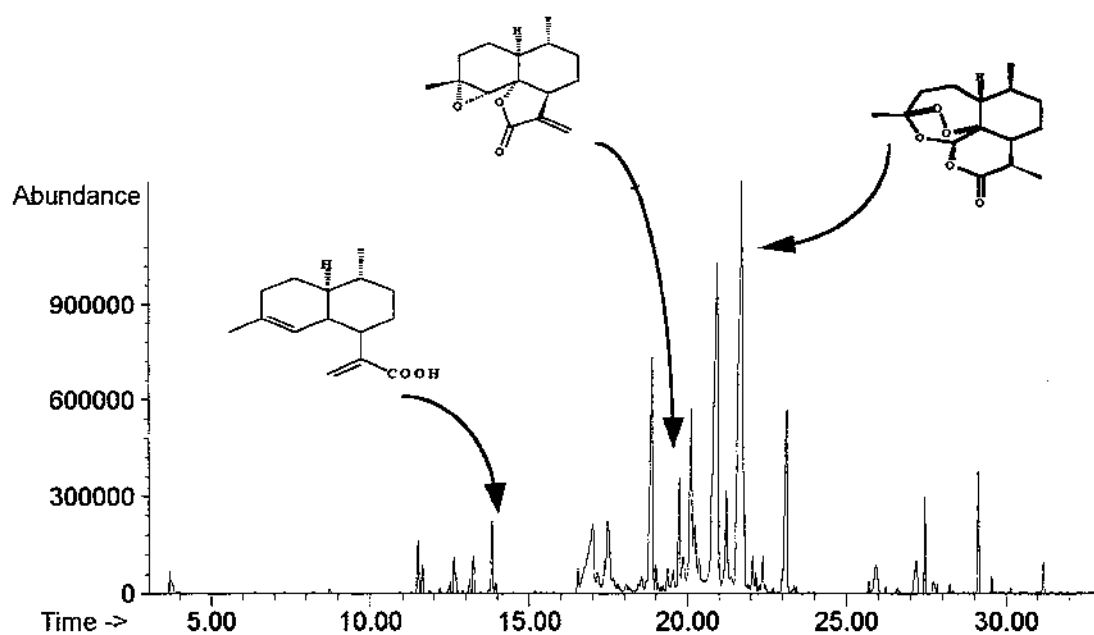


FIGURA 5: Perfil cromatográfico da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas obtida das partes aéreas de *Artemisia annua*

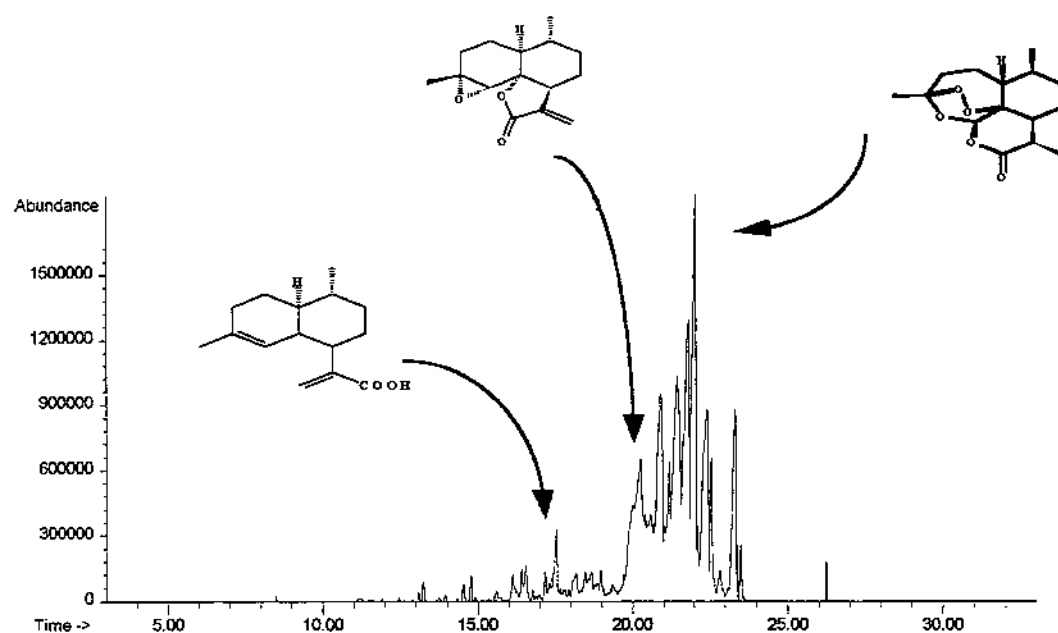


FIGURA 6: Perfil cromatográfico da fração de média polaridade obtida da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas das partes aéreas de *Artemisia annua*

7. Discussão

A úlcera gástrica é uma patologia que atinge grande número de pessoas e sua incidência tem aumentado em função de fatores como o estresse, a ingestão de etanol e drogas antiinflamatórias. Acredita-se que de 5 a 10% de todos os seres humanos desenvolvam esta doença em algum momento de suas vidas (Schiller, 1990).

Alguns trabalhos de pesquisa têm sido realizados no Brasil e em outros países, para a avaliação da atividade antiulcerogênica de espécies vegetais. Dentre estas espécies, podem ser citadas como exemplos, a *Curcuma longa* (Raffatullah, *et al.*, 1990), a *Maytemus ilicifolia* (Souza Formigoni *et al.*, 1991), *Styrax camporum* e *Caesalpineia ferrea* (Bacchi & Sertié, 1994), *Baccharis trimera* (Gamberini *et al.*, 1991), entre outras.

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antiulcerogênica da *Artemisia annua*.

Inicialmente foram avaliados os extratos brutos obtidos das partes aéreas e das raízes desta espécie vegetal. O trabalho com as raízes é bastante interessante sob o ponto de vista fitoquímico, pois estas, além de não apresentarem clorofila, possuem pequena quantidade de substâncias graxas que dificultam o processo de purificação e

Inicialmente foram avaliados os extratos brutos obtidos das partes aéreas e das raízes desta espécie vegetal. O trabalho com as raízes é bastante interessante sob o ponto de vista fitoquímico, pois estas, além de não apresentarem clorofila, possuem pequena quantidade de substâncias graxas que dificultam o processo de purificação e não apresentam interesse farmacológico específico. No início, este trabalho foi conduzido somente com as raízes, mas a pouca disponibilidade deste material motivou sua continuidade com as partes aéreas, que eram mais abundantes.

O extrato bruto diclorometânico, obtido a partir das raízes de *Artemisia annua* apresentou 72,9% de inibição do índice de lesões ulcerativas em modelo de úlcera induzida por indometacina. Esta inibição foi maior que aquela observada, de 47,1%, quando a fração diclorometânica obtida da partição do extrato bruto hidroalcoólico das raízes, foi administrada nas mesmas dose e via, em modelo de úlcera induzida por indometacina. Portanto, a maceração direta do material vegetal com diclorometano foi capaz de extrair maiores quantidades de princípios ativos que o processo de fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico. É provável, portanto, que os princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica apresentem caráter de média polaridade.

Os extratos brutos etanólico e diclorometânico das partes aéreas apresentaram 53,8 e 76,7% de inibição do índice de lesões ulcerativas em modelo de úlcera induzida por indometacina. O extrato bruto diclorometânico foi mais ativo que o etanólico, confirmando a hipótese anterior sugerida pelos resultados obtidos com as raízes, onde os princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica parecem estar localizados em faixas de média polaridade.

Os cromatogramas destes dois extratos, obtidos pela cromatografia gasosa (FIGURAS 2 e 3), foram bastante parecidos qualitativamente, tendo sido observados, em ambos, alguns compostos coincidentes na faixa de 10 a 25 minutos de tempo de retenção. Portanto, o extrato bruto diclorometânico, que foi mais ativo, deve apresentar

os princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica, com maior abundância relativa que o extrato bruto etanólico.

Comparativamente, aos extratos brutos diclorometânicos obtidos com as raízes, aqueles obtidos com as partes aéreas, reproduziram a atividade antiulcerogênica, em modelo de úlcera induzida por indometacina nas mesmas dose e via de administração. Esta observação sugere que o(s) princípio(s) ativo(s) estão presentes em quantidades equivalentes tanto nas raízes, quanto nas partes aéreas.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas dos extratos brutos etanólico e diclorometânico das partes aéreas, revelou a presença de substâncias, cujos espectros de massas, apresentaram perfil característico de lactonas sesquiterpênicas. Entre estas substâncias, foram detectadas a artemisinina e a artenuína B, além de sesquiterpenos, como o ácido artemisinínico, um precursor biossintético da artemisinina na planta. Devido à disponibilidade destes compostos, isolados em outros projetos de pesquisa desenvolvidos no CPQBA/UNICAMP, foi possível avaliar suas atividades em modelo de úlcera induzida por indometacina. A artemisinina e o ácido artemisinínico na dose de 200 mg/kg, administrados por via oral e a artenuína B, na dose de 100 mg/kg, administrada por via intraperitoneal, não apresentaram diminuição do índice de lesões ulcerativas.

Uma outra espécie pertencente ao mesmo gênero, a *Artemisia douglasiana*, apresentou atividade antiulcerogênica em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, um agente necrotizante da mucosa gástrica. Esta atividade foi atribuída à dehidroleucodina, uma das lactonas sesquiterpênicas presentes nesta espécie (Guardia & Guzman, 1994).

Portanto, foram iniciados os procedimentos para fracionamento dos extratos brutos, com o objetivo de determinar as frações e ou princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica da *Artemisia annua*.

As frações provenientes da partição do extrato bruto etanólico das partes aéreas foram administradas na dose de 500 mg/kg por via oral e somente as frações hexânica e

acetonitrílica apresentaram atividade antiulcerogênica, inibindo o índice de lesões em 39,4 e 71,4%, respectivamente. Sob as mesmas condições, as frações hexânica e acetonitrílica, obtidas da partição do extrato bruto diclorometânico apresentaram 65,0 e 50,8% de inibição do índice de lesões ulcerativas. Portanto, apesar do extrato bruto diclorometânico ter sido mais ativo, o fracionamento do extrato etanólico foi mais eficiente na separação dos princípios ativos, pois forneceu a fração acetonitrílica, cuja inibição do índice de lesões ulcerativas de 71,4%, foi a maior observada, dentre as frações citadas acima, em modelo de úlcera induzida por indometacina.

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

Inicialmente, foi averiguada a hipótese de ação anti-secretória da *Artemisia annua*, por meio do modelo de ligadura do piloro em camundongos. Não foram observadas alterações no volume e na concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico dos animais tratados com o extrato bruto diclorometânico das raízes por via intraduodenal na dose de 500 mg/kg. Neste modelo experimental, este extrato foi administrado nas mesmas condições, porém em animais que receberam histamina, 1 hora após o tratamento com o extrato. A histamina é uma substância que aumenta a secreção ácida gástrica por estimular os receptores H_2 presentes na célula parietal (Black *et al.*, 1972). Não foram observadas alterações de volume e concentração hidrogeniônica, sugerindo portanto, que o mecanismo de ação antiulcerogênica do(s) princípio(s) ativo(s) da *Artemisia annua* não envolve fatores que controlam a secreção ácida gástrica. O mecanismo de ação deveria envolver, portanto, aquelas fatores denominados citoprotetores da mucosa gástrica .

Esta hipótese foi reforçada quando a fração diclorometânica, obtida do extrato bruto hidroalcoólico das raízes, foi administrada por via oral em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto. Foi observada uma inibição de 89,3% no índice de lesões ulcerativas. Neste modelo, as drogas que agem por mecanismos anti-secretórios, como a cimetidina, um bloqueador dos receptores histaminérgicos do tipo H₂, não apresentam atividade antiulcerogênica (Bauer *et al.*, 1986)

A fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas também foi submetida ao modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, sendo administrada por via subcutânea na dose de 500 mg/kg. Nestas condições, foi observada uma redução de 59,8% do índice de lesões ulcerativas. Este resultado, obtido com a utilização de uma via parenteral para a administração, foi muito significativo, pois descartou a hipótese de que a atividade antiulcerogênica do(s) princípio(s) ativo(s) da *Artemisia annua* seja devida a um efeito local e inespecífico, denominado citoproteção adaptativa. Isto ocorre devido à capacidade que algumas substâncias, consideradas irritantes moderados da mucosa gástrica, possuem de induzirem a produção de prostaglandinas, substâncias endógenas, de fundamental importância no processo de citoproteção. Alguns estudos em animais demonstraram que a administração oral de etanol diluído, antes da administração do etanol absoluto pela mesma via, protege a mucosa dos animais contra os danos causados por esta substância (Robert *et al.*, 1983). O fato da fração lactonas apresentar atividade quando administrada por via subcutânea reforça a hipótese de que a *Artemisia annua* apresenta uma atividade antiulcerogênica sistêmica, através de mecanismo de ação específico.

Esta mesma fração, em modelo de úlcera induzida por indometacina, promoveu uma inibição de 86% do índice de lesões ulcerativas. Posteriormente, foi realizado o fracionamento desta fração através de coluna cromatográfica, resultando em três outras frações, denominadas, apolar, de média polaridade e polar. Em modelo de úlcera induzida por indometacina, as frações apolar e de média polaridade produziram 88,1 e 57,7% de inibição do índice de lesões ulcerativas. A análise cromatográfica acoplada à

espectrometria de massas da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas e da fração de média polaridade apresentaram alguns compostos coincidentes com tempos de retenção entre 10 e 25 minutos, incluindo a artemisinina, a artenuína B e o ácido artemisinínico, que não apresentaram atividade antiulcerogênica.

A fração diclorometânica, obtida do extrato bruto hidroalcoólico das raízes, foi administrada por via oral na dose de 500 mg/kg em modelo de úlcera induzida por reserpina, apresentando 47,1% de inibição do índice de lesões ulcerativas. Algumas drogas simpatolíticas apresentam atividade antiulcerogênica neste modelo experimental, especialmente os bloqueadores dos receptores α adrenérgicos. Os β bloqueadores, como o propranolol, não apresentam esta atividade. Drogas anticolinérgicas, como a atropina, também apresentam atividade antiulcerogênica neste modelo, pela inibição da secreção ácida gástrica (Gupta *et al.*, 1974). Em virtude do extrato bruto diclorometânico não inibir a secreção ácida, a ação anticolinérgica é pouco provável. Existe ainda a hipótese de mecanismos citoprotetores, pois sabe-se que o aparecimento de lesões induzidas pela reserpina e pelo estresse é acompanhada de uma redução da quantidade de muco protetor gástrico. A produção deste muco é mediada principalmente pelas prostaglandinas. No estômago são encontrados dois tipos de muco, o luminal e o aderido à parede gástrica. O muco luminal é facilmente hidrolisado, não apresentando portanto propriedades protetoras sobre a mucosa. É provável que ele aja somente como lubrificante, protegendo-a contra as forças mecânicas do processo digestivo. Já o muco aderido é uma fina camada na forma de gel, de espessura variada que impede a difusão de íons H^+ para as células da mucosa (Sellers *et al.*, 1986).

Existem diversos mecanismos fisiológicos envolvidos na citoproteção gástrica. Alguns deles foram avaliados com o objetivo de detectar um provável mecanismo de ação antiulcerogênica. Para pesquisa deste mecanismo de ação, seria interessante a utilização da fração apolar, que foi a mais ativa dentre todos os extratos e frações

testados. No entanto, para esta avaliação, foi utilizada a fração de polaridade média, obtida em maior quantidade e o extrato bruto diclorometânico das raízes.

A mucosa gástrica apresenta grandes concentrações de glutathione reduzida, substância sulfidrílica não proteica, que promove citoproteção gástrica por meio de mecanismo pouco conhecido. Sabe-se que a presença de glutathione reduzida na mucosa está intimamente relacionada com a citoproteção gástrica, por impedir um aumento de permeabilidade vascular e ainda por impedir a ação nociva de radicais livres tóxicos para as células da mucosa (Szabo, 1981; Takeuchi *et al.*, 1989). Para avaliar a participação destas substâncias na citoproteção produzida por *Artemisia annua* foi utilizado o modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, em animais tratados previamente pela N-etilmaleimida na dose de 10 mg/kg. Esta substância é capaz de promover a alquilação dos grupos sulfidrílica, inativando-os (Takeuchi *et al.*, 1989). Portanto, caso a *Artemisia annua* apresentasse sua atividade antiulcerogênica por interferir com estes grupamentos sulfidrílica, em animais tratados com a N-etilmaleimida, esta atividade desapareceria. O extrato bruto diclorometânico das raízes, administrado por via oral na dose de 250 mg/kg, em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em animais tratados previamente com a N-etilmaleimida, apresentou atividade antiulcerogênica, diminuindo o índice de lesões ulcerativas em 86,3%. Fica portanto, descartada a hipótese de que o mecanismo de ação antiulcerogênica da *Artemisia annua* esteja relacionado com as substâncias sulfidrílicas não proteicas.

A microvasculatura gástrica é outro alvo para o desenvolvimento de drogas antiulcerogênicas. O óxido nítrico pode induzir citoproteção gástrica por promover vasodilatação e conseqüentemente aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa. Este aumento de fluxo sanguíneo acaba por acelerar a retirada de íons hidrogênio do contato direto com a mucosa, além de aumentar a oferta de nutrientes para a mesma. Para a avaliação da participação do óxido nítrico sobre a citoproteção gástrica produzida por *Artemisia annua* foi utilizado o modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com a administração prévia de L-name, na dose de 5 mg/kg por via endovenosa. Esta

substância é um inibidor da NO-sintase, enzima responsável pelo processo de síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina (Konturek *et al.*, 1995). Nestas condições, a fração de média polaridade obtida a partir da purificação da fração enriquecida em lactonas sesquiterpênicas, manteve sua atividade antiulcerogênica, inibindo o índice de lesões ulcerativas em 87,1%. Este resultado descarta a hipótese de que os princípios ativos antiulcerogênicos de *Artemisia annua* interfiram com a síntese de óxido nítrico. Outra possibilidade seria a presença nos extratos, de alguma substância que pudesse funcionar como doadora de NO. Algumas substâncias apresentam esta característica, tendo surgido recentemente o nitrofenac, antiinflamatório não esteroideal, que auxilia no tratamento de úlceras gástricas, justamente por funcionar como doador de NO (Elliot *et al.*, 1995). A análise preliminar dos espectros de massas dos componentes majoritários dos extratos e frações ativos não revelou a presença de íon molecular ímpar, que seria uma indicação da presença de átomo de nitrogênio na molécula (Silverstein, 1981). Portanto, a hipótese da presença de algum princípio ativo capaz de promover a doação de NO, tornou-se pouco provável.

As prostaglandinas são a classe de substâncias mais importantes no processo de citoproteção. Para avaliação da atividade da *Artemisia annua* sobre os níveis de prostaglandinas na mucosa gástrica, foi utilizado o modelo de úlcera induzida por etanol absoluto com a administração prévia de indometacina. A indometacina é um antiinflamatório do tipo não esteroideal, que inibe a enzima ciclooxigenase, responsável pela etapa final da síntese de prostaglandinas. Na dose de 5 mg/kg, não produz ulceração por si própria, mas potencializa aquelas causadas pelo etanol absoluto (Konturek *et al.*, 1995). Nestas condições, a fração de polaridade média e o extrato bruto diclorometânico perderam a atividade antiulcerogênica observada no grupo de animais que não receberam o tratamento prévio com indometacina. Este resultado sugere que o mecanismo de ação antiulcerogênica desta fração está relacionado com o aumento da síntese de prostaglandinas. As prostaglandinas aumentam a produção do

muco aderido à mucosa e também a de bicarbonato, que participa na neutralização do ácido gástrico, além de aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica.

A confirmação do envolvimento das prostaglandinas no mecanismo de ação do(s) princípio(s) ativo(s) da *Artemisia annua* foi realizada através da quantificação do muco gástrico em animais tratados com a fração de polaridade média, obtida a partir da fração lactonas. O muco aderido foi quantificado em estômagos de animais submetidos à indução de úlcera por estresse, com imobilização em baixa temperatura. Nestas condições, os animais tratados por via oral com a fração de polaridade média na dose de 100 mg/kg, apresentaram 46,7% de aumento na quantidade de muco protetor, além de 29,4% de inibição do índice de lesões ulcerativas provocadas pelo estresse. Como droga padrão neste modelo experimental, foi utilizada a carbenoxolona, que produziu um aumento de 57,2% na quantidade de muco. Esta substância age aumentando os níveis de prostaglandinas e consequentemente do muco, cuja produção é mediada principalmente pela ação das prostaglandinas (Lewis, 1991).

Os resultados obtidos sugeriram que a *Artemisia annua* possui princípios ativos antiulcerogênicos que atuam através do aumento da atividade ou e ou da quantidade de prostaglandinas na mucosa gástrica.

A análise por espectrometria de massas revelou a presença de substâncias com tempos de retenção entre 10 e 25 minutos em todos os extratos em todos os extratos e frações ativos. Nesta região, são encontrados sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas, que podem ser os responsáveis pelos efeitos observados.

A continuidade deste trabalho, terá como objetivo o isolamento das substâncias presentes nesta região e a identificação daquela(s) responsável(eis) pela atividade antiulcerogênica.

8. Conclusões

Baseado base nos dados obtidos nos experimentos para avaliação da atividade antiulcerogênica do(s) princípio(s) ativo(s) da *Artemisia annua*, concluiu-se que este(s) não interfere(m) com os mecanismos que controlam a secreção ácida gástrica. Seu mecanismo de ação está provavelmente relacionado com os mecanismos de citoproteção da mucosa, especialmente o aumento dos níveis de prostaglandinas.

O(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) pela atividade antiulcerogênica desta espécie, apresentam características de média polaridade e são, provavelmente pertencentes à classe das lactonas sesquiterpênicas.

9. Summary

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

A great number of *Artemisia* species have shown to be a rich source of sesquiterpene lactones. Dehydroleucodine, a sesquiterpene lactone from *A. douglasiana* displayed antiulcer activity. This fact stimulated us to evaluate the antiulcer activity of *A. annua* leading to the identification of an active fraction of the plant extract as well as a probable pharmacological mechanism.

No activity was detected on indomethacin induced ulcer models when treated with an enriched flavonoid fraction or artemisinin, artemisinic acid and artenuin b isolated from *A. annua*.

The resulting aqueous and dichloromethanic fractions from crude ethanolic extract of *A. annua* roots, were administrated orally, on indomethacin induced ulcers in rats. The dichlorometanic fraction revealed antiulcerogenic activity, whereas the aqueous fraction showed none. Antiulcer activity was also present when the former fraction was tested under the same conditions with ethanol and reserpine ulcer models.

Comparison of a crude dichloromethanic extract from roots with that of the resulting dichlorometanic fraction, obtained from hydroalcoholic extract from roots was administrated orally, on indomethacin induced ulcer model, indicating that the former had better activity reducing the ulcerative lesion index (ULI). This suggested that the direct extraction with dichloromethane was more efficient to extract the active principles.

Intraduodenal administration of crude dichloromethanic extract on pyloric ligation model in mice was adopted to evaluate gastric acid secretion activity. This extract did not modify the secretion volume and the hydrogenionic concentration of gastric content with or without the previous treatment of animals with histamine, a substance with known stimulant activity on acid secretion through H₂ receptors stimulation.

From the aerial parts of the plant two types of crude extracts were prepared, an ethanolic and dichloromethanic one. Each crude extract and its respective fractions were administrated orally on indomethacin induced ulcer model. The dichloromethanic extract was more active than the ethanolic extract. On the other hand, only the hexanic and acetonitrilic fractions from both crude extracts presented antiulcerogenic activity.

A fraction enriched in sesquiterpenelactones, from aerial parts of *A. annua* was administrated orally on indomethacin induced ulcer, reducing the ULI. This fraction was partitioned on a chromatographic filtration column containing silicagel as stationary phase. This column was eluted with three different polarity solvents, hexane, hexane: ethyl acetate 15%, ethyl acetate resulting in three fractions, named apolar, medium polarity and polar. When these fractions were administrated orally on indomethacin induced ulcer, only the apolar and medium polarity fractions, inhibited the ULI.

To verify the sulfhydryl group involvement on cytoprotection afforded by crude dichloromethanic extract of *A. annua*, the extract was submitted to ethanol induced ulcer, with previous treatment of N-ethylmaleimide, a known alkylator of sulfhydryl groups. Under these conditions, the extract maintained its antiulcerogenic activity. This suggested that the the sulfhydryl groups were not involved on antiulcerogenic activity.

The participation of nitric oxide was evaluated on ethanol induced ulcer model with previous administration of L-name, an inhibitor of NO-synthase. Under these conditions, the medium polarity fraction presented ULI inhibition, therefore, nitric oxide was not involved on antiulcerogenic activity of *A. annua*.

To evaluate the prostaglandins participation on cytoprotection afforded by *A. annua*, the crude dichloromethanic extract from roots and medium polarity fraction from aerial parts were submitted to ethanol induced ulcer with and without the previous treatment with indomethacin, a drug that inhibit the cyclooxygenase, enzyme involved in prostaglandins synthesis. Without indomethacin, the dichloromethanic extract and medium polarity fraction inhibited the ULI. Whereas with indomethacin, both of them lost their antiulcerogenic activity, suggesting that the probable pharmacological mechanism of *A. annua* is to increase prostaglandin levels of gastric mucosa. This hypothesis was corroborated by the high quantity of adherent mucus observed when medium polarity fraction was orally administrated.

10. Referências bibliográficas

Allen, A., Flemström, G.; Garner, A., Kivilaakso, E. Gastroduodenal mucosal protection. **Physiol. Rev.**, **73**, 823-857, 1993.

Bacchi, E.M. & Sertié, J.A.A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Med.** 60: 118-120, 1994.

Black, J. W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R., Parsons, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. **Nature**, **236**: 385-390, 1972.

- Bauer, R.F., Bianchi, R.G., Casler, J. & Goldstin, B. Comparative mucosal protective properties of misoprostol, cimetidine and sucralfate. **Digestive Diseases and Sciences**. 31 (2): 81S-85S, 1986.
- Corne, S.J., Morrissey, S.M. & Woods, R.J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol. Lond.** 242: 116-117P, 1974.
- Cragg, G.M., Schepartz, S.A., Suffness, M. & Grever, M.R. The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **J. Nat. Prod.** 56: 1657-1668, 1993.
- Ding, G.S. Recent studies on antimalaricals in China: A review of literature since 1980. **International J. Exp. Clin. Chemother.** 1 (2): 9-22, 1988.
- Eberhart, C.E. & Dubois, R.N. Eicosanoides and gastrointestinal tract. **Gastroenterology**. 109: 285-301, 1995.
- Elliot, S.N., McKnight, W., Cirino, G & Wallace, J. L. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**. 109: 524-530, 1995.
- Felix, W.L., Miller, J.C. & Guth, P.H. Dissociated effects of misoprostol on gastric acid secretion and mucosal blood flow. **Digestive Diseases and Sciences**. 31 (2): Suppl. Feb. 86S-90S, 1986.
- Fellows, L.E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: Future prospects. In: Coombes, JD, ed. New drugs from natural sources. London, IBC Technical Services, 1992.
- Gamberini, M.T., Skorupa, L.A., Souccar, C. & Lapa, A.J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, 86: Suppl. II, 137-139, 1991.
- Giordano, O.S., Guerreiro, E., Pestchanker, M.J., Guzman, J.A., Pastor, D. & Guardia, J. **Journal of Natural Products**, 53: 803, 1990.

- Graham, D.Y. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. **Gastroenterology**, 96: 615-625, 1989.
- Gupta, M.B., Tangri, K.K., Bhargava, K.P. Mechanism of ulcerogenic activity of reserpine in albino rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 27: 269-271, 1974.
- Hirschowitz, B.I., Keeling, D., Lewin, M., Okabe, S., Parsons, M., Sewing, K., Wallmark, B. & Sachs, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Digestive Diseases and Sciences**. 40 (2): 3S-23S, 1995.
- Inada, I. & Satoh, H. Capsaicin-sensitive sensory neurons are involved in bicarbonate secretion induced by lansoprazole, a proton pump inhibitor, in rats. **Digestive Diseases and Sciences**. 41 (4): 785-790, 1996.
- Klayman, D.L. **Science** 228: 1049-1055.
- Jahn, C.A. Dissertação de Mestrado Estudo Botânico da *Artemisia amua* L., 1988.
- Konturek, S.J., Brozozowsky, T., Pytko-Polonczyk, J., Drozdowicz, D. Comparison of cholecystokinin, pentagastrin and duodenal oleate in gastroprotection in rats. **Scand. J. Gastroenterology.**, 30(7), 620-630, 1995.
- Konturek, S.J., Pawlik, W. Physiology and pharmacology of prostaglandins. **Digestive Diseases and Sciences**, 31(2), 6S-19S, 1986.
- Levine, R.J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: C.J. Pfeiffer (Ed.), *Peptic Ulcer*, Munksgaard, Copenhagen, pp.92-97, 1971.
- Lewis, D.A., Hanson, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: G.P. Ellis and G.B. West, ed.. *Progress in Medicinal Chemistry* - vol. 28, Elsevier Science Publishers, B.V., pp. 201-231, 1991.
- Lindberg, U.P., Nordberg, U.P., Alminger, T., Brändström, A. & Wallmark, B. The mechanism of action of the gastric acid secretion inhibitor, omeprazole. **J. Med. Chem.**, 29: 1327-1329, 1986.

- Lonergan, G., Routsis, E., Georgiadis, T., Agelis, G., Hondrelis, J., Matsoukas, J., Larsen, L.K. & Caplan, F.R. Isolation. NMR studies and biological activities of onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*. **Journal of Natural Products** 55 (2): 225-228, 1992.
- Meshnick, S.R., Yang, Y., Lima, V., Kuypers, F., Kamchonwongpaisan, S. & Yuthavong, Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (Qinghaosu). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 37 (5): 1108-1114, 1993.
- Monk, J.P., Clissold, S.P. Misoprostol: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. **Drugs**, 33, 1-30, 1987.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S. & Takayuki, S. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japan. J. Pharmacol.** 57: 495-505, 1991.
- Morini, G., Grandi, D., Arcari, M.L. & Bertacini, G. Gastroprotective activity of the novel proton pump inhibitor lansoprazole in the rat. **Gen. Pharmac.** 26 (5): 1021-1025, 1995.
- Rafatullah, S., Tariq, M., Al Yahya, M.A., Mossa, J.S. & Ageel, A.M. Evaluation of Turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J. Ethnopharm.**, 29: 25-34, 1990.
- Robert, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, 77, 761-767, 1979.
- Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Davis, J.P., Field, S.O. & Hanchar, A.J. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptative cytoprotection" mediated by prostaglandins. **Am. J. Physiol.** 245: G113-G121, 1983
- Sachs, G., Carlsson, E., Londberg, P., Wallmark, B. Gastric H⁺, K⁺-ATPase as therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 28, 269-284, 1988.
- Schiller, L.R. Epidemiologia, manifestações clínicas e diagnóstico. In: **Tratado de Medicina Interna**. Ed. Guanabara, 18 ed, Rio de Janeiro, 615-618, 1990.

Schubert, M.L. Regulation of gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, 10: 575-588, 1994.

Sellers, L.A., Carroll, N.J.H., Allen, A. Misoprostol-induced increases in adherent gastric mucus thickness and luminal mucus output. **Digestive Diseases and Sciences**, 31 (2), 91S-95S, 1986.

Sharma, A., Bindra, R.L. & Tewari, R. **CIMAP**, 46: 46-61, 1991.

Shay, H.; Komarov, S.A.; Fels, S.S.; Meranze, D.; Gruenstein, M. & Siplet, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, 5: 43-61, 1945.

Silverstein, R.M., Basdler, G.C. & Morril, T.C. Espectrometria de massas. In__ : - **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ed. Guanabara II, 4-64, 1979.

Smedfors, B., Johansson, C. Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by misoprostol. **Digestive Diseases and Sciences**, 31: (2) 96S-100S, 1986.

Souza Formigoni, M.L.O., Oliveira, M.G.M., Monteiro, M.G., Silveira Filho, N.G., Braz, S. & Carlini, E.A. Antiulcerogenic effects of two Maytenus species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology** 34 (1): 21-28, 1991.

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

Takeuchi, K., Okada, M., Niida, H. & Okabe, S. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 248 (2): 836-841, 1989.

Van den Dool, H. & Kratz, P.J.D. **J. Chrom.** 11: 463-471, 1963.

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