

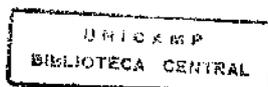
APARECIDA ÉRICA BIGHETTI

---

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO  
BRUTO HIDROALCOÓLICO E DA CUMARINA  
ISOLADA DA *Mikania laevigata* Schultz. Bip.**

---

**CAMPINAS  
1999**



**APARECIDA ÉRICA BIBHETTI**

---

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO  
BRUTO HIDROALCOÓLICO E DA CUMARINA  
ISOLADA DA *Mikania laevigata* Schultz. Bip.**

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  
1999**

UNIDADE	DC
N.º CHAMADA	
V.	Es.
TOMEP. CO.	39097
PREC.	229/99
	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	21/10/99
N.º CPD	

CM-00136420-9

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

B484a Bighetti, Aparecida Érica  
Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico e da  
cumarina isolada da mikania laevigata Schultz. Bip. / Aparecida Érica  
Bighetti. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

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

I. 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. Marcos Dias Fontana

3. Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho

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

Data: 25/06/99

A Deus pela graça de viver e por iluminar-me a cada momento.

Aos meus pais, Clóvis e Márcia, que estiveram presentes em todos os momentos de minha vida e proporcionaram a minha chegada até esta etapa de meu caminhar.  
Amo vocês.

Ao Carlos, pela sua compreensão e carinho.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho,

Obrigada mestre pela acolhida calorosa, pela amizade conquistada ao longo  
deste período e pelo profissionalismo demonstrado.  
Ofereço-lhe este trabalho com todo meu carinho e admiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CPQBA/UNICAMP pelo oferecimento de suas instalações para o desenvolvimento deste trabalho,

Ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela inserção,

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

À Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, pelo desenvolvimento do trabalho fitoquímico, pela disponibilidade e amizade demonstradas,

À Márcia Aparecida Antônio, pelo seu apoio, seu afeto e intensa colaboração na execução deste trabalho,

À Ana Possenti, pela colaboração na realização dos experimentos e sua amizade,

À Patrícia Corrêa Dias, pela preciosa ajuda e amizade,

Aos amigos estimados da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, Luciana Konecny Kohn, José Ricardo Domingues, Carina Denny, Maria Carolina B. Leme Oliveira, Débora C. Fachim Nogueira, que de uma forma ou outra contribuíram para a execução deste trabalho,

À Dra. Mary Ann Foglio, pela convivência amável e amizade,

À Helen S. Moreira, pela colaboração na obtenção do extrato e da substância isolada,

À Vanderley Ç. Claro e Gislaine E. Alípio, secretários do Curso de Pós Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela disposição e atenção.

*“No meio do caminho tinha uma pedra  
tinha uma pedra no meio do caminho  
tinha uma pedra  
no meio do caminho tinha uma pedra.*

*Nunca me esquecerei desse acontecimento  
na vida de minhas retinas tão fatigadas.  
Nunca me esquecerei que no meio do caminho  
tinha uma pedra  
tinha uma pedra no meio do caminho  
no meio do caminho tinha uma pedra.”*

*(CARLOS DRUMMOND DE ANDRADE)*

## LISTA DAS FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Substâncias isoladas de <i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i> .....	11
FIGURA 2: Exemplar de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. cultivado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).....	14
FIGURA 3: Etapas envolvidas na preparação do EB e purificação da cumarina.....	43
FIGURA 4: Estruturas moleculares da cumarina e da diidro-cumarina presentes no EB de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip.....	45
FIGURA 5: Análise por cromatografia gasosa do EB de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip.....	46
FIGURA 6: Espectro de massas da diidro-cumarina <sup>2</sup> (t <sub>R</sub> 8,70 min.).....	47
FIGURA 7: Espectro de massas da cumarina <sup>1</sup> (t <sub>R</sub> 10,05 min.).....	48
FIGURA 8: Cromatografia gasosa da cumarina isolada do EB de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip.....	48

FIGURA 9:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	50
FIGURA 10:	Curva dose-efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	51
FIGURA 11:	Efeito da cumarina (vo) isolada do EB das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	53
FIGURA 12:	Curva dose-efeito da administração oral da cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	54
FIGURA 13:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da carbenoxolona (vo), em modelo de úlcera induzida por etanol.....	56
FIGURA 14:	Efeito do EB (sc) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da carbenoxolona (sc), em modelo de úlcera induzida por etanol.....	57

FIGURA 15:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por estresse.....	59
FIGURA 16:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da atropina (vo), em modelo de úlcera induzida por reserpina.....	60
FIGURA 17:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol ratos tratados previamente com L-NAME.....	62
FIGURA 18:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com NEM.....	63
FIGURA 19:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com indometacina.....	65
FIGURA 20:	Estrutura básica dos compostos diterpênicos presentes no EB de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip.....	79

# LISTA DAS TABELAS

	Página
TABELA 1: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	50
TABELA 2: Curva Dose-Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	52
TABELA 3: Efeito da Cumarina (vo) isolada do EB das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	53
TABELA 4: Efeito da administração oral da Cumarina obtida do EB das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	55
TABELA 5: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da carbenoxolona (vo), em modelo de úlcera induzida por etanol.....	56

TABELA 6:	Efeito do EB (sc) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da carbenoxolona (sc), em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	58
TABELA 7:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por estresse.....	59
TABELA 8:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da atropina (vo), em modelo de úlcera induzida por reserpina.....	61
TABELA 9:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol ratos tratados previamente com L-NAME.....	62
TABELA 10:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com NEM.....	64
TABELA 11:	Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com indometacina.....	65

TABELA 12:	Efeito da administração intraduodenal do EB das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro.....	66
TABELA 13:	Efeito da administração intraduodenal do EB das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro em ratos tratados com histamina.....	67
TABELA 14:	Efeito da administração intraduodenal do EB das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro em ratos tratados com pentagastrina.....	68
TABELA 15:	Efeito da administração intraduodenal do EB das folhas secas e moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro em ratos tratados com betanecol.....	69

# Sumário

	Página
Resumo. ....	1
Introdução. ....	6
Objetivos. ....	15
Revisão Bibliográfica. ....	17
Material e Métodos. ....	27
1. Obtenção do Material Vegetal. ....	28
2. Processamento Fitoquímico. ....	29
2.1. Obtenção do Extrato Bruto de <i>Mikania laevigata</i>	
Schultz Bip. ....	29
2.2. Isolamento e Purificação dos princípios Ativos do EB	
de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ....	29
2.3. Cristalização da cumarina. ....	30
3. Análises Cromatográficas. ....	31
3.1. Cromatografia em Camada Delgada – CCD. ....	31
3.2. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de	
Massas – CG-EM. ....	31
4. Testes de Atividade Farmacológica. ....	32
4.1. Animais. ....	32
4.2. Úlcera Induzida por Indometacina. ....	32
4.2.1 Determinação da Dose Efetiva 50% (DE <sub>50</sub> ). ....	34
4.3. Úlcera Induzida por Etanol. ....	34
4.4. Úlcera Induzida por Estresse. ....	35

4.5. Úlcera Induzida por Reserpina. . . . .	36
4.6. Estudo da Participação do Óxido Nítrico sobre a Citoproteção Gástrica . . . . .	36
4.7. Estudo da Participação das Substâncias Sulfidrílicas Não Proteicas sobre a Citoproteção Gástrica . . . . .	37
4.8. Estudo da Participação de Prostaglandinas na Citoproteção Gástrica . . . . .	38
4.9. Ligadura de Píloro . . . . .	39
Análise Estatística. . . . .	40
Resultados. . . . .	41
1. Processamento Fitoquímico. . . . .	42
1.1. Obtenção do EB de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. . .	42
1.2. Cromatografia em Camada Delgada – CCD . . . . .	44
1.2.1. Análise do EB de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. . .	44
1.2.2. Análise das Frações da Coluna Cromatográfica . . . .	44
1.3. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas – CG-EM . . . . .	45
2. Testes Farmacológicos . . . . .	49
2.1. Úlcera Induzida por Indometacina. . . . .	49
2.1.1. Extrato Bruto Hidroalcoólico 70% (EB) das Folhas Secas e Moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip . . . . .	49
2.1.1.1. Avaliação da Atividade Antiulcerogênica. . . . .	49
2.1.1.2. Determinação da Dose Efetiva 50% (DE <sub>50</sub> ) . . . . .	51
2.1.2. Cumarina Isolada do EB das Folhas Secas e Moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip . . . . .	52
2.1.2.1. Avaliação da Atividade Antiulcerogênica. . . . .	52
2.1.2.2. Determinação da Dose Efetiva 50% (DE <sub>50</sub> ) . . . . .	54
2.2. Úlcera Induzida por Etanol . . . . .	55
2.2.1 Extrato Bruto Hidroalcoólico 70% (EB) das Folhas	

Secas e Moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip Administrado Oralmente . . . . .	55
2.2.2 Extrato Bruto Hidroalcoólico 70% (EB) das Folhas Secas e Moídas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip Administrado pela Via Subcutânea. . . . .	57
2.3 Úlcera Induzida por Estresse. . . . .	58
2.4 Úlcera Induzida por Reserpina. . . . .	60
2.5 Estudo da Participação do Óxido Nítrico sobre a Citoproteção Gástrica . . . . .	61
2.6 Estudo da Participação das Substâncias Sulfidrílicas Não Proteicas Citoproteção Gástrica . . . . .	63
2.7 Estudo da Participação de Prostaglandinas na Citoproteção Gástrica . . . . .	64
2.8 Ligadura de Píloro . . . . .	66
2.9 Ligadura de Píloro em Ratos Tratados com Histamina . . . . .	67
2.10 Ligadura de Píloro em Ratos Tratados com Pentagastrina . . . . .	68
2.11 Ligadura de Píloro em Ratos Tratados com Betanecol . . . . .	69
Discussão . . . . .	70
Conclusão . . . . .	80
Summary . . . . .	82
Referências bibliográficas . . . . .	86



## RESUMO

As plantas do gênero *Mikania*, distribuem-se pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (Argentina, Paraguai e Uruguai). No Brasil, ocorrem principalmente nas regiões sul e sudeste. São conhecidas popularmente como guaco e desenvolvem-se como trepadeira arbustiva, lenhosa, apresentando caule cilíndrico e ramoso. As folhas do gênero *Mikania* são muito utilizadas pela medicina popular como antiasmáticas, antireumáticas, cicatrizantes e antiofídicas.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico a 70% e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Shultz Bip., e sugerir um possível mecanismo de ação.

Para a obtenção do extrato bruto (EB), foram utilizadas as folhas da espécie acima. O EB apresentou atividade antiulcerogênica em modelo de úlcera induzida por indometacina.

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

O EB em modelo de úlcera induzida por etanol, por via oral e subcutânea, apresentou atividade antiulcerogênica. Estes resultados sugerem um efeito específico e sistêmico para o EB de *Mikania laevigata* Shultz Bip.

Alguns mecanismos citoprotetores foram avaliados. Entre eles, a participação do óxido nítrico, substância endógena que aumenta a resistência da mucosa por promover a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo local. Em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com L-name, um inibidor da NO sintase, o EB manteve sua atividade antiulcerogênica, sugerindo que esta atividade não está relacionada com o óxido nítrico.

Outra hipótese seria a interferência dos grupos sulfidríla não proteicos da mucosa. Estas substâncias, provavelmente promovem uma diminuição do aumento da permeabilidade vascular ou ainda impedem a ação de radicais livres sobre a mucosa. Para isto, foi utilizado o modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com N-etilmaleimida, um composto alquilante dos grupos sulfidríla. O EB de *Mikania laevigata* Shultz Bip., por via oral, manteve sua atividade,

sugerindo que este grupo de substâncias não está envolvido no mecanismo antiulcerogênico apresentado.

Um outro grupo de substâncias endógenas importantes no processo de citoproteção são as prostaglandinas, que aumentam a secreção de muco e bicarbonato. Em modelo de úlcera induzido por etanol, com administração prévia de indometacina, um antiinflamatório não esteroidal, que inibe a ciclooxigenase, enzima envolvida na síntese de prostaglandinas, o EB manteve sua atividade antiulcerogênica, sugerindo que essas substâncias parecem não participar da atividade apresentada pelo EB de *Mikania laevigata* Shultz Bip.

A partir de então, buscou-se avaliar a atividade antissecretória do EB, através do modelo de ligadura do piloro. O tratamento intraduodenal com EB alterou de forma significativa o volume e a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico nos grupos de animais tratados.

Este resultado sugeriu uma atividade antissecretória por parte do EB de *Mikania laevigata* Shultz Bip.

Nestas condições, buscou-se avaliar a influência do EB sobre a atividade dos secretagogos envolvidos na secreção ácida gástrica. Em modelo de ligadura do piloro em ratos tratados com histamina, um mediador da secreção ácida gástrica, o EB não reduziu de forma significativa a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico, sugerindo a não participação desta via no mecanismo antissecretório.

Para avaliar a participação da gastrina, em modelo de ligadura do piloro, foi administrado pentagastrina, a parte funcional a molécula da gastrina. Neste modelo

o EB também não reduziu de forma significativa a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico, sugerindo a não participação desta via.

Por último foi administrado betanecol, um potente agonista colinérgico e o EB de *Mikania laevigata* Shultz Bip. reduziu de forma significativa o volume e a concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico.

A cumarina isolada a partir do EB de *Mikania laevigata* Shultz Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina, apresentou atividade antiulcerogênica.

Estes resultados sugerem que o EB de *Mikania laevigata* Shultz Bip. apresenta atividade antiulcerogênica por mecanismo antissecretório, provavelmente por via anticolinérgica e que a cumarina isolada a partir do EB parece participar desta atividade.

---

## INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

Somente no fim do século XIX e início do século XX, após séculos de uso medicinal empírico de preparados de plantas, foram isolados os primeiros compostos de produtos vegetais, incluindo alcalóides como a morfina, estriçnina, quinina e outros, marcando uma nova era na obtenção de medicamentos e iniciando a pesquisa moderna com plantas medicinais (Hamburger et al, 1991).

Atualmente estima-se que, substâncias derivadas de plantas constituem aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados, relação que deve aumentar com o interesse das grandes indústrias farmacêuticas nas plantas superiores como fonte de novos princípios ativos de origem vegetal. O culto à ecologia e o aumento na demanda de terapias não convencionais também têm motivado o aumento no consumo e o interesse na pesquisa de espécies tidas como medicinais. Na Europa, o consumo de fitoterápicos dobrou nas últimas décadas, demonstrando o grande interesse em plantas medicinais. No entanto, das aproximadamente 250.000 espécies vegetais conhecidas, somente uma pequena percentagem tem sido submetida a estudos farmacológicos e fitoquímicos sistemáticos (Hamburger & Hostettmann, 1991; Fellows, 1992)

Plantas superiores, como as árvores em particular, crescem muito lentamente, o que limita o suprimento de material para obtenção de compostos puros em quantidade adequada. Além disso, estão sujeitas a alterações sazonais e inúmeros outros fatores extrínsecos do ecossistema, o que dificulta o controle da expressão genética dos princípios ativos e conseqüentemente, o controle da eficácia terapêutica a que se propõem (Hamburger et al, 1991).

É compreensível, portanto, que nos grandes centros as plantas superiores sejam apenas uma fonte de novos compostos úteis na execução de modelos para o desenvolvimento de novos princípios ativos, ou ainda para a obtenção de novas

moléculas para utilização como instrumentos de pesquisa farmacológica. O processo de estudo de uma planta é longo e multidisciplinar, envolvendo botânicos, farmacologistas, químicos, toxicologistas e médicos, desde os estudos iniciais com o extrato bruto, até a obtenção de um composto puro e biologicamente ativo. Este estudo inicia-se com a seleção da espécie, sendo esta uma etapa crucial no sucesso da investigação. A escolha pode ser baseada em considerações quimiotaxonômicas, ou em informações etnofarmacológicas. As plantas selecionadas pelo uso na medicina popular apresentam grande chance de conter compostos biologicamente ativos. Segundo alguns autores, existe uma estreita correlação entre a atividade anticancerígena e plantas usadas pela medicina popular com esta finalidade (Hamburger & Hostettmann, 1991; Hamburger et al., 1991).

O Brasil, graças ao seu solo riquíssimo, em combinação com o clima tropical favorável, é dotado de uma flora variada e sobretudo volumosa, constituindo uma das mais ricas biodiversidades de todo o planeta. Como em todo o mundo, o uso popular de plantas no tratamento dos mais diferentes males é antigo. Contudo, a avaliação da eficácia desse uso ultrapassa a competência local e por isto, numerosas plantas usadas popularmente como medicinais não são reconhecidas pelo sistema de saúde oficial (Hamburger & Hostettmann, 1991).

As plantas do gênero *Mikania* (Compositae) distribuem-se pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (Argentina, Paraguai e Uruguai). No Brasil, ocorrem

principalmente nas regiões sul e sudeste. São conhecidas popularmente como guaco ou guaco cheiroso e desenvolvem-se como trepadeira arbustiva, lenhosa, apresentando caule cilíndrico e ramoso. Floresce de agosto a outubro, sendo suas flores visitadas por *Apis mellifera* e várias espécies de Lepidoptera. O gênero *Mikania* possui cerca de 300 espécies, sendo que somente 10% destas foram estudadas quimicamente (Castro, et al., 1986).

As folhas das espécies do gênero *Mikania* são muito utilizadas pela medicina popular como antiasmáticas, cicatrizantes, anti-reumáticas e antiofídicas (Pio Corrêa, 1942; Gupta, 1994; Pereira, et al., 1994).

Os metabólitos secundários mais comuns neste gênero são cumarinas<sup>1</sup> (Leite, et al. 1992), diterpenos do tipo cauranos (Knudsen, et al., 1986; Mathur, et al., 1973), lactonas sesquiterpênicas (Cuenca, et al., 1992; Cuenca et al., 1993; Herz, et al., 1970; Diaz, et al., 1992), triterpenos (Kiang, et al., 1965) e flavonóides (Herz, & Santhanam, 1969), dentre outros.

Alguns diterpenos do tipo caurano, como o ácido caurenóico<sup>2</sup>, apresentam atividade antimicrobiana (Davino et al., 1989), que pode estar relacionada com a indicação popular do "guaco" no tratamento de afecções respiratórias (Oliveira et al., 1992).

Das partes aéreas da *M. glomerata* Sprengel e da *M. laevigata* Shultz Bip., foram isolados compostos como cumarina<sup>1</sup>, ácido caurenóico<sup>2</sup>, ácido cinamoilgrandiflórico<sup>3</sup> e estigmasten-22-en-3-ol<sup>4</sup> (Oliveira et al., 1984; Vilegas et al., 1997), cujas estruturas estão representadas na figura 1.

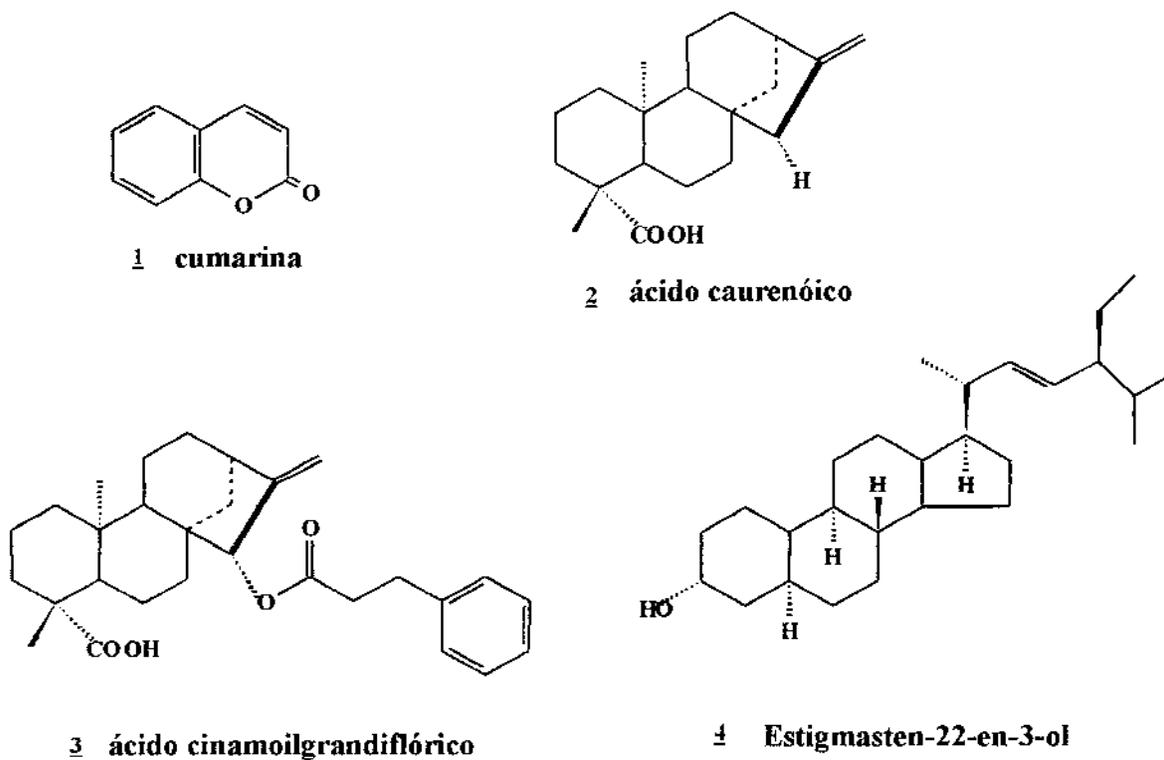


FIGURA 1 – Substâncias isoladas de *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*.

Das espécies do gênero *Mikania*, somente algumas foram estudadas quanto aos óleos essenciais, que são constituídos principalmente por mono e sesquiterpenos. Dentre estas, destacamos a *M. micrantha* (Thompson & Nicolher, 1991); a *M. banisterieae* (Lobitz et al., 1997), a *M. congesta* e *M. amara* (Maia et al., 1984).

No Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), existem diversas espécies de *Mikania*, incluindo a *Mikania laevigata*. Esta espécie vem sendo estudada agronomicamente a cerca de cinco anos e o cultivo vem de uma população clonada nas condições de sol e sombra. Estudos preliminares realizados na Divisão de Química Sintética do CPQBA/UNICAMP com o óleo essencial de *M. laevigata*, evidenciaram principalmente a presença de sesquiterpenos, dentre os quais destacam-se o (-)-espatulenol, o *trans*-cariofileno e o cubebeno.

A *M. laevigata* Schultz.Bip. (Compositae, tribo Eupatoriëae), desenvolve-se como um arbusto lenhoso e cheio de ramos. Cresce como trepadeira, e não tem garras para prender-se, precisando de um arrimo. As lianas apresentam ramos estriados, glabros. As folhas são opostas, pecioladas, lanceolada a estreitamente ovada, às vezes levemente lobada, com base obtusa, ápice agudo a atenuado, trinervadas, glabras em ambas as faces, de 6,5 a 12,5 cm de comprimento e 2 a 5 cm de largura. O pecíolo tem de 1,5 a 4,2 cm de comprimento. Os ramos e folhas têm odor característico de "guaco" (cumarina). A inflorescência apresenta panícula de capítulos sésseis, densamente aglomerados; involúcro de 4,7 a 5 mm, bráctea

subinvolucral de 2 mm, lanceolada, ciliada, ápice agudo e brácteas involucrais com base dilatada e ápice obtuso. A corola é glabra, o tubo tem de 1,2 a 1,3 mm, o limbo de 3 a 3,4 mm, com lobos de 1 mm, ciliados, ápice pontuado de glândulas. Os aquênios são glabros, de 3 a 3,3 mm, ápice esparsamente piloso e papus de 4 a 4,7 mm (Pio Corrêa, 1942).

Uma exsicata da *Mikania laevigata* está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob número UEC - 102.046. Um exemplar desta espécie, cultivada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), está apresentado na figura 2.



FIGURA 2: Exemplar de *Mikania laevigata* Shultz. Bip. cultivada no Centro Pluridisciplinar Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP)

---

**OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Este projeto de pesquisa teve como objetivos:

- Avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico a 70% (EB) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz Bip. em modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos.
- Estudar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade antiulcerogênica do EB.
- Avaliar a atividade antiulcerogênica da cumarina isolada a partir do EB em modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos.

---

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O estômago é dividido em quatro regiões anatômicas, revestidas por uma mucosa e que são denominadas cárdia, fundo, corpo e antro. A mucosa gástrica é constituída de uma série de depressões e glândulas. Nas depressões estão as células epiteliais superficiais, enquanto que as glândulas são constituídas por três tipos distintos de células. As parietais que são as responsáveis pela secreção de ácido clorídrico, as endócrinas pela secreção de muco e as principais que secretam o pepsinogênio.. As células parietais e as células principais estão localizadas primariamente no fundo e no corpo. Já no antro, estão localizadas as células G responsáveis pela secreção de gastrina. (Wingate, 1986).

Como porta de entrada de diversos agentes no organismo, o estômago desenvolveu diversos mecanismos de proteção. Entre os principais estão os fatores secretados no lúmen, incluindo ácido, muco, bicarbonato e substâncias antibacterianas, como as imunoglobulinas. Ainda que o ácido clorídrico tenha o potencial de causar injúria à mucosa gástrica, é importante lembrar que sua principal função é proteção, contra microorganismos ingeridos (Wallace & Chin, 1997). Estes mecanismos, denominados citoprotetores, aumentam a resistência das células e limitam o acesso dos agentes agressores a elas (Allen et al., 1993). A defesa da camada mucosa do estômago tem sido bem caracterizada, sendo a sua principal função a de proteção contra os efeitos nocivos do ácido clorídrico.

O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago e pelo duodeno, em resposta a vários estímulos, como as prostaglandinas, peptídeos gastrointestinais e contato com o ácido gástrico. Ele 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). A secreção de bicarbonato é inibida por antagonistas muscarínicos, agonistas  $\alpha$  adrenérgicos, antiinflamatórios, ácidos biliares, fumaça de cigarro e provavelmente pela infecção por *Helicobacter pylori* (Hojgaard et al., 1996).

A camada de muco aderida à mucosa gástrica protege o epitélio contra o ácido, a pepsina e outros agentes necrotizantes, como o álcool absoluto e antiinflamatórios não esteroidais. É importante também na recuperação da injúria gástrica (Al Moutaery & Tariq, 1997). O muco gastroprotetor forma um fino revestimento sobre as células superficiais da mucosa que protege as células subjacentes das forças mecânicas da digestão, lubrifica a mucosa, retém água e impede, mas não bloqueia, a difusão dos íons  $H^+$  da luz para a membrana apical das células epiteliais. O muco aderido à mucosa é constituído por uma camada de glicoproteínas em forma de gel, denominada mucina e esta camada é insolúvel em água (Sellers et al., 1986).

Prostaglandinas são derivados de ácidos graxos de vinte carbonos, produzidas a partir do ácido araquidônico, após liberação de fosfolipídeos de membrana, através da ação da enzima ciclooxygenase (Wallace & Chin, 1997). O mecanismo pelo qual as prostaglandinas exercem sua ação citoprotetora não tem sido bem esclarecido porém, sabe-se que as prostaglandinas das séries E, F e I são sintetizadas em quantidades substanciais por todo o trato gastrointestinal (Eberhart & Dubois, 1995). Quando administradas exogenamente, estimulam a secreção de muco e bicarbonato e aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (Konturek & Pawlik, 1986, Motilva et al., 1996, Wallace & Chin, 1997).

O óxido nítrico tem sido objeto de estudos extensos que procuram esclarecer seu papel na defesa da mucosa gástrica (Elliot et al., 1995). Foi demonstrado que esta substância tem influência sobre a secreção de muco, fluxo sanguíneo, bem como

sobre a resistência da mucosa à injúria gástrica (Wallace & Chin, 1997). Seu efeito citoprotetor se dá por promover vasodilatação e conseqüentemente um aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, proporcionando uma retirada mais acelerada dos íons  $H^+$  nocivos à esta e ainda aumentar o suporte de nutrientes para a mesma (Konturek et al., 1995, Kato et al., 1998).

A presença de um importante agente antioxidante na mucosa gástrica tem sido frequentemente reportado (Martin et al., 1998). Sabe-se que a presença de grandes concentrações de substâncias sulfidrílicas não proteicas na mucosa gástrica, representadas principalmente pela glutathiona reduzida, está intimamente relacionada com a citoproteção gástrica, por impedir a ação nociva de radicais livres tóxicos para as células desta mucosa (Szabo, 1981, Takeuchi et al., 1989, Martin et al., 1998).

A capsaicina, o principal composto presente na pimenta vermelha, devido à sua capacidade em excitar e retardar a função de neurônios primários aferentes, tem sido usada como ferramenta para elucidar a função destes neurônios sensoriais em processos fisiológicos. No estômago de ratos, dados experimentais forneceram evidências claras que os neurônios sensoriais capsaicina sensitivos, estão envolvidos em um mecanismo local de defesa contra a úlcera gástrica. Em simulações experimentais com esses neurônios, a capsaicina em baixas concentrações protegeu a mucosa gástrica de ratos contra a injúria produzida por diferentes agentes ulcerogênicos. Na maioria dos estudos, a capsaicina produz nos estômagos de ratos ou gatos uma inibição da secreção ácida gástrica. Em humanos,

embora estudos recentes forneçam evidências a favor do efeito benéfico da capsaicina na mucosa gástrica, este efeito ainda necessita de maior evidenciação (Salam et al., 1997).

O suco gástrico normal é uma mistura da secreção parietal (ácido e fator intrínseco) e das secreções não-parietais (muco, bicarbonato,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e pepsinogênio). Três mediadores químicos endógenos, a acetilcolina, a gastrina e a histamina, estimulam a secreção do ácido clorídrico (Schubert, 1994, Hirschowitz et al., 1995, Kato et al., 1997).

Nos anos 70, Black et al. (1972) postularam que a histamina estimula a secreção ácida gástrica interagindo com receptores  $\text{H}_2$  e sucessivos antagonistas foram selecionados para este receptor. A histamina, contida em células enterocromafins, é liberada através de um mecanismo parácrino. Quando liberada, este mediador difunde-se pelos espaços intercelulares até atingir as células parietais, liga-se aos receptores  $\text{H}_2$  ali presentes e aumenta então, a secreção ácida gástrica (Hersey & Sachs., 1995, Andersson et al., 1996).

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

A somatostatina, localizada nas células D do antro, é um importante inibidor da secreção ácida gástrica estimulada pela gastrina e é menos efetiva sobre a secreção ácida estimulada pela histamina (Walsh, 1988, Vuyyuru et al., 1995).

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

Em 1922, Latarjet utilizou a vagotomia pela primeira vez no tratamento da úlcera duodenal. Esta foi uma das primeiras evidências do envolvimento da via colinérgica como mediador da secreção ácida gástrica (Arquiola et al., 1987). A inibição da secreção ácida gástrica pela atropina demonstrou que a acetilcolina atua através de um receptor muscarínico. Os estudos farmacológicos sobre a estimulação colinérgica revelaram que a célula parietal conta com um subtipo de receptor muscarínico, denominado  $M_3$ . A acetilcolina é liberada por neurônios eferentes vagais, que são estimulados através do olfato, visão, paladar ou mastigação e por neurônios locais da parede gástrica estimulados pela distensão do estômago (Hersey & Sachs, 1995).

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

A mucosa gástrica está exposta a vários fatores agressivos como o estresse, drogas ulcerogênicas como os antiinflamatórios não esteroidais, etanol, a bactéria *Helicobacter pylori* e vários irritantes endógenos como a secreção de ácido clorídrico e pepsina e os sais biliares. A etiologia da úlcera péptica não é bem compreendida. Acredita-se existir um desvio no equilíbrio entre os mecanismos lesivos da mucosa, como a secreção e ação do ácido clorídrico e da pepsina e os mecanismos citoprotetores da mucosa, representados basicamente pela secreção de muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico e substâncias sulfidrílicas não proteicas (Konturek et al., 1997).

A identificação e isolamento da *Helicobacter pylori* por Marshall & Warren em 1983, proporcionou um enorme desenvolvimento dos conhecimentos a cerca da úlcera péptica (Marshall, 1994). Após vários estudos científicos, evidenciou-se que cerca de 90% das infecções da mucosa gastroduodenal estão associadas a esta bactéria. Estes trabalhos evidenciaram uma correlação entre a presença dessa bactéria nas lesões ulcerosas e a reincidência de gastrite e úlcera. (Cover & Blaser, 1992,

Goodwin,1997). A detecção da *Helicobacter pylori* é feita através da biopsia gástrica ou duodenal e posterior estudo histopatológico laboratorial. Recentemente, desenvolveu-se uma nova metodologia, que consiste na pesquisa de anticorpos para o *Helicobacter pylori*, no sangue do paciente infectado, evitando o uso de métodos invasivos, desconfortáveis para o paciente. Estudos imunológicos em animais têm sugerido a possibilidade de vacinação contra a infecção por esta bactéria e com isso a possibilidade de uso terapêutico desta vacina (Graham, 1996).

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

Várias drogas têm sido utilizadas no tratamento das úlceras gástricas e duodenais, sendo de grande importância os agentes anti-secretores gástricos, do tipo antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> de histamina (Bauer et al., 1986) e os análogos das prostaglandinas, como o misoprostol, exemplo típico de droga citoprotetora (Felix et al., 1986). Em 1988 foram introduzidos no mercado os primeiros inibidores da bomba protônica sendo o omeprazol e o lansoprazol os representantes desta classe, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da bomba protônica H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, enzima responsável pela etapa final da secreção ácida gástrica (Sachs et al., 1988, Hermansson et al., 1997, Tari et al., 1997).

Existe um interesse crescente nos efeitos gastrointestinais dos agonistas e antagonistas de receptores serotoninérgicos e estes aspectos farmacológicos apresentam implicações clínicas importantes. Derivados ativos de benzamidas como agonistas 5-HT<sub>4</sub>, incluindo a cisaprida, tem reforçado o arsenal terapêutico na classe dos fármacos que aumentam a motilidade intestinal. Estudos recentes têm sugerido que a coordenação da motilidade intestinal pode ser de importância crucial na eliminação de ácido gástrico e diminuição da motilidade intestinal poderia ser um fator pouco considerado na patogênese da úlcera gástrica (Motilva et al., 1996).

No que diz respeito aos fármacos de origem natural com atividade antiulcerogênica, vários princípios ativos tiveram sua atividade comprovada através de modelos experimentais em animais. O mais importante deles, e já comercializado, é a carbenoxolona sódica (sal sódico do hemisuccinato do ácido glicirretínico), obtida a partir das raízes e rizomas do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*). Seu mecanismo de ação foi extensamente estudado e sabe-se que esta droga aumenta os níveis de prostaglandinas na mucosa gástrica por inibir as enzimas que promovem o catabolismo das prostaglandinas (15-hidroxi-PG-dehidrogenase e  $\Delta^{13}$ -PG-redutase). Os altos níveis de prostaglandinas aumentam a secreção de muco e bicarbonato e conseqüentemente, os mecanismos de proteção da mucosa contra o ácido clorídrico e a pepsina. Além deste mecanismo, a carbenoxolona age aumentando os níveis de AMPc por inibição das fosfodiesterases da mucosa e também por inibição da secreção de pepsina (Lewis & Hanson, 1991).

---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A *Mikania laevigata* Schultz. Bip. foi coletada em 1996 no Campo de Cultivo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

Foram utilizadas as folhas da espécie vegetal cultivada a pleno sol e colhidas no período da manhã. Após a coleta, o material vegetal foi seco a uma temperatura de 45°C durante 24 horas em estufa da marca *Fabbe*, modelo 170, com circulação de

ar. Posteriormente, as folhas foram finamente moídas em moinho de facas da marca *Stephen*, modelo *UM 40*, produzindo-se partículas de aproximadamente 0,35 mm.

## **2. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO**

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

Para obtenção do extrato bruto hidroalcoólico, 200g do pó das folhas secas foram agitados em 1,0 l de álcool etílico a 70% durante 4 horas, à temperatura ambiente. A seguir o volume extraído foi filtrado a vácuo em funil de placa porosa sendo o resíduo lavado com mais 0,3 l da solução extrativa. O resíduo da planta foi submetido a um novo período de extração (4horas). Após filtração, o volume resultante das extração foi concentrado sob vácuo e baixa temperatura até a remoção do etanol. O volume restante foi liofilizado dando origem a um pó de coloração verde (40g), denominado EB, que foi armazenado em dessecador a -20°C. O rendimento obtido por esta extração foi de 20%.

### **2.2. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DO EB DE**

#### ***Mikania laevigata* Schultz. Bip.**

O EB (30g) foi submetido à purificação em coluna cromatográfica aberta de vidro com 80 cm de comprimento e 4 cm de diâmetro. Como fase estacionária foi utilizado

sílica gel 60 da *Merck* (70-230 Mesh) e como eluentes a mistura em diferentes concentrações de hexano e acetato de etila (H:Ac) (com gradientes de polaridade).

A eluição da coluna foi iniciada com hexano (1,0 l), sendo recolhidas frações de 100 ml de volume cada. A seguir, a polaridade do eluente foi sequencialmente aumentada H:Ac 5% (0,5 l), H:Ac 10% (0,5l), H:Ac 50% (0,5 l) e acetato de etila puro (0,5 l), quando foi recolhida a última fração de 100 ml.

Deste modo, no total foram recolhidas 30 frações, que foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD), eluídas com uma mistura de tolueno : acetato de etila (T:Ac), na proporção 70:30 (v/v).

A visualização dos cromatogramas foi feita por irradiação com lâmpada Ultravioleta a 254 e 366 nm seguida de revelação com solução de anisaldeído (ácido acético:ácido sulfúrico:anisaldeído 50,0:1,0:0,5 v/v) e aquecimento.

As frações que se mostraram semelhantes por cromatografia foram agrupadas, fornecendo assim 8 frações que foram evaporadas a vácuo.

### **2.3- Cristalização da cumarina**

A fração 3, enriquecida com a cumarina 1 (0,8g), foi cristalizada com 0,3 l de metanol à 0 °C, fornecendo após filtração e secagem cristais brancos amorfos, com ponto de fusão na faixa de 68-78 °C e cheiro característico de baunilha.

### **3 - Análises Cromatográficas**

#### **3.1- Cromatografia em Camada Delgada – CCD**

O extrato bruto hidroalcoólico, as frações da coluna e a cumarina isolada foram diluídas em etanol ou acetato de etila e analisadas por CCD. Foram utilizadas cromatoplaças prontas de alumínio (Merk – artigo 5554), como eluentes T:Ac (70:30) e H:Ac (80:20) e as placas foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada.

A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada Ultravioleta – UV a 254 e 366 nm, seguida de pulverização com uma solução de anisaldeído e aquecimento em estufa.

#### **3.2- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas – CG-EM**

O extrato bruto hidroalcoólico, as frações da coluna e a cumarina foram diluídas em etanol ou acetato de etila e analisadas por CG-EM, utilizando um Cromatógrafo Gasoso da marca Hewlett Pachard (modelo 5890, série II), acoplado a um detetor seletivo de massas da marca Hewlett Pachard (modelo 5971), equipado com uma coluna HP - 5 de 25 m de comprimento e 0,2mm diâmetro interno, com filme de espessura de 0,33  $\mu\text{m}$ . As condições de análise foram as seguintes:

- Temperatura do injetor: 250°C;
- Detector: 280°C;
- Programação:  $T_i=110^\circ\text{C}$  (2 min), 5°C/min;  $T_f=3000^\circ\text{C}$
- Gás de arraste: He (1,0 ml/min) e,
- Volume de injeção : 1,0  $\mu\text{l}$  (15mg/ml).

## **4. TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA**

### **4.1. ANIMAIS**

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

### **4.2. ÚLCERA INDUZIDA POR INDOMETACINA**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução de NaCl a 0,9% (solução salina) no volume de 10ml/kg (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg (controle positivo) e o último grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução salina. O mesmo procedimento foi adotado para a cumarina isolada do EB, que também foi diluída em solução salina.

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

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

Até 10 petéquias	1 ponto
Até 20 petéquias	2 pontos
Até 30 petéquias	3 pontos
Úlceras de até 1 mm	*n x 2
Úlceras maiores que 1 mm	*n x 3
Hemorragia	1 ponto
Perda de pregas	1 ponto
Perda da coloração	1 ponto
* onde n refere-se ao número de lesões encontradas	

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

$$\frac{\text{Média Controle} - \text{Média Tratado}}{\text{Média Controle}} \times 100$$

#### **4.2.1. DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% (DE<sub>50</sub>)**

O modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina foi utilizado para a determinação da DE<sub>50</sub> de EB, através da construção de uma curva dose-efeito. Para tanto, os animais foram tratados oralmente com doses crescentes do EB (250, 500, 750, 1000 e 2000 mg/kg). O valor de DE<sub>50</sub> foi obtido através de cálculo de regressão linear.

#### **4.3. ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo), outro grupo com solução aquosa de carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg (controle positivo) e o último grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução salina. O mesmo procedimento foi adotado, quando o EB foi administrado pela via subcutânea, na dose de 700 mg/kg.

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

Decorrida uma latência de 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos

ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

#### **4.4. ÚLCERA INDUZIDA POR ESTRESSE**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg (controle positivo) e o último grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução salina.

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais tiveram as patas traseiras e dianteiras imobilizadas com fitas de esparadrapo e posteriormente foram colocados no interior de contêntores. Estes contêntores foram colocados em câmara fria a uma temperatura de 4° C por 2 horas, segundo metodologia descrita por Levine et al. (1971). Após este período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo os estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

#### **4.5. ÚLCERA INDUZIDA POR RESERPINA**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, os quais foram divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo), outro grupo com solução aquosa de atropina, na dose de 10 mg/kg (controle positivo) e o último grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução salina.

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

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

#### **4.6. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo

de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e o outro grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução salina. Todos estes grupos receberam tratamento prévio com uma solução aquosa de L-NAME na dose de 5 mg/kg, por via endovenosa, com exceção de um grupo, que somente recebeu solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo-salina) de acordo com metodologia descrita por Elliot et al., (1995).

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

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

#### **4.7. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SULFIDRÍLICAS NÃO PROTEICAS SOBRE A CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e o outro grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução

salina. Todos estes grupos receberam tratamento prévio com uma solução aquosa de N-etilmaleimida na dose de 10 mg/kg, por via subcutânea, com exceção de um grupo, que somente recebeu solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo-salina), de acordo com metodologia descrita por Szabo (1981).

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

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

#### **4.8. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS NA CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 7 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo) e o outro grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução salina. Todos estes grupos receberam tratamento prévio com uma suspensão aquosa de Indometacina na dose de 5 mg/kg, por via intraperitoneal, com exceção

de um grupo, que somente recebeu solução salina no volume de 10ml/kg (controle negativo-salina), de acordo com metodologia descrita por Konturek & Pawlik (1986). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1,0 ml de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por Robert (1979).

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

#### **4.9. LIGADURA DE PILORO**

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

Logo após a ligadura, cada grupo de animais recebeu, por via intraduodenal, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 ml/kg (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg (controle positivo) e o último grupo recebeu EB na dose de 1,0 g/Kg (grupo tratado), que foi diluído em solução salina.

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

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

Para avaliar a influência do EB sobre a atividade dos secretagogos, a histamina (25mg/Kg,sc) ou a pentagastrina (4µg/Kg,ev) ou o betanecol (2,5mg/Kg,sc) foram administrados uma hora após a ligadura do piloro e administrados por via intraduodenal.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

---

**RESULTADOS**

# RESULTADOS

## 1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

### 1.1. OBTENÇÃO DO EB DE *Mikania laevigata* Schutz Bip.

O processo de obtenção e purificação do extrato bruto de *Mikania laevigata* Schutz Bip. está representado na figura 3.

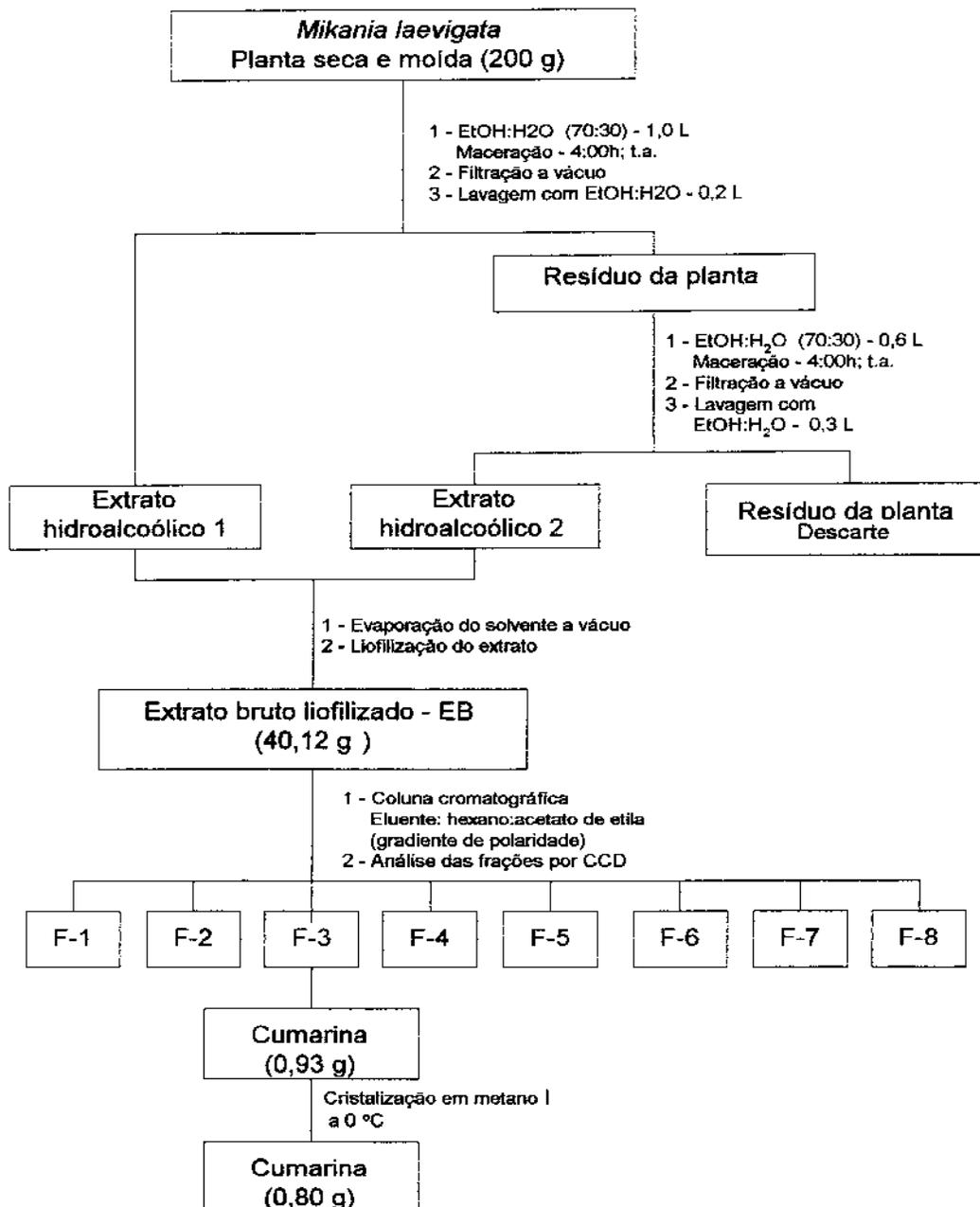


FIGURA 3 – Etapas envolvidas na preparação do EB e purificação da cumarina.

## 1.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA – CCD

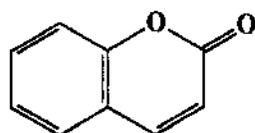
### 1.2.1. ANÁLISE DO EB DE *Mikania laevigata* Schultz Bip.

A cromatografia em camada delgada (silicagel) eluída com uma mistura de tolueno e acetato de etila (70:30) revelou, após incidência de luz ultravioleta (254nm), uma mancha principal com Rf de 0,58. Após isolamento por coluna cromatográfica e comparação com amostra padrão *Aldrich*, essa substância foi identificada como a cumarina<sup>1</sup>.

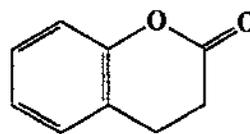
Além da cumarina<sup>1</sup> a cromatoplaça, quando revelada com solução de anisaldeído, apresentou diversas substâncias com coloração característica de terpenos (rosa, azul).

### 1.2.2. ANÁLISE DAS FRAÇÕES DA COLUNA CROMATOGRÁFICA

Na análise das frações obtidas por separação em coluna cromatográfica, (eluente T:Ac. 70:30), foi observado que as frações 1 e 2 eram constituídas principalmente por graxas. A fração 3 apresentou como principal composto a cumarina<sup>1</sup> (Rf = 0,58), representada na figura 4 e traços de compostos diterpênicos.



Cumarina<sup>1</sup>  
PM = 146



Diidrocumarina<sup>2</sup>  
PM = 148

FIGURA 4 – Estruturas moleculares da cumarina e da diidrocumarina, presentes no EB de *Mikania laevigata* Schultz Bip.

A CCD da fração 3, quando comparada com um padrão de cumarina *Aldrich*, revelou a presença de manchas com R<sub>f</sub>s idênticos, sugerindo tratar-se da mesma substância. As demais frações foram analisadas por CCD, evidenciando principalmente a presença de diterpenos nas frações intermediárias.

### 1.3. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CG-EM.

Entre as diversas substâncias identificadas no EB pela cromatografia gasosa (figura 5), duas delas apresentaram tempo de retenção de 8,70 e 10,05 min.

A análise dos espectros de massas (figuras 6 e 7) e a comparação desses com os espectros de massas da espectroteca *Wiley* (presente no equipamento utilizado), revelou 96 a 98% de semelhança com a diidrocumarina<sup>2</sup> (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O - PM = 148) e cumarina<sup>1</sup> (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O - PM = 146).

As demais substâncias presentes no EB (figura 5), com tempo de retenção entre 24,0 a 30,0 min apresentam peso molecular e fragmentações características nos espectros de massas para diterpenos (C-20).

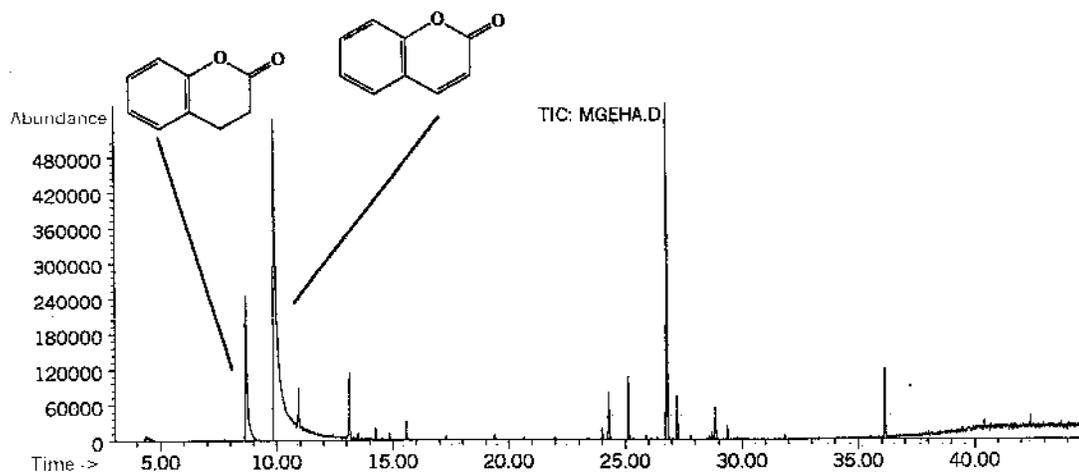


FIGURA 5: Análise por cromatografia gasosa do EB de *Mikania laevigata* Schultz Bip.

No espectro de massas da figura 6, foi observado um pico em 148 que corresponde ao íon molecular. O fragmento em  $m/z$  120 caracterizou a perda de 28 unidades, atribuído ao grupo  $C=O$  ( $PM=28$ ). A presença do grupo aromático pode ser confirmada pelos fragmentos em  $m/z$  91 e 78.

Esses dados comparados com o espectro de massas confirmaram a presença da diidrocurmarina<sup>2</sup> no EB (Figura 4).

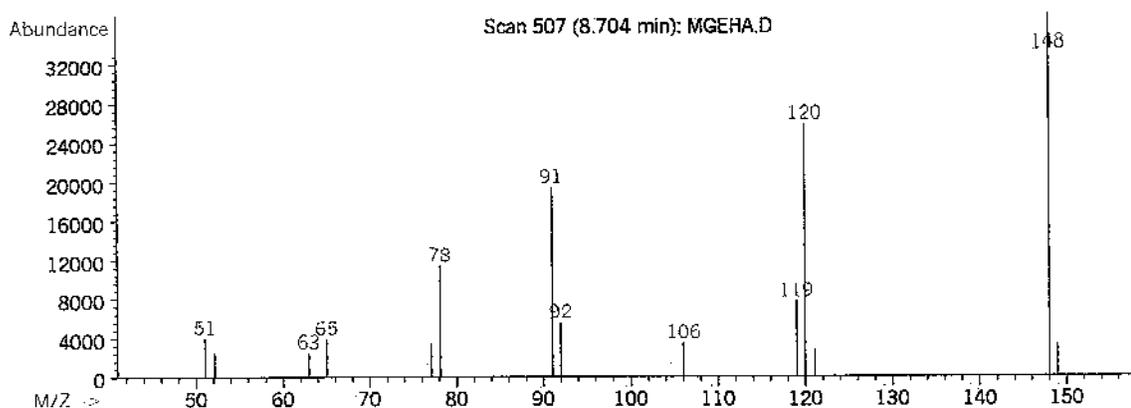


FIGURA 6: Espectro de massas da diidrocumarina<sup>2</sup> ( $t_R$  8,70 min.)

O espectro de massas da substância com tempo de retenção de 10,05 min (figura 7), apresentou o pico do íon molecular  $M^+ = 146$ , que corresponde a fórmula estrutural  $C_9H_8O$ .

O fragmento em  $m/z$  118 caracterizou a perda de 28 unidades, atribuído ao grupo  $C=O$ . A presença do grupo aromático pode ser confirmada pelos fragmentos em  $m/z$  89 e 90 ( $C_7H_6$ ). O espectro de massas (figura 7), quando comparado com a espectroteca do equipamento confirmou a presença da cumarina<sup>1</sup> no extrato EB.

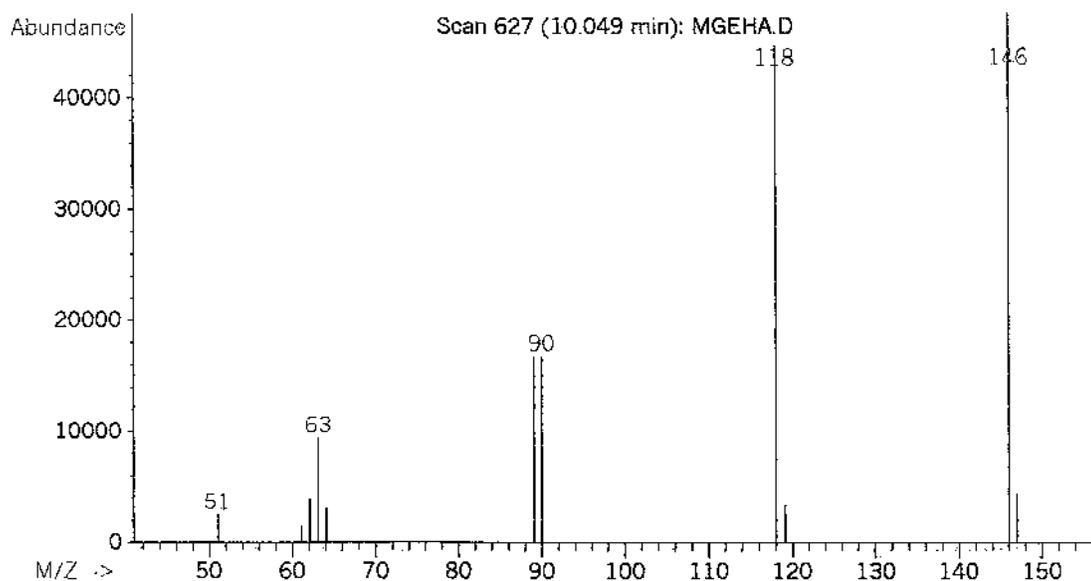


FIGURA 7: Espectro de massas da cumarina<sup>1</sup> (t<sub>R</sub> 10,05 min.)

A figura 8 apresenta o cromatograma obtido para cumarina isolada do EB. O tempo de retenção observado foi de 8,40 min e seu espectro de massas mostrou ser idêntico ao apresentado na figura 5.

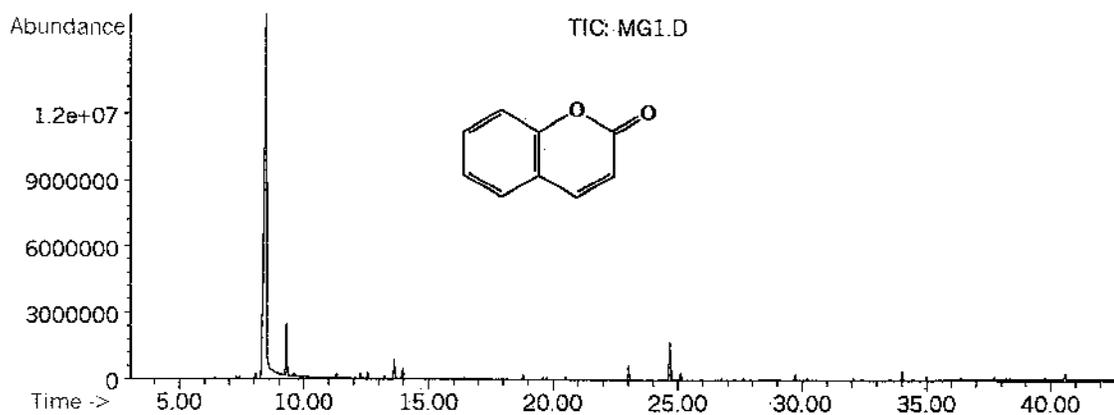


FIGURA 8: Cromatografia gasosa da cumarina isolada do EB de *Mikania laevigata* Schultz Bip.

## **2. TESTES FARMACOLÓGICOS**

### **2.1. ÚLCERA INDUZIDA POR INDOMETACINA**

#### **2.1.1. EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO 70% (EB) DAS FOLHAS SECAS E MOÍDAS DE *Mikania laevigata* Schultz. Bip.**

##### **2.1.1.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCEROGÊNICA**

No modelo de úlcera induzida por indometacina o EB, administrado por via oral na dose 1,0 g/kg, apresentou atividade antiúlcero-gênica, com uma porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (ILU) de 85%, enquanto que cimetidina, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 87%. Os resultados, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 9 e na Tabela 1.

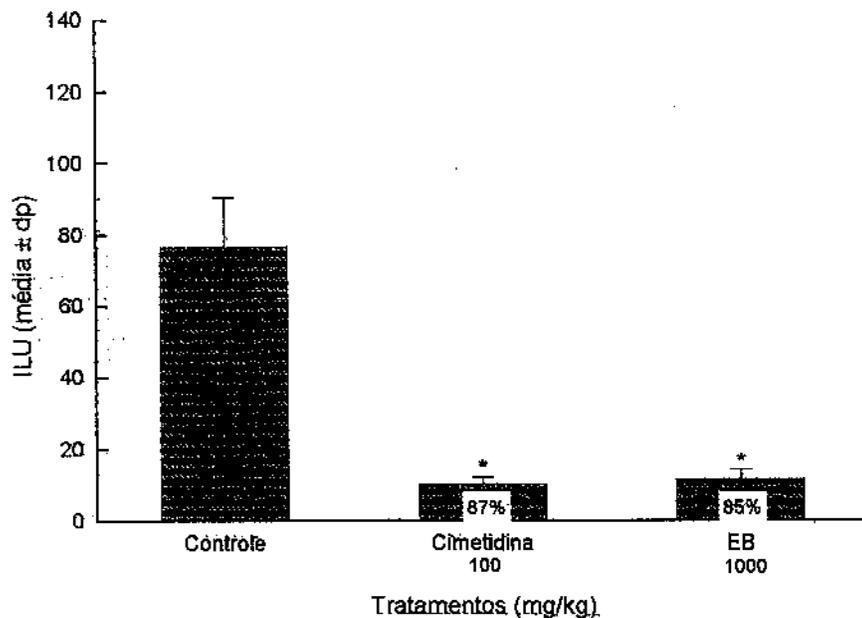


FIGURA 9: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA:  $F_{(2,17)} = 20,77$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,001$ ).

TABELA 1: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	---	7	76,7± 13,5	
Cimetidina	100	6	10,2 ± 1,8*	86,7
EB	1000	7	11,4 ± 2,8*	85,1

ANOVA  $F_{(2,17)} = 20,77$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,001$ .

### 2.1.1.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% (DE<sub>50</sub>)

O efeito antiulcerogênico apresentado pelo EB no modelo de úlcera induzida por indometacina, quando administrado oralmente nas doses de 250, 500, 750, 1000 e 2000 mg/kg, apresentou uma DE<sub>50</sub>, calculada por regressão linear, de 691,6 mg/kg. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 10 e na Tabela 2.

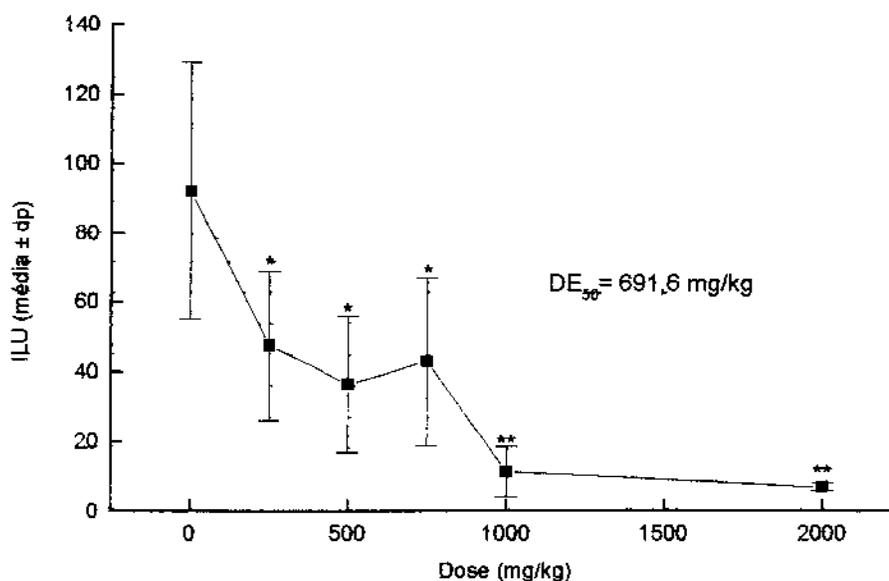


FIGURA 10: Curva Dose-Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA:  $F_{(5,26)}=11,34$   $p<0,01$ . Teste de Duncan: \* $p<0,01$  \*\* $p<0,001$ ).

TABELA 2: Curva Dose-Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	---	7	92,0 ± 37,0	
	250	7	47,4 ± 21,2*	48,5
	500	7	36,4 ± 19,4*	60,4
EB	750	7	42,8 ± 24,0*	53,5
	1000	7	11,4 ± 7,30**	85,1
	2000	7	7,00 ± 1,10**	92,4

ANOVA  $F_{(5,26)} = 11,34$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan \* $p < 0,01$  \*\* $p < 0,001$ .

## 2.1.2. CUMARINA ISOLADA DO EB DAS FOLHAS SECAS E MOÍDAS DE *Mikania laevigata* Schultz. Bip.

### 2.1.2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

No modelo de úlcera induzida por indometacina a Cumarina, administrada oralmente na dose 100 mg/kg, reduziu o em 90%, enquanto que cimetidina, administrada pela mesma via e dose, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 78%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 11 e na Tabela 3.

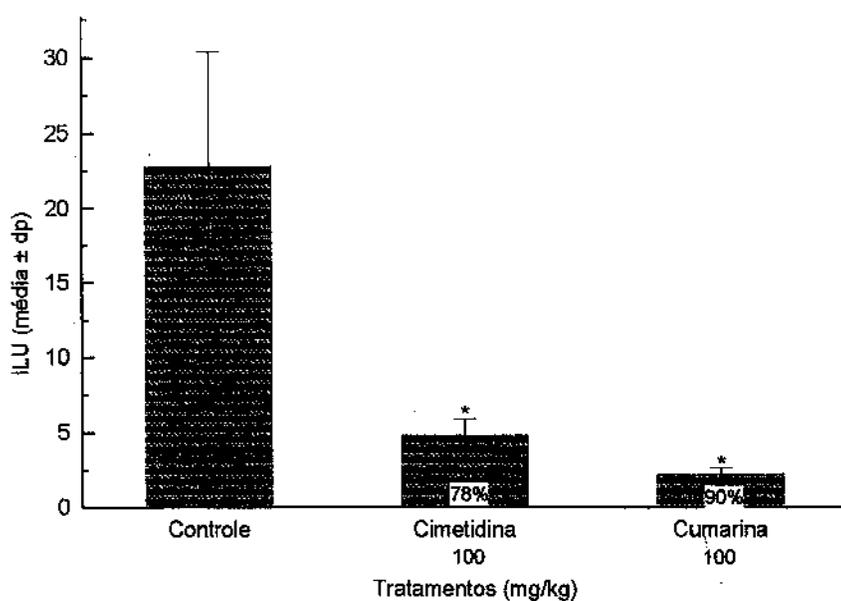


FIGURA 11: Efeito da Cumarina (vo) isolada do EB das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por indometacina (ANOVA:  $F_{(2,12)} = 31,67$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan \*  $p < 0,001$ ).

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

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	---	5	22,8 ± 7,6	
Cimetidina	100	5	4,8 ± 1,1*	78,2
Cumarina	100	5	2,2 ± 0,4*	90,4

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

### 2.1.2.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% (DE<sub>50</sub>)

No modelo de úlcera induzida por indometacina, o efeito antiulcerogênico apresentado pela Cumarina isolada do EB nas doses de 10, 25, 50, 75 e 100 mg/kg (vo), apresentou uma DE<sub>50</sub> de 60,7 mg/Kg, calculada por regressão linear. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 12 e na Tabela 4.

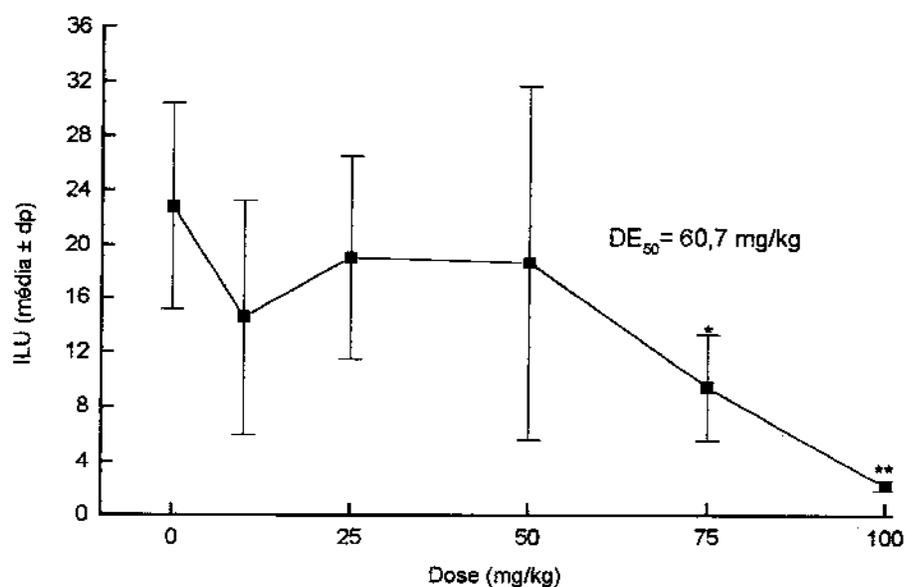


FIGURA 12: Curva dose-efeito da administração oral cumarina isolada do EB das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip., em modelo de úlcera induzida por indometacina.

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

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

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

## 2.2. ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL

### 2.2.1. EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO 70% (EB) DAS FOLHAS SECAS E MOÍDAS DE *Mikania laevigata* Schultz. Bip. ADMINISTRADO ORALMENTE

No modelo de úlcera induzida por etanol o EB, administrado por via oral na dose 1,0g/kg, diminuiu o índice de lesões ulcerativas em 93%, enquanto que carbenoxolona, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 85%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 13 e na Tabela 5.

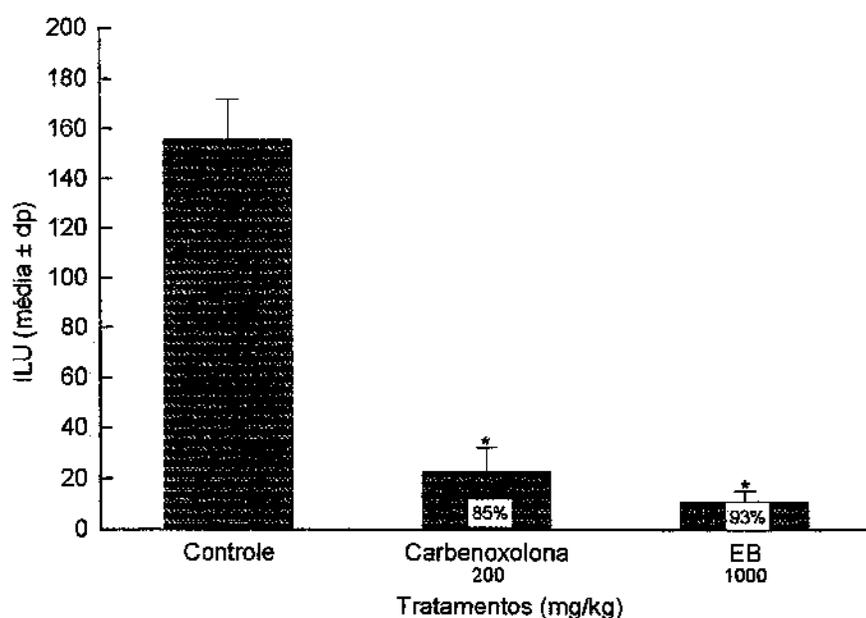


FIGURA 13: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da carbenoxolona (vo), em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA:  $F_{(2,18)} = 267,48$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan:  $*p < 0,001$ ).

TABELA 5: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da carbenoxolona (vo), em modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	7	156,1 ± 15,6	
Carbenoxolona	200	7	22,9 ± 9,4*	85,4
EB	1000	7	11,0 ± 4,2*	93,0

ANOVA  $F_{(2,18)} = 267,5$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan  $*p < 0,001$ .

## 2.2.2. EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO 70% (EB) DAS FOLHAS SECAS E MOÍDAS DE *Mikania laevigata* Schultz. Bip. ADMINISTRADO PELA VIA SUBCUTÂNEA

No modelo de úlcera induzida por etanol o EB, administrado por via subcutânea na dose 700 mg/kg, reduziu o ILU em 40%, enquanto que carbenoxolona, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg, utilizada como controle positivo, produziu redução de 29%. Os resultados, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 14 e na Tabela 6.

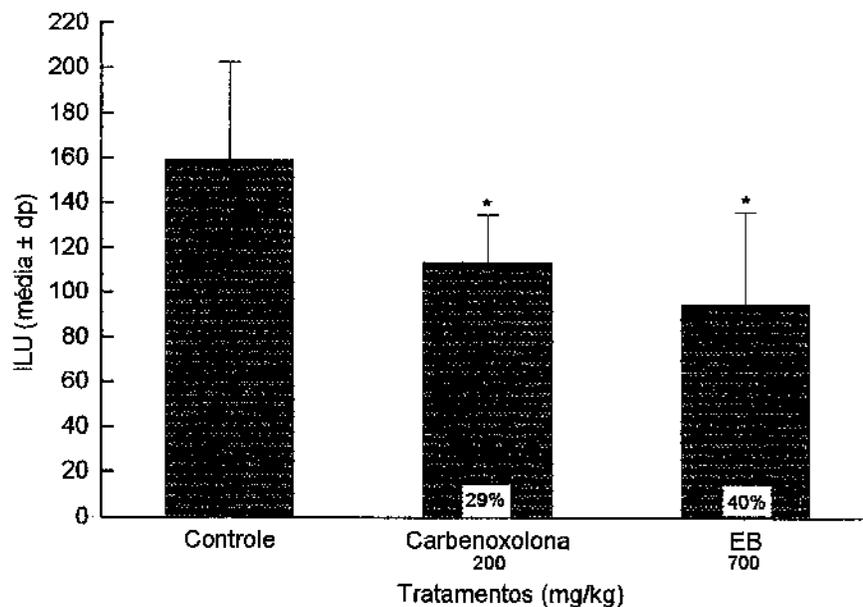


FIGURA 14: Efeito do EB (sc) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da carbenoxolona (sc), em modelo de úlcera induzida por etanol (ANOVA:  $F_{(2,16)} = 5,53$   $p < 0,05$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,05$ ).

TABELA 6: Efeito do EB (sc) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da carbenoxolona (sc), em modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	---	7	158,9 ± 43,7	
Carbenoxolona	200	7	113,7 ± 21,1*	28,5
EB	700	5	95,1 ± 40,8*	40,2

ANOVA  $F_{(2,16)} = 5,53$   $p < 0,05$ . Teste de Duncan  $*p < 0,05$ .

### 2.3. ÚLCERA INDUZIDA POR ESTRESSE

No modelo de úlcera induzida por estresse o EB, administrado 1,0 g/kg (vo), apresentou atividade antiulcerogênica, com redução de 82% das lesões ulcerativas, enquanto que cimetidina, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 71%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 15 e na Tabela 7.

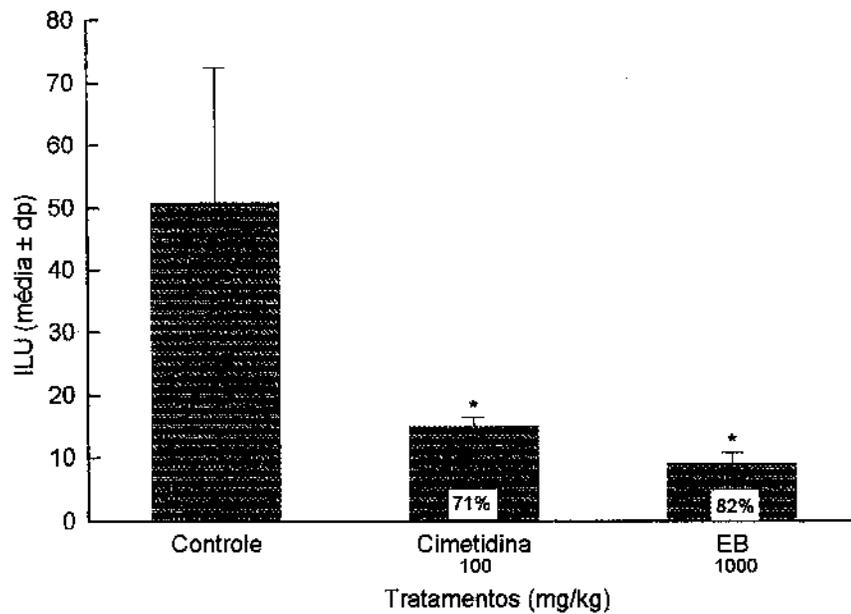


FIGURA 15: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por estresse (ANOVA:  $F_{(2,12)} = 19,64$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,001$ ).

TABELA 7: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina (vo), em modelo de úlcera induzida por estresse.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	---	7	50,8 ± 21,7	
Cimetidina	100	7	15,0 ± 1,4*	70,5
EB	700	5	9,0 ± 1,7*	82,3

ANOVA  $F_{(2,12)} = 19,64$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan \* $p < 0,001$ .

## 2.4. ÚLCERA INDUZIDA POR RESERPINA

No modelo de úlcera induzida por reserpina o EB, administrado na dose 1,0 g/kg (vo), apresentou atividade antiulcerogênica, reduzindo em 54% as lesões ulcerativas, enquanto que atropina, administrada pela mesma via, na dose de 10 mg/kg, utilizada como controle positivo, reduziu o ILU em 51%. Os resultados, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 16 e na Tabela 8.

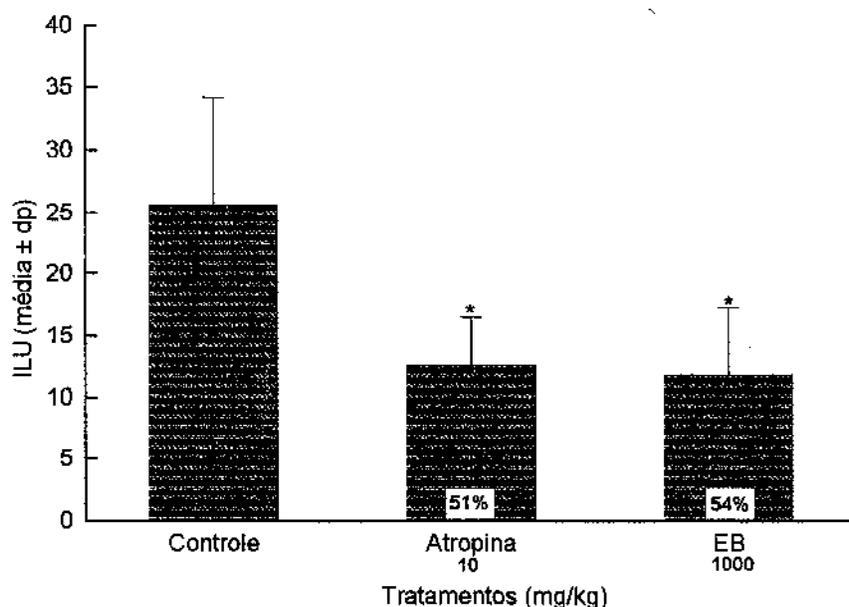


FIGURA 16: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moidas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da atropina (vo), em modelo de úlcera induzida por reserpina (ANOVA:  $F_{(2,14)} = 8,82$   $p < 0,01$ . Teste de Duncan:  $*p < 0,01$ ).

TABELA 8: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da atropina (vo), em modelo de úlcera induzida por reserpina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	—	6	25,7 ± 8,5	
Atropina	10	5	12,6 ± 3,9*	50,9
EB	1000	5	11,8 ± 5,4*	53,9

ANOVA  $F_{(2,14)} = 8,82$   $p < 0,01$ . Teste de Duncan \* $p < 0,01$ .

## 2.5. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de L-NAME na dose de 5 mg/kg por via endovenosa, o EB administrado na dose de 1,0 g/kg (vo), manteve sua atividade antiulcerogênica, inibindo o índice de lesões ulcerativas em 69%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 17 e na Tabela 9.

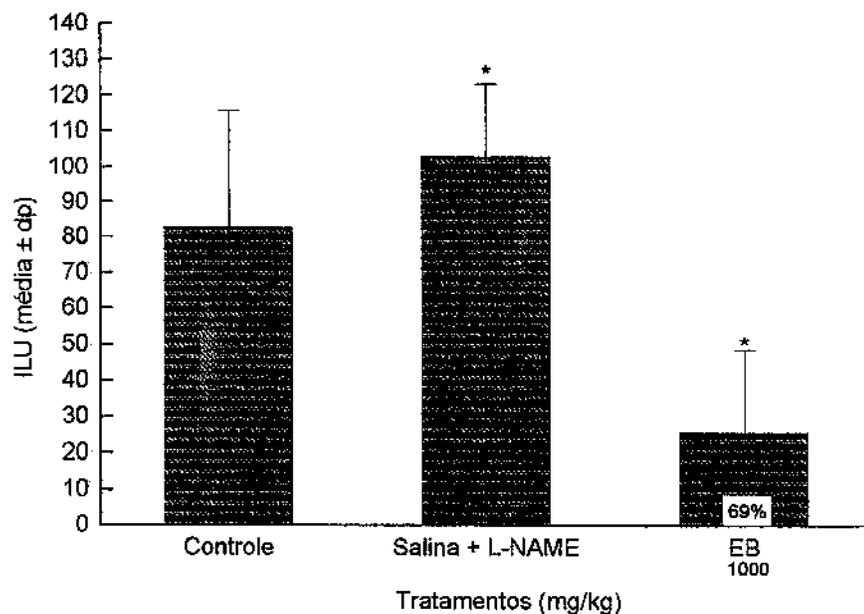


FIGURA 17: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com L-NAME (ANOVA:  $F_{(2,15)} = 17,43$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan:  $*p < 0,001$ ).

TABELA 9: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol ratos tratados previamente com L-NAME.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	---	7	82,7 ± 32,8	
Salina+L-NAME	---	7	102,8 ± 20,3	
EB	1000	5	25,9 ± 22,3*	69,0

ANOVA  $F_{(2,15)} = 17,43$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan  $*p < 0,001$ .

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

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de NEM na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal, o EB na dose de 1,0 g/kg (vo), manteve sua atividade antiulcerogênica, inibindo o índice de lesões ulcerativas em 81%. Os resultados, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 18 e na Tabela 10.

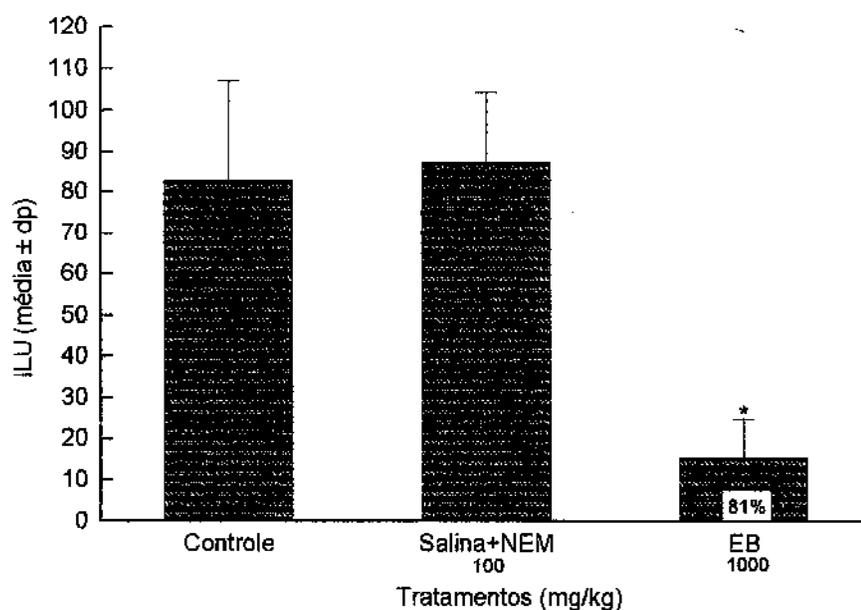


FIGURA 18: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com NEM (ANOVA:  $F_{(2,17)} = 34,51$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan:  $*p < 0,001$ ).

TABELA 10: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com NEM.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	---	7	82,7±24,2	
Salina+NEM	---	7	87,3±16,8	
EB	1000	5	15,4±9,2*	81,4

ANOVA  $F_{(2,17)} = 34,51$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan \* $p < 0,001$ .

## 2.7. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS NA CITOPROTEÇÃO GÁSTRICA

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de indometacina na dose de 5 mg/kg por via intraperitoneal, o EB na dose de 1,0 g/kg (vo), manteve sua atividade antiulcerogênica, inibindo o índice de lesões ulcerativas em 65%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 19 e na Tabela 11.

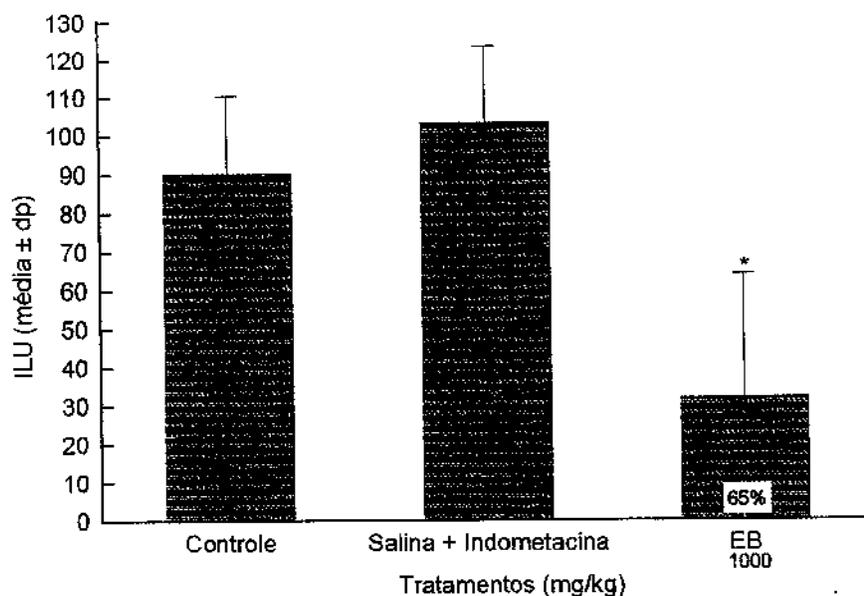


FIGURA 19: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com indometacina (ANOVA:  $F_{(2,11)} = 10,97$   $p < 0,01$ . Teste de Duncan:  $*p < 0,01$ ).

TABELA 11: Efeito do EB (vo) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com indometacina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	ILU (média±dp)	Inibição do ILU (%)
Controle	---	5	90,2 ± 20,2	
Salina+Indometacina	---	5	103,4 ± 20,0	
EB	1000	4	32,0 ± 31,6*	65,0

ANOVA  $F_{(2,11)} = 10,97$   $p < 0,01$ . Teste de Duncan  $*p < 0,01$ .

## 2.8. LIGADURA DE PILORO

No modelo de úlcera induzida por ligadura do piloro o EB, na dose 1,0 g/kg (vo), reduziu o volume da secreção gástrica e a concentração de íons H<sup>+</sup>, em 76% e 53%, respectivamente. A cimetidina, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg, utilizada como controle positivo, não alterou o volume da secreção gástrica, mas foi capaz de reduzir a concentração de íons H<sup>+</sup> em 24%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H<sup>+</sup>, estão demonstrados na Tabela 12.

TABELA 12: Efeito da administração intraduodenal do EB das folhas secas e moidas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	Volume (ml)	H <sup>+</sup> (mEq/l)
Controle	---	7	5,5 ± 1,3	1,7 ± 0,4
Cimetidina	100	7	4,2 ± 1,5	1,3 ± 0,2*
EB	1000	5	1,3 ± 0,2***	0,8 ± 0,6**

ANOVA: Volume:  $F_{(2,16)} = 10,26$   $p < 0,001$ ; H<sup>+</sup>:  $F_{(2,16)} = 5,85$   $p < 0,01$ . Teste de Duncan \* $p < 0,05$

\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

## 2.9. LIGADURA DE PILORO EM RATOS TRATADOS COM HISTAMINA

No modelo de úlcera induzida por ligadura do piloro em ratos tratados com histamina na dose de 25 mg/kg por via subcutânea, o EB, na dose 1,0 g/kg (vo), não alterou nem o volume da secreção gástrica nem a concentração de íons H<sup>+</sup>. A cimetidina, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg, utilizada como controle positivo, reduziu o volume da secreção gástrica e a concentração de íons H<sup>+</sup> em 65% e 38%, respectivamente. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H<sup>+</sup>, estão demonstrados na Tabela 13.

TABELA 13: Efeito da administração intraduodenal do EB das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro em ratos tratados com histamina.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	Volume (ml)	H <sup>+</sup> (mEq/l)
Controle	---	7	2,8 ± 1,4	1,9 ± 0,3
Cimetidina	100	7	1,0 ± 0,4*	1,2 ± 0,5*
EB	1000	5	2,1 ± 0,4	1,9 ± 0,3

ANOVA: Volume:  $F_{(4,20)} = 3,53$   $p < 0,05$ ; H<sup>+</sup>:  $F_{(4,20)} = 3,04$   $p < 0,05$ . Teste de Duncan \* $p < 0,05$ .

## 2.10. LIGADURA DE PILORO EM RATOS TRATADOS COM PENTAGASTRINA

No modelo de úlcera induzida por ligadura do piloro em ratos tratados com pentagastrina na dose de 4µg/kg por via endovenosa, o EB na dose de 1,0 g/kg (vo), reduziu o volume da secreção gástrica em 46%, mas não alterou a concentração de íons H<sup>+</sup>. A cimetidina, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg, utilizada como controle positivo, reduziu o volume da secreção gástrica e a concentração de íons H<sup>+</sup> em 41% e 51%, respectivamente. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H<sup>+</sup>, estão demonstrados na Tabela 154.

TABELA 14: Efeito da administração intraduodenal do EB das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro em ratos tratados com pentagastrina

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	Volume (ml)	H <sup>+</sup> (mEq/l)
Controle	—	7	3,3 ± 1,0	1,1 ± 0,5
Cimetidina	100	7	1,9 ± 0,6*	0,5 ± 0,2*
EB	1000	5	1,8 ± 0,9*	1,3 ± 0,5

ANOVA: Volume:  $F_{(4,20)} = 5,16$   $p < 0,01$ ; H<sup>+</sup>:  $F_{(4,20)} = 5,85$   $p < 0,05$ . Teste de Duncan \* $p < 0,01$ .

## 2.11. LIGADURA DE PILORO EM RATOS TRATADOS COM BETANECOL

No modelo de úlcera induzida por ligadura do piloro em ratos tratados com betanecol na dose de 2,5 mg/kg por via subcutânea, o EB na dose 1,0 g/kg (vo), reduziu o volume da secreção gástrica e a concentração de íons H<sup>+</sup> em 64% e 41%, respectivamente. A atropina, administrada pela mesma via, na dose de 10 mg/kg, utilizada como controle positivo, reduziu o volume da secreção gástrica e a concentração de íons H<sup>+</sup> em 94% e 45%, respectivamente. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H<sup>+</sup>, estão demonstrados na Tabela 15.

TABELA 15: Efeito da administração intraduodenal do EB das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz. Bip. e da cimetidina, em modelo de ligadura de piloro em ratos tratados com betanecol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	Volume (ml)	H <sup>+</sup> (mEq/l)
Controle	---	7	10,8 ± 3,5	1,3 ± 0,5
Atropina	10	7	0,6 ± 0,2**	0,7 ± 0,2*
EB	1000	5	3,8 ± 0,5*	0,8 ± 0,3*

ANOVA: Volume:  $F_{(4,20)} = 18,76$   $p < 0,001$ ; H<sup>+</sup>:  $F_{(4,20)} = 2,95$   $p < 0,05$ . Teste de Duncan \* $p < 0,05$

\*\* $p < 0,001$ .

---

**DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

A úlcera gastroduodenal ainda é um dos problemas de saúde mais comuns (Al Moutaery & Tariq, 1997). O papel dado para o ácido gástrico na patogênese da úlcera gástrica tem mudado significativamente durante os últimos 25 anos. Por décadas acreditou-se que a hipersecreção de ácido era o fator final e dominante na úlcera duodenal e que fatores ulcerogênicos extrínsecos, como estresse, alimentos e condimentos, operassem como estimulantes da secreção ácida. Muitos mecanismos intrínsecos da secreção ácida foram encontrados anormalmente em

pacientes com úlcera duodenal, levando à hipersecreção: um aumento do número de células parietais, da sensibilidade das mesmas frente à estimulação, do impulso vagal e da liberação pós-prandial de gastrina (Hojgaard et al., 1996).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico 70% (EB) das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* em modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos.

Para triagem da atividade antiulcerogênica foi utilizado o modelo de úlcera experimental induzida por indometacina (Morimoto et al. 1991). Este modelo foi escolhido por tratar-se de um dos modelos mais completos, pois abrange os mecanismos de citoproteção e secreção ácida gástrica. A indometacina é um antiinflamatório não esteroide inibidor da ciclooxigenase, que é a enzima que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, que são substâncias importantes na citoproteção gástrica (Katori & Majima, 1997).

Neste modelo, o EB de *Mikania laevigata*, administrado por via oral, reduziu o índice de lesões ulcerativas (ILU) em 85%. A partir de então, buscou-se a dose efetiva 50% (DE<sub>50</sub>), também em modelo de úlcera induzida por indometacina, quando através de regressão linear, chegou-se a uma DE<sub>50</sub> de 691,6 mg/kg.

Existem basicamente dois mecanismos de ação para as drogas antiulcerogênicas. O primeiro deles, refere-se aos mecanismos que aumentam a resistência das células

da mucosa gástrica contra fatores agressivos, como o HCl, a pepsina, a ingestão de etanol e de drogas antiinflamatórias não esteroidais e/ou limitam o acesso destes agentes às células da mucosa. O segundo, refere-se aos mecanismos que controlam o processo de secreção ácida gástrica (Allen et al., 1993).

Inicialmente, averiguou-se a hipótese de um mecanismo de ação envolvendo os fatores denominados citoprotetores da mucosa gástrica. Em modelo de úlcera induzido por etanol absoluto (Robert, 1979), um agente irritante local da mucosa gástrica, o EB de *Mikania laevigata*, administrado por via oral, reduziu o ILU em 93%. Existia a hipótese desta atividade ser devida a uma ação local e inespecífica, denominada citoproteção adaptativa, atividade esta devido à capacidade de algumas substâncias, consideradas irritantes moderadas da mucosa gástrica, possuírem de induzir a produção de prostaglandinas, substâncias endógenas, de fundamental importância no processo de citoproteção (Robert et al., 1983).

No sentido de averiguar esta possibilidade, utilizou-se o modelo de úlcera induzida por etanol absoluto porém, foi selecionada uma via parenteral, a subcutânea, e observou-se que o EB de *Mikania laevigata* manteve a redução do ILU, porém em 40%. Este fato reforçou a hipótese que o EB de *Mikania laevigata* apresenta um atividade antiulcerogênica sistêmica, através de mecanismo de ação específico.

Algumas drogas simpatolíticas apresentam atividade antiulcerogênica em modelo experimental de úlcera induzida por reserpina, especialmente os bloqueadores dos

receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. A reserpina promove uma depleção de catecolaminas e, para compensar esta estimulação adrenérgica, ocorre uma descarga vagal, com consequente liberação de acetilcolina, um dos mediadores da secreção ácida gástrica. Drogas anticolinérgicas como a atropina, também apresentam atividade antiulcerogênica neste modelo (Gupta et al., 1974).

Neste modelo o EB de *Mikania laevigata*, administrado oralmente, na dose de 1 g/kg, apresentou uma redução do ILU em torno de 50%. Este resultado poderia sugerir uma ação anticolinérgica, esta hipótese foi averiguada em modelo experimental de úlcera gástrica por estresse e ligadura do piloro, onde neste último foi possível estudar a influência sobre a secreção ácida gástrica.

Para reafirmar ainda a possibilidade da ação anticolinérgica observada em modelo de úlcera experimental induzida por reserpina, utilizou-se o modelo de úlcera induzida por estresse, que apresenta um mecanismo indutor de lesões gástricas semelhante ao da reserpina (Levine et al., 1971). Os resultados obtidos demonstraram que o EB de *Mikania laevigata* foi capaz de reduzir o ILU em 82%, sugerindo uma ação anticolinérgica.

Grandes concentrações de glutathiona reduzida (substâncias sulfidríla não proteíca) são encontradas na mucosa gástrica e sabe-se que a presença destas substâncias está intimamente relacionada com a citoproteção gástrica, por impedir um aumento da permeabilidade vascular e ainda por bloquear a ação de radicais livres tóxicos

para as células da mucosa – ação antioxidante (Szabo, 1981; Takeuchi et al., 1989; Martin et al., 1998).

Para avaliar a participação deste grupo de substâncias na citoproteção gástrica, ratos foram tratados previamente com N-etilmaleimida, na dose de 10 mg/kg por via subcutânea, e então as lesões ulcerativas foram induzidas por etanol absoluto no volume de 1,0 ml/animal por via oral. A N-etilmaleimida é um composto que promove alquilação dos grupos sulfidríla não protéicos, presentes na mucosa gástrica, inativando-os (Takeuchi et al., 1989). Embora estes grupos estivessem alquilados, o EB de *Mikania laevigata* reduziu o ILU em 81%. Este resultado sugere que o mecanismo antiulcerogênico do EB de *Mikania laevigata* não está envolvido com a participação destes agentes antioxidantes.

Outro componente envolvido na citoproteção gástrica é o óxido nítrico, que desenvolve seu efeito protetor por promover vasodilatação e conseqüentemente um aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Este efeito proporciona uma aceleração da retirada dos íons  $H^+$  nocivos à mucosa gástrica e ainda aumento da oferta de nutrientes para mesma. Foi utilizado modelo de úlcera induzido por etanol absoluto em ratos tratados previamente com L-NAME (éster dimetilico de N(G)-nitro-L-arginina) para avaliar a participação do óxido nítrico na citoproteção gástrica. O L-NAME é um inibidor da NO-sintase, enzima responsável pela síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina (Konturek et al., 1995; Kato et al., 1998). Neste experimento observou-se que o EB de *Mikania laevigata* reduziu o ILU em 69%, embora a síntese

do óxido nítrico estivesse inibida, sugerindo então que a ação antiulcerogênica parece não estar envolvida com a via deste mediador.

As prostaglandinas pertencem a uma classe de substâncias das mais importantes no processo da citoproteção gástrica. Para avaliar-se a participação deste grupo de substâncias, utilizou-se o modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de indometacina (mecanismo de ação ulcerogênico discutido anteriormente, de acordo com Katori & Majima, 1997). Na dose de 5 mg/kg, administrada por via intraperitoneal, a indometacina não produz ulceração por si própria, mas potencializa aquelas causadas por etanol absoluto (Konturek et al., 1995). Neste modelo, observou-se que o EB de *Mikania laevigata* manteve a redução do ILU, porém em torno de 65%, sugerindo que as prostaglandinas não estão envolvidas no mecanismo de ação antiulcerogênico do EB da *Mikania laevigata*.

Dando sequência à investigação do mecanismo de ação, foi averiguada a hipótese de uma ação antissecretória do EB de *Mikania laevigata*, através do modelo experimental de ligadura do piloro em ratos (Shay et al., 1945). Foram avaliados os parâmetros como volume e concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico dos animais tratados com o EB de *Mikania laevigata* por via intraduodenal, na dose de 1g/Kg. Neste modelo experimental, observou-se uma redução do volume em torno de 76% e da concentração hidrogeniônica em torno de 53%, sugerindo uma ação antissecretória do EB de *Mikania laevigata*.

Na secreção ácida gástrica estão envolvidos os mediadores como histamina, gastrina e acetilcolina (Borocelly et al., 1997). Então, utilizou-se o modelo de ligadura do piloro com administração destes secretagogos em experimentos distintos, após a administração intraduodenal do EB de *Mikania laevigata*. Com a administração de histamina, um autacóide que aumenta a secreção ácida gástrica, através de estimulação dos receptores H<sub>2</sub> presentes nas células parietais da mucosa gástrica (Black et al., 1972; Hersey & Sachs, 1995), o EB de *Mikania laevigata* não alterou, de forma significativa, o volume e a concentração hidrogeniônica.

A pentagastrina é a extremidade funcional da molécula de gastrina, a qual foi acrescentado uma β-alanina substituída. Este composto age sobre os receptores CCK-B de gastrina, aumentando a liberação de ácido gástrico e ainda estimula a secreção de histamina das células enterocromafins (Hersey & Sachs, 1995). Quando este secretagogo foi administrado endovenosamente na dose de 4 µg/kg, nas mesmas condições descritas acima, o EB de *Mikania laevigata* não alterou, de forma significativa, o volume e a concentração hidrogeniônica da secreção ácida gástrica.

Com a administração de betanecol na dose de 2,5 mg/kg por via subcutânea, observou-se uma redução de 64% do volume e de 41% da concentração hidrogeniônica da secreção ácida gástrica. O betanecol é um agonista seletivo para receptores muscarínicos, que estão envolvidos no aumento da secreção ácida gástrica (Angus & Black, 1982). O resultado obtido com a administração deste secretagogo, sugeriu uma ação antiulcerogênica do EB de *Mikania laevigata* por

uma atividade anticolinérgica, confirmando os resultados obtidos nos modelos experimentais de úlcera gástrica induzida por reserpina e estresse.

A análise cromatográfica (CCD) do EB da *Mikania laevigata* apresentou uma mancha principal quando revelada na luz ultravioleta (254 nm) com Rf 0,58 (T:Ac 70:30) que foi atribuída a cumarina<sup>1</sup>. Outras substâncias com características de terpenos foram observadas após revelação com solução de anisaldeído.

O EB quando analisado por CG-EM apresentou diversas substâncias, sendo possível constatar a presença da cumarina<sup>1</sup> e da diidro-cumarina<sup>2</sup>. Também foram caracterizados diversos compostos com  $t_R$  entre 24,00 a 30,0 min. A análise dos seus respectivos espectros de massas revelaram a presença de diterpenos com peso molecular variando de 172 a 302 ( $C_{20}H_{32}$ ;  $C_{20}H_{30}O_2$ ), com a seguinte estrutura básica:

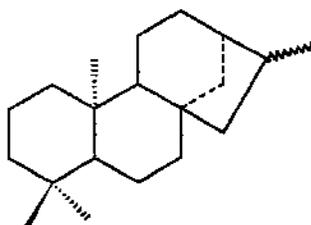


FIGURA 20: Estrutura básica dos compostos diterpênicos presentes no EB de *Mikania laevigata* Schultz Bip.

A purificação do EB por coluna cromatográfica permitiu isolar a cumarina<sup>1</sup> e submetê-la aos testes farmacológicos. A cumarina não é uma substância inédita, podendo ser adquirida comercialmente (ex. Aldrich).

Segundo informações não publicadas de que, alguns laboratórios de manipulação e pequenas indústrias farmacêuticas utilizam a cumarina (4(1H)-benzopirona) presente no EB de *Mikania laevigata*, como marcador da atividade broncodilatadora, foi averiguada a possibilidade desta substância estar envolvida com a atividade antiulcerogênica apresentada pelo EB de *Mikania laevigata*. Através do modelo experimental de úlcera induzida por indometacina, os animais foram tratados por via oral com a cumarina na dose de 100 mg/kg e observou-se que houve uma redução de 90% do ILU, sugerindo, portanto, que a cumarina isolada do EB de *Mikania laevigata* pode ser um dos princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica observada.

Neste modelo a DE<sub>50</sub> para a cumarina foi de 60,7 mg/Kg, obtida através de regressão linear da curva dose-efeito.

Além do estudo do mecanismo de ação da cumarina isolada do EB, a continuidade deste trabalho terá como objetivo o isolamento de outras substâncias presentes no EB de *Mikania laevigata*, como por exemplo os diterpenos e a sua possível participação na atividade antiulcerogênica.

---

**CONCLUSÃO**

## CONCLUSÃO

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

- O tratamento de ratos com EB obtido das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz Bip. reduziu as lesões produzidas nos diversos modelos de úlcera gástrica utilizados;
- Essa atividade antiulcerogênica parece não ser mediada pelo óxido nítrico, pela PGE<sub>2</sub> ou pelos grupos sulfidril não proteicos;
- O estudo do mecanismo de ação, em modelos de ligadura do piloro, sugeriu um efeito anti-secretório, provavelmente mediado por uma ação anticolinérgica;
- Os testes de atividade da Cumarina isoladas do EB obtido das folhas secas e moídas de *Mikania laevigata* Schultz Bip., revelou que esta substância é um dos princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica.

---

**SUMMARY**

## SUMMARY

Plants from the *Mikania* genera are distributed throughout tropical regions of Africa, Asia and South America (Argentina, Paraguay and Uruguay). In Brazil they are mainly found in the south and southeast regions. They are popularly known as guaco and develop as woody shrubs with cylindrical and branchy stems. The leaves are used in folk medicine as healing agent, antiespasmotic, antireumatic, antivenim.

The objective of this work was to evaluate the antiulcerogenic activity of crude 70% hydroalcoholic extracts and cumarines isolated from *Mikanea laevigata* Schults Bip., and suggest a possible pharmacological mechanism.

The crude extracts were obtained from the species mentioned above. The crude extract demonstrated antiulcerogenic activity in indometacine induced ulcer model.

In ethanol induced model the when administrated orally or subcutaneously presented antiulcerogenic activity. These results suggest that a specific and systematic effect are caused by *Mikania laevigata* Shultz Bip.

Some cytoprotective mechanisms were evaluate. Among them, the participation of nitric oxide, an endogenous substance that promoted vasodilatation , increasing the local blood flow. In ethanol induced ulcer model previously treated with L-name, an NO synthase inhibitor, the crude ethanol extract maintained the antiulcerogenic activity suggesting that the activity isn't related to the nitric oxide.

Another hypothesis is the interference of mucus non protein sulfydriil groups. These substances probably promote a decrease of the vascular permeability increase or inhibit free radical action on the mucus. To check this out, ethanol induce ulcer model in rats was employed in animals previously treated with N-ethylimide, an alkylating compound of sulfydriil groups. Oral administration of the *Mikania laevigata*, crude extract maintained the activity suggesting that this group isn't involved in the pharmacological activity in question.

Another important group of endogenous substances in cytoprotection are the prostaglandin, that increase mucus and bicarbonate secretion. In ethanol induced ulcer model with previous indometacine treatment, an non steroid anti-inflammatory that inhibits the enzyme responsible for prostaglandin synthesis, the crude extract maintained the antiulcerogenic activity. So seems that this group of substances are not involved in the activity caused by *Mikania laevigata* Shultz Bip.

From this point the antisecretory activity of the crude extract was evaluated employing pyloric ligation model. Intraduodenal treatment with the crude extract significantly

modified the volume and hydrogen concentration of the treated animals. This suggests that *Mikania laevigata* Shultz Bip., has antisecretory activity.

Under these conditions the influence of the crude extracts on secretagogue activity involved in gastric acid secretion was evaluated. On pyloric ligation model in rats treated with histamine, a gastric acid secretion mediator, the crude ethanol extract didn't significantly reduce the gastric contents of hydrogen concentration, suggesting that this pathway hasn't any participation in the antisecretory mechanism.

Pentagastrine administration, the functional part of gastrin molecule was used on pyloric ligation model to evaluate gastrin participation. With this model the crude extract also didn't significantly reduce the hydrogen concentration of gastric contents, suggesting no gastrin participation.

Lastly the influence of bethanechol, a potent cholinergic agonist on secretions had its activity significantly reduced by the crude extract of *M laevigata*. Both volume and hydrogen concentration produced by bethanechol were reduced.

The coumarin isolated from *M laevigata* on indometacin induced ulcer model presented antiulcerogenic activity.

These results suggest that *M laevigata* crude ethanol extract present antiulcerogenic activity by an antisecretory mechanism, probably by an anticholinergic pathway and the isolated coumarin also seems to participate in this activity.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Moutaery, A .R. & Tariq, M., Effect of quinacrine, a phospholipase A2 inhibitor on stress and chemically induced gastroduodenal ulcers, **Digestion**, **58**:129-137, 1997.

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

Andersson, K., Linstrom, E., Chen, D., Monstein, H.J., Boketoft, A. & Hakanson, R.,  
Depletion of enterochromaffin-like cell histamine increases histidine  
decarboxylase and chromogranin A mRNA levels in rat stomach by a gastrin-  
independent mechanism, **Scand J Gastroenterol**, **31**: 959-965, 1996.

Angus, J.A. & Black, J.W. The interaction of choline esters, vagal stimulation and H<sub>2</sub>  
receptor blockade on acid secretion in vivo, **Eur J Pharmacol** **80**: 217-224, 1982.

Arquiola, E., Guerra, D.G., Montiel, L., A úlcera gastroduodenal. História de uma  
doença, Barcelona: Doyma, Rio de Janeiro: Glaxo do Brasil S/A . Copyright, 1987.

Bauer, R.F., Bianchi, R.G., Casler, J. & Goldstein, B. Comparative mucosal protective  
properties of misoprostol, cimetidine and sucralfate. **Digestive Diseases and  
Sciences**, **31 (2)**: 81S-85S, 1986.

Black, J. W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R. & Parsons, E.M.  
Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub> receptors. **Nature**, **236**: 385-390, 1972.

Borocelli, E., Chiavarini, M., Ballabeni, V., Barlocco, D., Vianello, P. & Dal Piaz, V.,  
Impicciatore, M., Study of the antisecretory and antiulcer mechanisms of a new  
indenopyridazinone derivative in rats, **Pharmacological Research**, **35(5)**: 487-  
492, 1997.

Castro, V., Jakupovic, J. & Bohlmann, F. Sesquiterpene lactones from *Mikania* species, **Phytochemistry**, **25 (7)**:1750-1752, 1986.

Clissold, S.P. & Campoli-Richards, D.M. Omeprazole: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in peptic ulcer disease and Zollinger-Ellison syndrome, **Drugs**, **32**: 15-47, 1986.

Cover, T.L., & Blaser, M.J., *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease, **Annu Rev Med.**, **43**:135-145,1992.

Cuenca, M. D. D., Borkosky, S., Catlán, C. A. N. , Goedken, V. L., Díaz, J. G. e Herz, W. Sesquiterpene lactones of *Mikania minima*. **Phytochemistry**, **32(6)**:1506-1513, 1993.

Cuenca, M. D. D., Borkosky, S., Catlán, C. A. N. , Goedken, V. L. Diaz, J. G. & Herz, W. A cadinanolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania haenkeana*. **Phytochemistry**, **31(10)**: 3521-3525, 1992.

Davino, S. C., Giesbrecht, A. N. e Roque, N. F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. **Brazilian J. Med. Bio. Res.**, **22**:1127-1129, 1989.

Diaz, J. G., Goedecken, V. L. & Herz, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Mikania rimachii* and *Mikania microptera*. **Phytochemistry**, **31 (2)**: 597-608), 1992.

Ding, X.Q. & Hakanson,R., Evaluation of the specificity and potency of series of cholecystinin- B/gastrin receptor antagonists *in vivo*, **Pharmacology & Toxicology**, **79**: 124-130, 1996.

Eberhart, C.E. & Dubois, R.N. Eicosanoides and gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, **109**: 285-301, 1995.

Elliot, S.N., MsKnight, W., Cirino, G & Wallace, J. L. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, **109**: 524-530, 1995.

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.

Goodwin, C.S., *Helicobacter pylori* gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer: clinical and molecular aspects, **Clinical Infectious Diseases**, **25**: 1017-1019, 1997.

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

Graham, D.Y., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Helicobacter pylori*, and ulcers: where we stand?, **The American Journal of Gastroenterology**, **91(10)**: 2080-2086, 1996.

Gupta, M.B., Tangri, K.K., Bhargava, K.P. Mechanism of ulcerogenic activity of reserpine in albino rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **27**: 269-271, 1974.

Gupta, P. M. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas, Programa Iberoamericano de Ciência Y Tecnologia para El Desarrollo, Subprograma de Química Fina Farmacêutica, 125-125, 1994.

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

Hamburger, M.; Marston, A & Hostettmann, K. - Search for new drugs of plant origin. **Advances in Drug Research**, **20**: 167-169, 1991.

Hermansson, M., Stael Von Holstein, C., Zilling, T., Peptic ulcer perforation before and after the introduction of H<sub>2</sub>- receptor blockers and proton pump inhibitors, **Sand J Gastroenterol**, **32**: 523-529, 1997.

Hersey, S.J. & Sachs, G., Gastric acid secretion, **Physiological Reviews**, **75( 1)**: 155-188, 1995.

Herz, W., & Santhanam, P. S. Isolation, Structure and synthesis of 4',5,6,7-tetrahydroxy-3''-methoxyflavone (batafolin), a new flavone from *Mikania batatifolia* DC, **Tetrahedron Letters**, **39**: 3419-3421, 1969.

Herz, W., Subramaniam, P. S., Santhanam, P. S., Aota, K. & Hall, A. L. Structure elucidation of sesquiterpene dilactones from *Mikania sandens* (L.) Wild., **J. Org. Chem.** **35(5)**: 1453-1464, 1970.

Hirschowitz, B.I., Keeling, D., Lewin, M., Okabe, S., Parsons, M., Sewing, K., Wallmark, B. & Sachs, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Digestive Diseases and Sciences**, **40 (2)**: 3S-23S, 1995.

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

Kato,S., Kitamura, M., Korolkiewicz, R.P., Takeuchi, K., Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor, **Br J Pharmacol**, **123(5)**: 839-846, 1998.

Kato,S., Yayoi, A ., Konishi, M., Kuroda, N., Takeuchi, K., Mechanism of gastric hyperemic response during acid secretion in rats: relation to nitric oxide,

- prostaglandins, and sensory neurons, **J Clin Gastroenterol**, **25**:suppl.1: s48-s55, 1997.
- Katori, M. & Majima, M., Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors, **Nippon Yakurigaku Zasshi**, **109 (6)**: 247-258, 1997.
- Kiang, A. K., Sim, K. Y. e Goh, J. Constituents of *Mikania cordata* (Burm.f.) B. L. Robinson (Compositae). Isolation of mikanin, epifriedelinol, and fumaric acid; the structure of mikanin., **J. Org. Chem.**, 6371-6374, 1965
- Knudsen, F.S., Vilegas, W., Oliveira, F. & Roque, N. F. Pimaradiene diterpenes from *Mikania triangularis*, **Phytochemistry**, **25 (5)**: 1240-1242, 1986.
- Konturek, P.C., Brzozowski, T., Konturek, S.I., Márquez, M., Torres, J., Ortiz, J. a ., Studies on the cytoprotective and antisecretory activity of ebrotidine. A review, **Arzneimittelforschung**, **47(4 A)** : 578-589, 1997.
- Konturek, S.J., 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.

Leite, M. G. R., Da Silva, M. A. M., Lino, C. S., Viana, G. S. B. & Matos, F. J. A. Abstracts 021, **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, *Anais*. U. F. Paraná, Curitiba, 1992.

Levine, R.J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: C.J. Pfeiffer (Ed.), *Peptic Ulcer*, Munksgaard, Kopenhagen, pp.92-97, 1971.

Lewis, D.A. & Hanson, P.J., Anti-ulcer drugs of plant origin, **Progress in Medicinal Chemistry**, **28**: 201-231, 1991.

Lobitz, G. O., Castillo, G. T. & Merfor, I. Diterpenes and sesquiterpenes from *Mikania banisteriae*, **Phytochemistry**, **46 (1)**:161-164, 1997.

Maia, J. G. S.; Da Silva, M. L.; Luz, A. I. R., Zoghbi, M. G. B. & Ramos, L. S. Essential oils of some Amazonian *Mikania* species, **Phytochemistry**, **23 (10)**: 2374-2376, 1984.

Marshall, B.J., *Helicobacter pylori*, **Am J Gastroenterol**, **89**: s116-s128, 1994.

Mathur, S. B. & Fermin, C. M.. Terpenes of *Mikania mongenansis*. **Phytochemistry**, **12**: 226-227, 1973.

Martin, M.J., La Casa, C., Alarcón de la Lastra, C., Cabeza, J., Villgas, I., Motilva, V.,  
Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin, **Z  
Naturforsch [C]**, **53 (1-2)**: 82-88, 1998.

Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S. & Takayuki, S. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japan. J. Pharmacol**, **57**: 495-505, 1991.

Motilva, V., López, A ., Martín, M.J., La Casa, C., Alarcón de la Lastra, C.,  
Cytoprotective activity of cisapride on experimental gastric mucosal lesions induced by ethanol. Role of endogenous prostaglandins, **Prostaglandins**, **52**: 63-74, 1996.

Oliveira, F., Alvarenga, M. A., Akisue, G. & Akisue, M. K. Isolamento e identificação de compostos químicos de *Mikania glomerata* Spreng e de *Mikania laevigata* Shultz Bip. Ex Baker. **Rer. Farm Bioquim. Univ. S. Paulo**, **20**: 169-183, 1984.

Oliveira, F., Saito, M. L. & Garcia, L. O. Caracterização cromatográfica do extrato líquido de *Mikania glomerata* Sprengel. Abstracts 096, **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, *Anais*. U. F. Paraná, Curitiba, Brasil, 1992.

Pal, S., Bhattacharya, S., Chaudhuri, A. K.N., The effects of *Mikania cordata* (Burm) B.L.Robins. root extract on gastro-duodenal ulcer models in rats and guinea pigs, **Phytotherapy Research**, **2(4)**, 1988.

Pereira, N. A., Pereira, B. M. R., Nascimento, M.C., Parente, J. P. & Mors, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Med**, **60**:99-100, 1994.

Pio Corrêa, M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Vol. 3, pp.517-520. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1942.

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

Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Davis, J.P., Field, S.O. & Hanchar, A.J. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. **Am. J. Physiol**, **245**: G113-G121, 1983.

Sachs, G., Carlsson, E., Londberg, P., Wallmark, B. Gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase as therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, **28**:269-284, 1988.

Salam, O . A ., Szolecsányi, J., Mózsik, G., Capsaicin and the stomach. A review of experimental and clinical data, **J Physiology**, **91**: 151-171, 1997.

Schubert, M.L. 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.

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

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

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.

Tari, A., Hamada, M., Kamiyasu, T., Sumii, K., Haruma, K., Inoue, M., Kishimoto, S., Kajiyama, G., Walsh, J.H., Effect of enprostil on omeprazole- induced hypergastrinemia and inhibition of gastric acid secretion in peptic ulcer patients, **Digestive Diseases and Sciences**, **42(8)**: 1741-1746, 1997.

Thompson, A. C. & Nicollier, G. Essential oil and terpenoides of *Mikania micrantha*, **Phytochemistry**, **20 (11)**: 2587-2588, 1981.

Vilegas, J. H. Y., Marchi, E. & Lanças, F. Determination of Coumarin and Kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ("Guaco") Leaves by Capillary Gas Chromatography, **Phytochemical Analysis**, **8**: 74-77, 1997.

Vuyyuru, L., Schubert, M.L., Harrington, L., Arimura, A., Makhlouf, G.M., Dual inhibitory pathways link antral somatostatina and histamine secretion in human, dog, and rat stomach, **Gastroenterology**, **109**: 1566-1574, 1995.

Wallace, J.L., & Chin, B.C., Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury, **P.S.E.B.M.**, **214**:192-203,1997.

Walsh, J.H., Peptides as regulators of gastric acid secretion, **Ann. Ver. Physiol**, 50:  
41-63, 1988.

Wingate, D.L. Neurophysiology of the gastrointestinal tract. **The Gastroenterology  
Ann**, 3: 258-283, 1986.