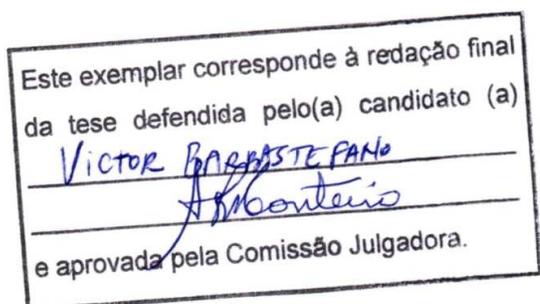


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Victor Barbastefano

ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE EXTRATOS  
BRUTOS, FRAÇÕES SEMI-PURIFICADAS E  
SUBSTÂNCIA ATIVA DE DUAS ESPÉCIES DO  
GÊNERO VERNONIA: *Vernonia polyanthes* e *Vernonia  
ferruginea*



Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Fisiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alba Regina Monteiro Souza Brito



Campinas/SP  
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**B232a**

Barbastefano, Victor

Atividade antiulcerogênica de extratos brutos, frações semi-purificadas e substância ativa de duas espécies do gênero *Vernonia*: *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea* / Victor Barbastefano. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1. Úlcera gástrica. 2. *Vernonia polyanthes*. 3. *Vernonia ferruginea*. 4. Lupeol. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Antiulcerogenic activity of crude extracts, fractions and active compound from the species *Vernonia polyanthes* and *Vernonia ferruginea*.

**Palavras-chave em inglês:** Gastric ulcer; *Vernonia polyanthes*; *Vernonia ferruginea*; Lupeol.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Alba Regina Monteiro Souza Brito, Helena Coutinho Franco de Oliveira, Lourdes Campaner dos Santos, Elfriede Marianne Bacchi, Nelson Adami Andreollo.

**Data da defesa:** 23/02/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

## BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alba Regina Monteiro Souza Brito

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

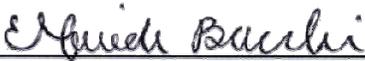
Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Coutinho Franco de Oliveira

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elfriede Marianne Bacchi

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lourdes Campaner dos Santos

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Data da defesa: 23/02/2007

Aos meus pais...  
... eternos heróis

## Agradecimentos

*Este trabalho não teria sido elaborado sem o auxílio de diversas pessoas e instituições, às quais quero expressar meus sinceros agradecimentos. Adianto, porém, que não cito pelo nome todas as pessoas as quais gostaria de agradecer. Certamente acabaria por esquecer de alguém, o que seria injusto.*

*Começo então agradecendo ao acaso (Deus) que conspirou e me trouxe até aqui...*

*À toda minha família, especialmente meu pai e minha mãe, por todo amor e apoio incondicional que me foi oferecido por toda minha vida...*

*À minha orientadora, grande amiga e profissional, um exemplo de pessoa. Alba: "a orientadora"...*

*À equipe do laboratório de Produtos Naturais! Não vou citar nomes porque foram muitos os que já passaram por ele, e é certo que esquecerei de alguém. Uma página de agradecimentos seria pouco para citar e comentar sobre cada um de vocês... àqueles que sempre me apoiaram, não só nos experimentos, mas em todo o resto, meus sinceros agradecimentos...*

*Ao grande Bitá (apelido Vinícius), companheiro desde os tempos de graduação, e à grande Ana Beatriz, minha primeira tutora dentro do laboratório...*

*À Maíra e Anderson!!! Se a Alba é minha mãe científica, estes são meus irmãos!...*

*À Priscila, por tornar cada momento (exceto meu 1º ano de doutorado, pois ainda não te conhecia!) do meu doutorado muito mais agradável e feliz. Meu porto seguro...*

*Aos meus amigos, todos eles, da Biologia (Jair, Miriam, Chan, etc...), da UNICAMP, de Campinas, de Repúblicas e principalmente os de Salvador (Jivago, Rafael Jesuíno, Ricardo, Nunes, Diego, etc... etc...)! Recuso-me a escrever mais que isso, a importância de vocês é óbvia...*

*Aos docentes e colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp...*

*Aos docentes e colegas do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, em especial às amigas e professoras Clélia e Cláudia e ao grande Hélio Kushima...*

*Aos docentes e colegas do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, em especial ao amigo e professor Wagner Vilegas e a toda sua competente equipe. Miriam, Lourdes e Daniel, pesquisadores com quem mais tive contato, muito obrigado por tudo...*

*Aos membros da banca examinadora, pelo interesse e dedicação na análise desta tese e pelas sugestões apresentadas...*

*Ao vendedor e amigo Tadeu...*

*Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica e da Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular; trabalhar com vocês foi muito gratificante...*

*Aos animais, as plantas e à população brasileira, por exercerem papel fundamental para o desenvolvimento da ciência...*

*Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro à minha formação científica.*

## Epígrafe

*"[...] Tudo é um entre um milhão de caminhos. Portanto, você deve sempre manter em mente que um caminho não é mais do que um caminho; se achar que não deve segui-lo, não deve permanecer nele, sobre nenhuma circunstância. Para ter uma clareza dessas, é preciso levar uma vida disciplinada. Só então você saberá que qualquer caminho não passa de um caminho, e não há afronta, para si nem para os outros, em largá-lo se é isso o que seu coração lhe manda fazer. Mas sua decisão de continuar no caminho ou largá-lo deve ser isenta de medo e de ambição. Eu lhe aviso. Olhe bem para cada caminho, e com propósito. Experimente-o tantas vezes quanto achar necessário. Depois, pergunte-se, e só a si, uma coisa. Essa pergunta é uma que só os muito velhos fazem. Meu benfeitor certa vez me contou a respeito, quando eu era jovem, e meu sangue era forte demais para poder entendê-la. Agora eu a entendo. Dir-lhe-ei qual é: Esse caminho tem coração? Todos os caminhos são os mesmos: não conduzem a lugar algum. São caminhos que atravessam o mato, ou que entram no mato. Em minha vida posso dizer que já passei por caminhos compridos, compridos, mas não estou em lugar algum. A pergunta de meu benfeitor agora tem um significado. Esse caminho tem um coração? Se tiver, o caminho é bom; se não tiver, não presta. Ambos os caminhos não conduzem a parte alguma; mas um tem coração e o outro não. Um torna a viagem alegre; enquanto você o seguir, será um com ele. O outro o fará maldizer sua vida. Um o torna forte; o outro o enfraquece."*

Carlos Castañeda  
em "A Erva do Diabo", 1968

## Sumário

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE FLUXOGRAMAS, FIGURAS E TABELAS .....	xvi
I. INTRODUÇÃO .....	01
1. Considerações iniciais .....	01
1.1. Plantas medicinais – Biodiversidade e Medicamentos.....	01
1.2. Atividade Antiulcerogênica .....	03
1.3. Terapêutica Atual e Perspectivas.....	05
1.4. Fatores protetores da mucosa gástrica .....	06
1.4.1. Prostaglandinas.....	06
1.4.2. Óxido Nítrico (NO) .....	08
1.4.3. Grupamentos sulfidrila (SHs).....	09
1.4.4. Somatostatina .....	09
1.4.5. Muco e bicarbonato .....	10
1.4.6. Corticosteróides .....	11
1.4.7. Fluxo sanguíneo.....	12
1.4.8. Sistema antioxidante.....	13
1.4.9. Inibição da infiltração de neutrófilos.....	13
1.4.10. Reconstituição do epitélio gástrico.....	14
a) Heat Shock Protein (HSP) .....	15
b) Proliferação celular (PCNA) .....	16
1.5. Terpenóides na terapêutica .....	16
1.5.1. Lupeol.....	19
1.6. Espécies estudadas.....	21
II. OBJETIVOS .....	25
III. MATERIAL E METODOS.....	26
3. Coleta das espécies .....	26
3.1. Preparação dos extratos brutos e frações .....	26
3.2. Triagem fitoquímica dos extratos e identificação do constituinte ativo .....	28

3.3. Animais.....	29
3.4. Drogas utilizadas .....	29
3.5. Procedimentos experimentais .....	29
3.6. Toxicidade sub-crônica.....	30
3.7. Úlcera aguda induzida por etanol absoluto.....	31
3.8. Úlcera aguda induzida por Piroxicam (DAINE) .....	31
3.9. Determinação da secreção ácida.....	31
3.10. Determinação do muco aderido à mucosa gástrica.....	32
3.11. Determinação da PGE <sub>2</sub> produzida na mucosa gástrica.....	32
3.12. Envolvimento do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção .....	33
3.13. Envolvimento do grupamento sulfidrila (SH) na citoproteção.....	33
3.14. Atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	33
3.15. Úlcera crônica induzida por ácido acético.....	34
3.16. Análise histológica.....	34
3.17. Imunohistoquímica .....	35
3.18. Análise estatística .....	35
IV. RESULTADOS.....	36
4.1. <i>Vernonia polyanthes</i> Less.....	36
a) Triagem fitoquímica.....	36
b) Atividade antiulcerogênica .....	37
c) Mecanismos de ação .....	42
4.2. <i>Vernonia ferruginea</i> Less. ....	43
a) Triagem fitoquímica.....	43
b) Atividade antiulcerogênica .....	44
c) Mecanismos de ação .....	49
4.3. Lupeol.....	50
a) Identificação química.....	50
b) Atividade antiulcerogênica .....	53
c) Mecanismos de ação .....	56
V. DISCUSSÃO .....	66
VI. CONCLUSÕES.....	77
VII. PERSPECTIVAS.....	81
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82

O gênero *Vernonia* (Asteraceae) compreende cerca de 1000 espécies, figurando como o gênero mais representativo da sua família. Do ponto de vista sistemático, *Vernonia* é um dos gêneros mais complexos da família Asteraceae, principalmente pela extrema diversidade de formas biológicas que exhibe, desde pequenas ervas até grandes árvores. O gênero possui um grande potencial farmacológico e é sempre mencionado em trabalhos etnofarmacológicos. Só no banco de dados Pubmed o termo “*Vernonia*” foi citado 126 vezes até Dezembro de 2006. No presente trabalho, a atividade antiulcerogênica de duas espécies do gênero *Vernonia* (*Vernonia polyanthes* Less. e *Vernonia ferruginea* Less.) foi investigada. Ambas as espécies estão presentes no cerrado, embora possuam ampla distribuição pelo território brasileiro, e são empregadas popularmente para o tratamento de bronquite, tosse, asma, cálculo renal, etc. Inicialmente foram realizados ensaios fitoquímicos e farmacológicos nos extratos brutos, clorofórmico e metanólico, de cada espécie. Foi identificada a presença de flavonóides e terpenóides em ambas as espécies, além da presença de atividade antiulcerogênica em todos os extratos brutos avaliados. Investigamos a seguir alguns dos possíveis mecanismos de ação dos extratos mais eficazes de cada espécie, do extrato metanólico da *V. ferruginea* (EMVF), rico em flavonóides e do extrato clorofórmico da *V. polyanthes* (ECVP), rico em terpenóides. Concluímos que eles estão relacionados a um aumento na produção de muco aderido à mucosa gástrica e dependem em parte da presença de óxido nítrico (NO) e radicais sulfidrila (SHs). O extrato ECVP foi então fracionado em fração clorofórmica (FCVP) e metanólica (FMVP) e o extrato EMVF foi particionado em fração acetato (FAVF) para avaliação farmacológica em modelos de úlcera crônica e aguda induzida. A fração FMVP, a mais eficaz dentre as duas espécies estudadas, foi então submetida a ensaios fitoquímicos objetivando a identificação da sua substância majoritária. O lupeol, triterpeno pentacíclico da família dos lupanos, foi identificado como o princípio ativo da espécie *V. polyanthes* e novos ensaios farmacológicos foram então realizados para elucidação dos seus mecanismos de ação. Foi identificado um aumento na produção de muco em animais pré-tratados com o lupeol, relacionado à presença de NO. Observou-se também uma boa atividade antiinflamatória na mucosa gástrica, através da diminuição da infiltração de neutrófilos, relacionada a uma diminuição na produção de PGE<sub>2</sub>. O lupeol, na dose investigada, não promoveu aumento

significativo no pH do suco gástrico, o que descarta uma possível atividade anti-secretória. Por fim, nos estudos crônicos de indução de úlcera, o lupeol não apresentou toxicidade *in vivo* e demonstrou possuir uma grande atividade cicatrizante das lesões gástricas, provavelmente não relacionada à presença da Heat Shock Protein 70 (HSP70) e proliferação celular (PCNA) na borda da lesão. No presente trabalho, através do fracionamento biomonitorado das espécies *V. polyanthes* e *V. ferruginea*, identificamos a substância antiulcerogênica lupeol. A sua alta atividade gastroprotetora aliada à sua baixa toxicidade *in vivo* fazem do lupeol um fármaco potencial para o tratamento de úlceras gástricas.

The genus *Vernonia* (Asteraceae), which includes about 1.000 species, figures as the most representative from its family. From a systematic point of view, *Vernonia* is one of the most complex genus of its family, mainly because of its diverse biological forms, from small herbs through big trees. This genus possesses a great pharmacological potential and is always mentioned by ethnopharmacological works. Evidence for the interest in this genus is the number of citations in the database Pubmed. This exceeds 126 for the keyword “*Vernonia*”, as of December, 2006. In the present work, the antiulcerogenic effect of two species from genus *Vernonia* (*Vernonia polyanthes* Less. and *Vernonia ferruginea* Less.) was evaluated. Both species are found predominately in Brazilian savannah, although they are widespread over Brazilian territory. They are used in traditional medicine for the treatment of bronchitis, cough, asthma and renal calculus. Initially, phytochemical and pharmacological assays were done with the crude methanolic and chloroformic extracts from each species. Flavonoids and terpenoids were identified in both species, and all crude extracts presented an antiulcerogenic effect. Soon afterward we evaluated some of the action mechanisms from the most effective crude extracts, the methanolic extract from *V. ferruginea* (EMVF), a flavonoid rich extract, and the chloroformic extract from *V. polyanthes* (ECVP), a terpenoid rich extract. They both presented an increase in gastric mucus content, and depended in part of the nitric oxide (NO) and sulfhydryls (SHs) presence. ECVP was then fractionated in a chloroformic (FCVP) and methanolic fraction (FMVP), while EMVF was partitioned in an acetate fraction (FAVF) for pharmacological approaches in chronic and acute models. FMVP, the most effective fraction, had its majority compound identified. Lupeol, a lupane pentacyclic triterpene, was identified as the active compound from *V. polyanthes*, and new assays were done to evaluate its action mechanisms. Lupeol increased gastric mucus content in rats, probably mediated by NO presence. It also presented anti-inflammatory properties in gastric mucosa, reducing PGE<sub>2</sub> production and neutrophil infiltration. On its effective dose, it didn't decreased the gastric acid output. On the other hand, Lupeol showed on a chronic model of ulcer induction a great healing effect with no toxicity *in vivo*, probably not related to the presence of Heat Shock Protein 70 (HSP70) and cellular proliferation (PCNA) on the ulcer border. In the present work, in a biomonitored fractionation process of the species *V. polyanthes* and *V.*

*ferruginea*, we identified the antiulcerogenic compound lupeol. Its high gastroprotective effect allied to its low toxicity *in vivo*, turns it a potential drug for treating gastric ulcers.

- AMPc = Adenosina 3',5' – monofosfato cíclico
- CAT = Catalase
- CCD = Cromatografia de camada delgada
- CHCl<sub>3</sub> = Clorofórmio
- COX = Isoenzima cicloxygenase
- d.p. = Desvio padrão
- DAB = 3,3` diaminobenzina tetrahydrochloride
- DAG = Diacilglicerol
- DAINE = Droga Antiinflamatória Não Esteroidal
- ECL = Células enterocromafins like
- ECVF = Extrato clorofórmico da *V. ferruginea*
- ECVP = Extrato clorofórmico da *V. polyanthes*
- EGF = Fator de crescimento epidermal
- EIA = Enzyme ImmunoAssay
- EMVF = Extrato metanólico da *V. ferruginea*
- EMVP = Extrato metanólico da *V. polyanthes*
- EP = Receptores específicos de prostaglandinas
- EROs = Espécies reativas de oxigênio
- FAVF = Fração acetato da *V. ferruginea*
- FCVP = Fração clorofórmica da *V. polyanthes*
- FGF = Fator de crescimento do fibroblasto
- FHVP = Fração hexânica da *V. polyanthes*
- FMVP = Fração metanólica da *V. polyanthes*
- GMPc = Guanidina 3',5' – monofosfato cíclico
- GPx = Glutathione peroxidase
- GR = Glutathione redutase
- HE = Corante hematoxilina/eosina
- HPA = Eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical
- HSP = Heat shock protein

- IL = Interleucina
- IP<sub>3</sub> = Inositol 1,4,5 trifosfato
- L-NAME = N<sub>G</sub>-nitro-L-arginine methyl-ester
- LTB<sub>4</sub> = Leucotrieno B<sub>4</sub>
- MeOH = Metanol
- MPO = Mieloperoxidase
- NEM = N-ethyl-maleimide
- NO = Óxido nítrico
- NOS = Óxido nítrico sintase
- NP/PEG = Natural Products/ Polyethylene glycol
- OMS = Organização mundial da saúde
- PAF = Fator de ativação plaquetária
- PAS = Ácido periódico de schiff
- PCNA = Proliferation cell nuclear antigen
- PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PG = Prostaglandina
- PLA<sub>2</sub> = Fosfolipase A<sub>2</sub>
- Rf's = Retention factor (Caminho percorrido pela substância teste na placa de CCD)
- RMN = Ressonância magnética nuclear
- SAPL = Fosfolipídios ativos de superfície
- SH = Compostos sulfidríla
- SOD = Superóxido dismutase
- SST<sub>2</sub> = Receptores específicos de somatostatina
- TGF<sub>β</sub> = Fator de crescimento transformador
- TGI = Trato gastrointestinal
- TNF<sub>α</sub> = Fator de necrose tumoral α
- TX = Tromboxano
- UV = Ultravioleta
- v.o. = Via oral
- VEGF = Fator de crescimento endotelial

## FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 01.</b>	Preparação do ECVP e EMVP a partir das partes aéreas da <i>V. polyanthes</i>	27
<b>Fluxograma 02.</b>	Preparação do ECVF e EMVF a partir das partes aéreas da <i>V. ferruginea</i>	27
<b>Fluxograma 03.</b>	Preparação das frações a partir do ECVP da <i>V. polyanthes</i>	27
<b>Fluxograma 04.</b>	Preparação das frações a partir do EMVF da <i>V. ferruginea</i>	27
<b>Fluxograma 05.</b>	Resumo dos experimentos realizados com extratos brutos	79
<b>Fluxograma 06.</b>	Resumo dos experimentos realizados com frações	79
<b>Fluxograma 07.</b>	Resumo dos experimentos realizados com o lupeol	80

## FIGURAS

<b>Figura 01.</b>	2-metil-1-3-butadieno (Isopreno)	17
<b>Figura 02.</b>	Carbenoxolona	18
<b>Figura 03.</b>	Lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol (lupeol)	20
<b>Figura 04.</b>	<i>Vernonia polyanthes</i>	23
<b>Figura 05.</b>	<i>Vernonia ferruginea</i>	24
<b>Figura 06.</b>	CCD do extrato ECVP	37
<b>Figura 07.</b>	Efeito gastroprotetor dos extratos (mg.kg <sup>-1</sup> ) EMVP e ECVP no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos	37
<b>Figura 08.</b>	Efeito gastroprotetor dos extratos (mg.kg <sup>-1</sup> ) EMVP e ECVP no modelo de úlcera gástrica induzida por Piroxicam (DAINE)	38
<b>Figura 09.</b>	Efeito gastroprotetor das frações (mg.kg <sup>-1</sup> ) FCVP e FMVP no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto	39

	em ratos	
<b>Figura 10.</b>	Efeito cicatrizante da fração FMVP (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos	40
<b>Figura 11.</b>	Avaliação da toxicidade da fração FMVP (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FMVP administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos	40
<b>Figura 12.</b>	Avaliação da toxicidade da fração FMVP (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FMVP administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais	41
<b>Figura 13.</b>	Principais mecanismos de ação do extrato ECVF	42
<b>Figura 14.</b>	CCD do extrato EMVF	43
<b>Figura 15.</b>	Efeito gastroprotetor dos extratos (mg.kg <sup>-1</sup> ) EMVF e ECVF no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos	44
<b>Figura 16.</b>	Efeito gastroprotetor dos extratos (mg.kg <sup>-1</sup> ) EMVF e ECVF no modelo de úlcera gástrica induzida por Piroxicam (DAINE)	45
<b>Figura 17.</b>	CCD comparativo entre o extrato bruto EMVF e a partição acetato FAVF	45
<b>Figura 18.</b>	Efeito gastroprotetor das frações (mg.kg <sup>-1</sup> ) FAVF no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos	46
<b>Figura 19.</b>	Efeito cicatrizante da fração FAVF (50 mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos	47
<b>Figura 20.</b>	Avaliação da toxicidade da fração FAVF (50 mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FAVF administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos	47
<b>Figura 21.</b>	Avaliação da toxicidade da fração FAVF (50 mg.kg <sup>-1</sup> ) no	48

	modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FAVF administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais	
<b>Figura 22.</b>	Principais mecanismos de ação do extrato EMVF	49
<b>Figura 23.</b>	CCD da fração FMVP, dos padrões lupeol e lupeol acetato e das frações 7 e 8 resultantes do fracionamento da FMVP por cromatografia em coluna	50
<b>Figura 24.</b>	Ressonância magnética nuclear: a) RMN- <sup>1</sup> H e b) RMN- <sup>13</sup> C. Comprovação estrutural da substância identificada lupeol	51
<b>Figura 25.</b>	Ressonância magnética nuclear, RMN- <sup>13</sup> C, das frações 7 e 8 resultantes do fracionamento da FMVP por cromatografia em coluna. Ampliação da região 80-160 ppm da figura 24b	52
<b>Figura 26.</b>	Efeito gastroprotetor do lupeol (mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos	53
<b>Figura 27.</b>	Efeito cicatrizante do lupeol (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos	54
<b>Figura 28.</b>	Avaliação da toxicidade do lupeol (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FAVF administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos	54
<b>Figura 29.</b>	Avaliação da toxicidade lupeol (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FAVF administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais	55
<b>Figura 30.</b>	Principais mecanismos de ação do lupeol (3 mg.kg <sup>-1</sup> )	56
<b>Figura 31.</b>	Efeito da administração oral do lupeol (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) na produção de prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) na mucosa gástrica de ratos	57
<b>Figura 32.</b>	Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com a FMVP e o lupeol	59

	(HE)	
<b>Figura 33.</b>	Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com a FMVP e o lupeol (PAS)	61
<b>Figura 34.</b>	Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com a FMVP e o lupeol. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de <i>Heat Shock Protein</i> (HSP) 70	63
<b>Figura 35.</b>	Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com a FMVP e o lupeol. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de <i>Proliferation cell nuclear antigen</i> (PCNA)	65
<b>Figura 36.</b>	Moléculas com estrutura química semelhante à do lupeol	75
 <b>TABELAS</b>		
<b>Tabela 01.</b>	Sumário de alguns dos principais terpenóides descritos na literatura com atividade antiulcerogênica	19
<b>Tabela 02.</b>	Sumário de algumas espécies do gênero <i>Vernonia</i> descritas na literatura com atividade biológica	22
<b>Tabela 03.</b>	Sumário dos extratos brutos preparados a partir das espécies <i>V. polyanthes</i> e <i>V. ferruginea</i> . São apresentados os rendimentos de cada extrato e suas siglas	26
<b>Tabela 04.</b>	Anticorpos e diluições específicas para as reações de imunohistoquímica	35
<b>Tabela 05.</b>	Triagem fitoquímica dos extratos clorofórmico (ECVP) e metanólico (EMVP) da <i>V. polyanthes</i>	36
<b>Tabela 06.</b>	Triagem fitoquímica dos extratos clorofórmico (ECVF) e metanólico (EMVF) da <i>V. ferruginea</i>	43

## **1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

A pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e apresenta um caráter multidisciplinar, principalmente quando o objetivo é encontrar substâncias ativas úteis para a terapêutica. Nessas pesquisas, a experiência indica que a seleção da espécie a ser estudada deve considerar a indicação popular de uso medicinal e o trabalho conjunto de uma equipe para identificar a espécie, isolar e determinar as substâncias ativas, além de profissionais que executem ensaios farmacológicos (Brito, 1996; Souza Brito e Nunes, 1997).

Este trabalho é desenvolvido de acordo com a filosofia de multidisciplinaridade. O grupo de pesquisadores é composto por profissionais com amplos conhecimentos e experiência nas áreas de etnobotânica, fitoquímica, química de síntese, farmacologia e toxicologia.

### **1.1. PLANTAS MEDICINAIS – BIODIVERSIDADE E MEDICAMENTOS**

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais mágicos/religiosos ou como medicamento (Li e Ohizumi, 2004). O emprego empírico de produtos naturais é, e sempre foi, uma das formas usuais de se buscar cura e alívio para moléstias, ferimentos e males de conceituação popular que sempre acompanharam o homem. O emprego de plantas medicinais, como medicamento, ainda é de grande importância em todo o mundo (Kinghorn, 2002), apesar de muitas vezes ser ineficiente. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais, sendo a maioria de países em desenvolvimento (Gurib-Fakim, 2006). Dentre os fatores que definem o emprego popular das plantas nos cuidados com a saúde, está o alto preço dos medicamentos industrializados (Rates, 2001).

Em termos históricos, a pesquisa de plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século 19 (Balunas e Kinghorn, 2005). As plantas e seus derivados são as maiores fontes de fármacos, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico (Kirkpatrick, 2002). De acordo com Newman e colaboradores (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem

natural. Além disso, dos fármacos descobertos em estudos com produtos naturais, 25% pertencem ao grupo das plantas superiores (Gurib-Fakim, 2006).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades; mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. A razão dessa afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (Calixto, 2003). Para ter uma noção do impacto desses medicamentos no mercado mundial, somente as estatinas (inicialmente isoladas a partir do fungo *Penicillium citrinum*) foram responsáveis por um mercado de US\$ 19 bilhões em 2002 (Downton e Clark, 2003). A terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microrganismos (Calixto, 2003). Atualmente, as maiores indústrias farmacêuticas mundiais possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais, pois oferecem, entre outras, as seguintes vantagens: grande quantidade de estruturas químicas, muitas delas, complexas; classes variadas de estruturas homólogas; possibilidade de utilização como banco de moléculas para ensaios de alta velocidade; economia de tempo e recursos; fonte de pequenas moléculas para alvos moleculares complexos e, mais importante, capazes de serem absorvidas e metabolizadas pelo organismo (Shu, 1998).

A possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (Gurbuz et al., 2002). Entretanto, o estudo de novos compostos a partir de espécies vegetais é oneroso. Para que um novo fármaco seja lançada ao mercado, gasta-se em torno de 100 a 360 milhões de dólares e no mínimo 10 anos de trabalho. Estima-se que a probabilidade de sucesso para a obtenção de novos compostos seja de 1 molécula ativa para cada 10.000 moléculas estudadas. Esses dados são referentes ao panorama de países desenvolvidos que selecionam plantas de maneira randômica aumentando os custos e o tempo gasto para se conseguir novos fármacos. Mas o estudo de plantas medicinais não se restringe apenas à procura de novas moléculas, pois essas plantas podem ser empregadas

em diferentes formulações, como em infusões, tinturas, extratos, frações ou no desenvolvimento de fitoterápicos (Rates, 2001).

Realizar pesquisa com plantas medicinais envolve critérios adequados na seleção das espécies vegetais para se obter sucesso na investigação farmacológica. Segundo Holetz e colaboradores (2002), a escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) seria óbvia, devido ao acúmulo milenar das informações, o que aumenta a possibilidade de se descobrir novos compostos. Porém, a seleção com base nos constituintes químicos (potencialmente ativos) encontrados em um dado gênero ou família torna-se interessante principalmente pela possibilidade de se encontrar quantidades elevadas de compostos ativos.

A fácil aceitação e preferência por fármacos sintéticos se devem, em parte, à acessibilidade, eficácia e segurança desses produtos. Atualmente, com a necessidade crescente de estudos científicos para o registro dos fitomedicamentos, esta característica diferencial dos medicamentos sintéticos aos poucos deixará de ser exclusiva.

## **1.2. ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA**

Ao se decidir pelo trabalho aplicado a uma classe terapêutica em particular, é necessária a análise da sua incidência de morbidade na população, considerando-se o binômio: importância em saúde pública e mercado para a substância potencialmente útil (McIntosh et al., 1991; Petersen et al., 1995). Os fármacos antiulcerogênicos são tão importantes do ponto de vista de utilização quanto do mercadológico.

O mercado brasileiro de fitomedicamentos atingiu, em 2001, cerca de US\$ 270 milhões correspondendo a 5,9 % do mercado brasileiro de medicamentos. Este dado mostra que o mercado de fitoterápicos ultrapassou a comercialização dos medicamentos genéricos que foi de R\$ 226 milhões (5% do mercado global brasileiro). Em consequência do crescimento do mercado mundial dos fitomedicamentos, as maiores indústrias farmacêuticas multinacionais, passaram a se interessar por esse mercado, até então formado predominantemente por pequenas empresas européias e asiáticas (Calixto, 2003).

As úlceras gástrica e duodenal afetam um número considerável de pessoas no mundo. Estresse, cigarro, deficiência nutricional e ingestão de antiinflamatórios não esteroidais aumentam a incidência dessas úlceras (Belaiche et al., 2002). Os gastos

financeiros anuais no tratamento da úlcera péptica, só nos Estados Unidos, estão estimados em 3.4 bilhões de dólares, incluindo custos diretos e indiretos (Sandler et al., 2002). Uma vez que a úlcera péptica é uma patologia comum espera-se que seu impacto na economia e saúde humana permanecerá importante no futuro.

A razão do surgimento das úlceras pépticas não é bem compreendida. Acredita-se existir um desbalanço no equilíbrio entre os mecanismos lesivos da mucosa - a secreção e ação do ácido e da pepsina, e os mecanismos protetores da mucosa - secreção e ação de muco e bicarbonato (Brzozowski, 2003).

A úlcera tem sido objeto de intensa pesquisa nas últimas décadas. Aproximadamente 10% da população mundial é vítima dessa patologia independentemente do sexo ou classe social (Berstad e Berstad, 1993). Esta doença traz custos tremendos à sociedade e torna a vida do paciente extremamente difícil, além de ser fatal em muitos casos (McIntosh et al., 1991; Petersen et al., 1995).

A úlcera gástrica está associada a fatores agressores endógenos (predisposição genética, ácido, pepsina e bile) e a fatores exógenos predisponentes relacionados a condições de vida (estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas antiinflamatórias não esteroidais - DAINEs), ingestão de determinados alimentos e presença da *Helicobacter pylori* (Hirschowitz et al., 1995; Bruton, 1996; Wolfe e Sachs, 2000; Wallace e Miller, 2000).

Hoje, a grande maioria das pesquisas científicas envolvendo úlceras pépticas direciona-se principalmente para o estudo de *H. pylori* ou aponta esta infecção bacteriana e as DAINEs como os maiores responsáveis pela incidência desta moléstia (Watanabe e Chiba, 2002). *H. pylori* está presente em quase 50% da população mundial e as DAINEs são os fármacos de maior uso; porém, nem todos os indivíduos infectados pela bactéria ou que se utilizam de drogas antiinflamatórias manifestam gastrites ou desenvolvem úlceras pépticas (Go, 1997; Bauer e Marker-Hermann, 2003; Peura, 2004).

Verificou-se também que o fenômeno das migrações populacionais, o crescente aumento da participação da mulher no mercado de trabalho (Kang et al., 2006) e o estresse a ele associado interferem aumentando a incidência da úlcera (Petersen et al., 1995) e que existe uma correlação importante entre o aumento de idade e a incidência de úlcera (Yuan et al., 2006).

### 1.3. TERAPÊUTICA ATUAL E PERSPECTIVAS

As soluções terapêuticas, durante séculos, foram sempre a de neutralizar o conteúdo gástrico de ácido clorídrico utilizando antiácidos, dieta alimentar ou cirurgia. Tal panorama só foi modificado no início dos anos 70 onde os receptores de histamina  $H_2$  foram definidos através da utilização de antagonistas seletivos como a cimetidina e ranitidina (Black et al., 1972; Yuan et al., 2006). Esses fármacos causaram um grande impacto mundial, o que levou Kurata e colaboradores (1983) a escrever um artigo na Science intitulado “What in the world is happening to ulcers?”. O artigo descreve essa modificação no panorama do tratamento de úlcera péptica, com uma diminuição expressiva no número de cirurgias.

Algum tempo depois, foram desenvolvidos fármacos citoprotetores, como o misoprostol, um análogo da  $PGE_1$ , e extensas revisões sobre elas têm sido feitas. A prostaglandina no estômago inibe a secreção ácida, enquanto estimula a secreção de muco e bicarbonato (Hawkey, 2000).

Outros fármacos gastroprotetores foram introduzidos como os inibidores da bomba protônica ou  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase, responsável pela secreção ácida gástrica. A substância padrão foi o omeprazol, que é capaz de inibir a secreção ácida por inativação da bomba através da formação de ligações dissulfeto entre as moléculas reagentes do omeprazol com a enzima (Lindberg et al., 1987; Sachs et al., 1988; Olbe et al., 2003). Na mesma época foi descrita a ação da pirenzepina, um anticolinérgico muscarínico  $M_1$  seletivo, que também contribuiu para o tratamento da úlcera péptica nesta década (Texter e Reilly, 1982).

Assim, o tratamento das dispepsias até o final da década de 80 se limitou ao uso individual ou em associações de antiácidos, anticolinérgicos  $M_1$ , anti-histamínicos  $H_2$ , citoprotetores e inibidores da bomba protônica. Além disso, novos usos para velhos fármacos foram encontrados; os compostos de bismuto (Baron et al., 1986; D'Souza e Dhume, 1991) e a carbenoxolona, obtida a partir de um extrato da *Glycyrriza glabra* o alcaçuz (Barrowman e Pfeiffer, 1982; Sato et al., 2004), fazem parte desse grupo.

Estamos hoje há 20 anos do início da “era da *H. pylori*”, e estagnamos numa espécie de platô do conhecimento, tratamento e diagnóstico das úlceras pépticas. Atualmente, a terapêutica mais empregada no tratamento de úlceras gástricas consiste no emprego de inibidores da bomba protônica ( $H^+$ - $K^+$ -ATPase) concomitantemente a antibióticos para erradicação da *Helicobacter pylori*, quando detectadas nas biopsias. Entretanto, três

questões ainda demandam soluções: a) a contínua diminuição na eficácia da erradicação da *H. pylori*; b) a ineficácia da atual terapêutica na prevenção e na reincidência de úlceras gástricas em pacientes usuários de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs); c) a ineficácia da atual terapêutica em casos de úlceras gástricas não associadas à utilização de DAINEs e à presença da *H. pylori* (Yuan et al., 2006). Além disso, o uso de fármacos inibidores da secreção ácida (anti-histamínicos H<sub>2</sub> e inibidores da bomba protônica) em conjunto a DAINEs, reduz a absorção destas últimas, reduzindo assim seus efeitos terapêuticos (Lichtenberger et al., 1996).

Existem, só no Brasil, centenas de milhares de casos envolvendo úlceras gástricas, o que significa um problema de saúde pública importante e nos leva a crer que estudar substâncias com potencial atividade antiulcerogênica seja não só pertinente, como bastante importante.

#### **1.4. FATORES PROTETORES DA MUCOSA GÁSTRICA**

Em geral, mecanismos defensores da mucosa gástrica contra fatores agressores como o ácido clorídrico, bile, DAINEs ou estresse, consistem em fatores funcionais, humorais e neurais. Secreção de muco (Garner et al., 1979), microcirculação (Whittle et al., 1981) e motilidade (Ueki et al., 1988) agem como fatores funcionais, enquanto que as prostaglandinas e o óxido nítrico (Whittle et al., 1990) agem como fatores humorais. Os neurônios aferentes, sensíveis à capsaicina (Holzer, 1988), agem como fatores neurais. A seguir descrevemos alguns dos principais fatores protetores da mucosa.

##### **1.4.1. Prostaglandinas**

As prostaglandinas (PGs) estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos no estômago, incluindo secreção de ácido, produção de muco e fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (Robert e Ruwart, 1982).

Prostaglandinas endógenas são geradas a partir do ácido aracdônico. Três isoenzimas de ciclooxigenases, COX-1 (Vane, 1994), COX-2 (Xie et al., 1991) e, mais recentemente, COX-3 (Chandrasekharan et al., 2002) tem sido descritas como catalisadores da conversão do ácido aracdônico para a prostaglandina endoperóxido H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), a reação chave para biossíntese das prostaglandinas, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e TX<sub>2</sub> (Peleg e Wilcox,

2002). COX-1 é expressa, de modo constitutivo, em muitos tecidos (O'Neill e Ford-Hutchinson, 1993), enquanto que os níveis de COX-2 são usualmente baixos ou não detectáveis em condições basais (Kargman et al., 1996) e aumentam rapidamente sobre influências de estímulos pró-inflamatórios ou mitogênicos (Kujubu et al., 1991). COX-3 é expressa no córtex cerebral de cães e em baixas quantidades em outros tecidos. Em humanos, a COX-3 também é expressa no córtex cerebral e no coração (Chandrasekharan et al., 2002). As PGs modulam o fluxo sanguíneo e a secreção de muco devido a expressão da isoforma constitutiva da COX-1. Por outro lado, a PG que tem sua produção induzida durante o processo da inflamação é derivada da COX-2 (Xie et al., 1991).

Foi estabelecido que a supressão da síntese de PG no estômago, através da inibição da COX, é o componente chave para o mecanismo básico da ulceração no TGI associado ao uso de DAINes (Vane, 1971). DAINes, como a indometacina, aspirina, piroxicam e outras, induzem ulceração na mucosa gástrica principalmente pela redução da síntese de prostaglandinas. Tal diminuição traz como conseqüências uma diminuição da secreção de muco e bicarbonato e uma redução do fluxo sanguíneo local (Cryer, 2000). Além disso, o contato direto destes fármacos com a mucosa gástrica ataca os fosfolípidios presentes tanto no muco quanto no epitélio gástrico, o que reduz severamente a hidrofobicidade da camada de muco, causando assim uma retrodifusão de íons hidrogênio (Bjorkman, 1996; Berstad et al., 2002). A redução do nível de prostaglandina na mucosa gástrica, ao mesmo tempo em que diminui a inflamação, reduz as defesas do estômago.

O efeito biológico da PGE<sub>2</sub> é mediado via receptores específicos de membrana, denominados receptores EP (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>), que são acoplados a proteínas-G de membrana, ligadas a diferentes vias de transdução de sinal intracelular (Sugimoto et al., 2000). Ligantes de PGE<sub>2</sub> a receptores EP<sub>1</sub> resultam na liberação intracelular de trifosfato inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), ligantes de EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub>, ativam o sistema adenilciclase-AMPC e ligantes EP<sub>3</sub> inibem esse sistema (Pawlik et al., 2002).

PG exerce sua gastroproteção por aumentar a secreção de muco e bicarbonato, manter o fluxo sanguíneo da mucosa, e aumentar a resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (Hawkey e Rampton, 1985).

Um dos mecanismos pelo qual a PG pode causar diminuição da resposta inflamatória e danos na mucosa é através da modulação da atividade de imunócitos na

mucosa. PGE<sub>2</sub> é um potente supressor do TNF- $\alpha$  ou fator de necrose tumoral (Kunkel et al., 1986) liberado por macrófagos, além de reduzir a expressão do gene para TNF- $\alpha$  nas células (Kunkel et al., 1988); entretanto, em 1993 foi demonstrado que PGE<sub>2</sub> inibe, de modo dose dependente, a liberação de fator de agregação plaquetária (PAF), histamina e TNF- $\alpha$  de células na mucosa intestinal (Hogaboam et al., 1993). PGs também regulam a liberação de outras citocinas como as interleucinas IL-1 dos macrófagos (Kunkel et al., 1986), e reduzem a liberação do leucotrieno LTB<sub>4</sub> dos neutrófilos (Ham et al., 1983).

A demonstração de que baixas concentrações de prostaglandina, do subtipo E<sub>2</sub>, inibem a secreção ácida criou uma grande expectativa de que esses compostos possuiriam atividade antiúlcera.

#### ***1.4.2. Óxido Nítrico (NO)***

O óxido nítrico (NO) tem um importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica, como: regulador na secreção de muco (Brown et al., 1993), vasodilatador produzindo aumento de fluxo sanguíneo local (Wallace et al., 2000), inibidor da migração de neutrófilo (Banick et al., 1997) e auxiliar no processo de cicatrização da úlcera gástrica (Jadeski e Lala, 1999). Na cicatrização, o NO é um importante reparador da mucosa, provavelmente pela sua habilidade de aumentar o depósito de colágeno pelos fibroblastos além de estimular a angiogênese (Wallace et al., 2000).

O óxido nítrico exerce amplo espectro de atividades biológicas *in vivo*, dependentes, em parte, da guanosina-3', 5'-monofosfato cíclica (cGMP) produzida após o NO estimular a enzima guanilato ciclase solúvel (Moncada et al., 1991). Nas células musculares lisas essa estimulação resulta em relaxamento. O NO pode atuar também diretamente em canais de potássio, dependentes de cálcio, levando a uma hiperpolarização dependente do endotélio nos vasos, resultando em vasodilatação (Bolotina et al., 1994).

As três enzimas produtoras de óxido nítrico são as NO-sintases: constitutivas, nNOS (neuronal) e eNOS (endotelial), e induzida (iNOS), que têm sido caracterizadas no trato gastrointestinal. A iNOS produz grande quantidade de NO causando danos e, portanto, a inibição específica dessa enzima é benéfica. As NOS constitutivas mantém a barreira mucosa intacta (Kubes e McCafferty, 2000).

No TGI, as formas constitutiva são encontradas no endotélio (eNOS) e no neurônio entérico (nNOS). Estímulos apropriados, tais como respostas inflamatórias, fazem com que a iNOS possa ser detectada (Kristjansson et al., 2005).

O bloqueio do NO aumenta o estresse oxidativo ativando mastócito. Essas células são encontradas em grandes quantidades no trato gastrointestinal (TGI), as quais liberam mediadores como histamina e fator ativador de plaquetas, causando o aumento da permeabilidade epitelial; esse evento é rapidamente revertido pela liberação exógena de NO (Kanwar et al., 1994).

#### ***1.4.3. Grupamentos sulfidrila (SHs)***

O papel gastroprotetor dos grupamentos SH endógenos (compostos sulfidrila), presentes no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema antioxidante, já foi demonstrado em diversos modelos de indução de úlcera (etanol, DAINEs e estresse), nos quais ocorre uma depleção destes compostos (Hernandez-Munoz et al., 2000; Bayir et al., 2006). O pré-tratamento com bloqueadores de grupos SH demonstrou potencializar significativamente a indução de úlceras gástricas (Hiraishi et al., 1994), enquanto que aumentos significativos promovem gastroproteção (Sener-Muratoglu et al., 2001).

No processo inflamatório, espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas e iniciam uma reação em cadeia que culmina na peroxidação lipídica e morte celular (Tariq et al., 2006). Os compostos sulfidrila ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou produzidos após exposição a agentes nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (Avila et al., 1996).

Estes agentes são também importantes na produção (Salim, 1992) e manutenção do muco gástrico, uma vez que suas subunidades glicoprotéicas são unidas entre si por pontes dissulfeto que, uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel (Avila et al., 1996).

#### ***1.4.4. Somatostatina***

O principal efeito fisiológico da somatostatina no sistema digestivo é a inibição da secreção ácida gástrica. A somatostatina pode inibir o peristaltismo do estômago, intestino, vesícula biliar e proliferação de células da mucosa; reduzir o fluxo sanguíneo no TGI, absorção de água, eletrólito, glicose, aminoácido e triglicérido no intestino delgado;

também deprime a secreção de ácido gástrico, pepsina, bili hepática e gastrina, além de outros hormônios gastrointestinais (Sun et al., 2002).

O efeito inibitório da somatostatina é devido mais ao bloqueio da liberação de histamina do que à inibição direta da célula parietal (Komasaka et al., 2002).

A ação da somatostatina em receptores SST<sub>2</sub>, os quais estão localizados predominantes em células ECL, levam à inibição da liberação de histamina induzida por gastrina e à redução da liberação de cálcio intracelular. Esse mecanismo é provavelmente responsável pelo efeito inibitório da somatostatina na secreção ácida (Prinz et al., 1994; Komasaka et al., 2002).

#### ***1.4.5. Muco e bicarbonato***

A mucosa gástrica produz fatores de digestão como ácido gástrico e enzimas proteolíticas. Para manter a integridade da mucosa, um sistema de defesa efetivo é necessário. A primeira linha de defesa contra o ácido é a barreira do muco que vem sendo investigada por vários grupos de estudo (Phillipson et al., 2002).

O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco gástrico o qual adere na superfície da mucosa. Esse muco aderido, juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio, serve como uma barreira contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (Allen e Flemstrom, 2005). Num estômago humano saudável, o muco forma uma cobertura contínua de gel na mucosa gástrica de mais ou menos 0,1-0,2 mm de espessura, cuja manutenção se dá por equilíbrio dinâmico entre sua produção e secreção pelas células epiteliais e sua erosão na porção em contato com o lúmen (Jordan et al., 1998).

O muco é um importante fator protetor para a mucosa gástrica, o qual se apresenta de forma viscosa, elástica e aderente na forma de um gel transparente composto por 95% de água e 5% de glicoproteína, que recobre a superfície da mucosa gastrointestinal (Repetto e Llesuy, 2002). Na sua composição há também uma grande quantidade de fosfolipídios ativos de superfície (SAPL) que deixam a mucosa gástrica altamente hidrofóbica, reduzindo assim a permeabilidade do muco aos íons H<sup>+</sup> (Hills, 1996). O muco gástrico possui também atividade antioxidante, protegendo a mucosa gástrica, devido às glicoproteínas, sendo os açúcares potentes seqüestradores de EROs ou espécies reativas de oxigênio (Mojzis et al., 2000).

A secreção do muco gástrico é controlada por vários fatores em diferentes vias. Prostaglandinas ( $PGE_2$ ) e secretina, as quais são inibidoras da secreção ácida, estimulam a secreção de muco (Tani et al., 1997). Geralmente o muco gástrico é secretado por duas ou três vias: uma delas envolveria receptor, enquanto as outras duas seriam por expulsão apical e possível esfoliação. Nos receptores que medeiam a secreção de muco muitas substâncias fisiologicamente ativas, incluindo neurotransmissores, autacóides e hormônios são conhecidas como secretagogos (Johnson e Alpers, 1994).

#### ***1.4.6. Corticosteróides***

O córtex adrenal sintetiza duas classes de esteróides: os corticosteróides (glicocorticóides e mineralocorticóides) com 21 átomos de carbono, e os andrógenos com 19. De acordo com a ação do corticosteróide ele é descrito como glicocorticóide (regulador do metabolismo de carboidratos) ou mineralocorticóide (regulador do balanço eletrolítico), refletindo seu papel principal. Em humanos, o cortisol é o principal glicocorticóide e a aldosterona é o principal mineralocorticóide. Os efeitos fisiológicos dos corticosteróides são numerosos, incluindo alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico e das funções normais dos sistemas cardiovascular, imunológico, endócrino e nervoso, dos rins e dos músculos esqueléticos. Além disso, os corticosteróides dão ao organismo a capacidade de resistência a situações de estresse, como estímulos nocivos e mudanças ambientais (Schimmer e Parker, 2006).

De acordo com o ponto de vista defendido tradicionalmente, glicocorticóides secretados em resposta ao estresse aumentariam a vulnerabilidade gástrica à sua ação e, conseqüentemente, a ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical (HPA) é um fator ulcerogênico (Filaretova, 2006). Tal ponto de vista é resultado tanto de observações clínicas quanto experimentais (Gray et al., 1953; Sandweiss, 1954; Black, 1988; Weusten et al., 1993) que demonstram uma atividade ulcerogênica de glicocorticóides exógenos administrados em altas doses e uma correlação positiva entre altos níveis de glicocorticóides induzidos pelo estresse e ulcerações gástricas (Weiss, 1971; Murphy et al., 1979). Apesar de diversos estudos terem falhado na demonstração da atividade ulcerogênica de glicocorticóides endógenos, por muitos anos, a ativação do eixo HPA foi

considerada como um importante componente hormonal ulcerogênico do eixo neuro-intestinal (Filaretova, 2006).

Entretanto, nos últimos anos, este ponto de vista está sendo revisado. Novos estudos demonstraram um papel gastroprotetor do eixo HPA. Segundo Filaretova (2006), os glicocorticóides endógenos são secretados em resposta ao estresse como um fator protetor da mucosa gástrica. Eles estariam envolvidos com o processo de cicatrização da mucosa gástrica, mediada principalmente pela homeostase do metabolismo da glicose, aumento do fluxo sanguíneo gástrico e da produção de muco, e atenuação da motilidade gástrica e da permeabilidade vascular.

Os corticosteróides são também capazes de inibir a atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, responsável pelo metabolismo de fosfolipídeos (SAPL) e síntese do ácido aracdônico (Yao et al., 1999; Berstad et al., 2002). Os SAPLs, conforme dito anteriormente no item 1.4.5., são um importante componente do muco gástrico. A inibição do seu metabolismo, por sua vez, através da inibição da enzima PLA<sub>2</sub>, já demonstrou em diversos estudos proteger a mucosa gástrica (Tariq et al., 2006).

#### ***1.4.7. Fluxo sanguíneo***

Um dos papéis do fluxo sanguíneo na mucosa é suprir de oxigênio, nutrientes e hormônios a mucosa gástrica, além de participar na regulação da saída do ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato e remoção dos produtos incluindo a retrodifusão de íons hidrogênio; assim, o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa.

A redução do fluxo sanguíneo está envolvida na formação das lesões da mucosa gástrica causadas por estresse, etanol e DAINES (Kawano e Tsuji, 2000).

A microcirculação é importante para a defesa da mucosa e é modulada pelo sistema nervoso e por mediadores inflamatórios. Difusão de ácido ou toxina na mucosa resulta em elevação crítica do fluxo sanguíneo mediada por neurônio sensorial aferente, limitando danos e facilitando a reparação. O sangue dilui e/ou neutraliza o ácido/toxina e previne o acúmulo de altas concentrações na mucosa (Wallace e Ma, 2001).

#### ***1.4.8. Sistema antioxidante***

EROs estão envolvidas em vários eventos patológicos incluindo úlceras e inflamação gastrointestinal (Yoshida et al., 1995).

O metabolismo do ácido aracdônico, macrófagos e neutrófilos geram EROs que podem contribuir para danos causados na mucosa gástrica (Rosen et al., 1995). Os sequestradores de EROs são utilizados para proteger a mucosa gástrica do dano oxidativo e acelerar a cicatrização de úlceras.

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (Gutteridge, 1993).

Em condições normais, a concentração destas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e pela catalase (CAT) (McCord e Fridovich, 1969).

#### ***1.4.9. Inibição da infiltração de neutrófilos***

Os neutrófilos fazem parte do sistema de defesa imunológico inato, e são os primeiros a chegar ao local da inflamação. A infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica ocorre em condições de hipóxia e baixo fluxo sanguíneo local, e está intimamente relacionada ao surgimento de lesões ulcerativas. Por sua vez, as principais causas do surgimento destas lesões é a liberação de EROs pelos neutrófilos no local da inflamação (Ohta et al., 1999; Bayir et al., 2006) e o metabolismo de componentes do muco gástrico pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) cuja expressão é ativada em neutrófilos ativados (Berstad et al., 2002).

Estratégias para inibir a infiltração/ativação de neutrófilos demonstraram proteger os animais contra as úlceras gástricas. Fármacos imunossupressores, portanto, poderiam causar um efeito benéfico à mucosa gástrica, ao inibir a infiltração de neutrófilos sem afetar as defesas gástricas (Kvietys et al., 1990; Shimizu et al., 2000).

#### ***1.4.10. Reconstituição do epitélio gástrico***

O estômago possui várias formas de se proteger quando exposto continuamente a altas concentrações de ácido; uma das estruturas mais importantes é o epitélio gástrico. Ele é frequentemente renovado, sendo as células “velhas” deslocadas em direção ao lúmen. O epitélio gástrico humano renova-se completamente a cada 2-4 dias. A habilidade em permitir que as células velhas sejam repostas por células mais jovens, sem quebra significativa da barreira, é atribuída a um processo de extensão celular, ou seja, as células vizinhas gradualmente “apertam” as células envelhecidas na base (Wallace e Granger, 1996).

O termo “reconstituição” refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa, que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida. As células gástricas estão ligadas à membrana basal da célula epitelial e este local é bastante sensível aos danos induzidos por ácido (Paimela et al., 1995).

A cicatrização da mucosa na úlcera gástrica requer reconstituição da estrutura glandular epitelial (re-epitelização), restauração da lâmina própria incluindo uma rede microvascular na mucosa, nervos e células de tecidos conectivos (Milani e Calabro, 2001).

A cicatrização das úlceras é acompanhada de um aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera e por um significativo aumento de gastrina plasmática e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Com o progresso da cicatrização da úlcera ocorre o declínio gradual do fluxo sanguíneo, da gastrina plasmática e das citocinas pró-inflamatórias. Foi encontrado que a hipergastrinemia, que ocorre durante o período anterior à cicatrização da úlcera, pode ser atribuída à supressão da acidez gástrica e expressão de fatores de crescimento, os quais controlam a proliferação celular e também exibem atividade antissecretora (Brzozowski et al., 2001).

A mucosa gástrica, situada na margem da úlcera, forma a “zona de cicatrização”; as glândulas dessa região começam a dilatar e as células de revestimento dessas glândulas sofrem diferenciação; ocorre ainda ativação do fator de crescimento epidermal (EGF) e a proliferação celular é assim ativada. Esse processo é iniciado após três dias da implantação da úlcera e é essencial para cicatrização.

De modo geral, os fatores de crescimento promovem a proliferação e migração de células epiteliais para a cratera da úlcera, levando à re-epitelização dessa cratera e

maturação das glândulas. Na base da úlcera ocorre granulação de tecido sofrendo contínua remodelação. A angiogênese (formação de microvasos) facilita a remodelação do tecido por liberar oxigênio e nutrientes. Células inflamatórias são substituídas por fibroblastos e microvasos na fase final da cicatrização (Chan e Sung, 2001). Assim a angiogênese é importante para o reparo tanto de dano agudo da mucosa quanto crônico durante a cicatrização de úlcera gastroduodenal (Malara et al., 2005).

#### ***a) Heat shock protein (HSP)***

Nos últimos 20 anos o estudo das doenças relacionadas à úlcera péptica, gástrica e duodenal tem aumentado significativamente devido à identificação de várias técnicas, as quais têm possibilitado o estudo mais detalhado da mucosa gástrica (Brzozowski, 2003).

HSP 70 é um membro da família de HSPs encontrado em células de mamíferos (núcleo e citosol) com peso molecular de aproximadamente 70 kDa; sua produção é induzida em resposta ao estresse (Shichijo et al., 2003). O aumento da expressão de HSP 70 é demonstrado em lesões patológicas como, por exemplo, arteriosclerose (Berberian et al., 1990), estresse oxidativo (Hightower e White, 1982), doença neurodegenerativa (Hamos et al., 1991), infecção viral e doença auto-imune (Young e Elliott, 1989).

Foi proposto que HSP 70 contribui para proteção da mucosa gastrointestinal contra agentes nocivos (Tsukimi e Okabe, 2001). O aumento da expressão da HSP 70 está ainda envolvido com a aceleração na cicatrização de úlceras gástricas (Okabe e Amagase, 2005).

HSP também contribui consideravelmente para a citoproteção adaptativa na mucosa gastrointestinal, em especial a HSP 70, que atua com fatores integrais do mecanismo de defesa da mucosa gastrointestinal. A expressão de HSP 70, induzida por fármacos anti-úlceras, confere proteção contra a úlcera gástrica. Entretanto, os mecanismos responsáveis por esta proteção não são conhecidos. Acredita-se que esta proteção ocorra através de um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (Shichijo et al., 2003). O acúmulo de HSPs induzido fisiologicamente, farmacologicamente, geneticamente ou por administração direta das proteínas protege o organismo de uma série de condições patológicas, entre elas a úlcera gástrica (Tytell e Hooper, 2001). A família de proteínas HSP 70 reduz a desnaturação e agregação induzidas por diferentes formas de estresse de proteínas intracelulares. Sugere-se que elas exerçam seu efeito citoprotetor através de proteção da

mitocôndria e interferência no programa de apoptose induzido pelo estresse. A indução de úlceras é uma situação de estresse para as células. Logo, fármacos indutores da produção de HSP 70 devem ter efeito benéfico para a prevenção e tratamento de úlceras (Rokutan, 2000).

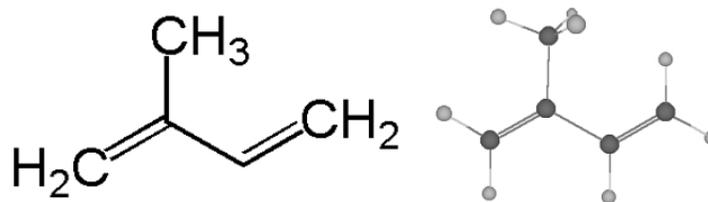
#### ***b) Proliferação celular (PCNA)***

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é um polipeptídeo nuclear de 36 kDa que tem sido amplamente estudado nas mais diversas patologias e está associado ao ciclo celular atuando como co-fator para a DNA polimerase delta (Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1987; Nanji e Tahan, 1996). O PCNA é essencial para a síntese de DNA e, conseqüentemente, é considerado um agente intimamente associado à replicação celular. O ciclo celular é composto de duas etapas: a) fase mitótica (M), e b) interfase, que se divide nas fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>. A produção de PCNA no ciclo celular aumenta a partir da fase G<sub>1</sub>, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G<sub>2</sub>, e passando a exibir níveis tão baixos na fase M e em células quiescentes, que não é identificado por métodos imunohistoquímicos (Huang et al., 1994; Martinez-Lara et al., 1996).

O processo de cicatrização de úlcera em humanos ou em modelos experimentais é um processo complexo onde ocorre reconstituição da estrutura epitelial e do tecido conjuntivo através da proliferação, migração e diferenciação celular (Beckert et al., 2004). Após a implantação da úlcera gástrica a reconstituição da superfície do epitélio gástrico é feita através da proliferação e diferenciação celular.

### **1.5. TERPENÓIDES NA TERAPÊUTICA**

O grupo dos terpenóides compreende cerca de 15.000 a 20.000 estruturas já identificadas. Ele se distingue das outras classes de compostos secundários vegetais pela sua origem, a partir do mevalonato e isopentenil pirofosfato, além da natureza lipofílica de suas estruturas. Quimicamente, os terpenóides são usualmente caracterizados como hidrocarbonetos insaturados, com diferentes quantidades de oxigênio ligados ao seu esqueleto isoprênico. A nomenclatura dos terpenóides depende basicamente do número de estruturas isoprênicas (figura 01) e dos átomos de carbono presentes na molécula (Wagner e Elmadfa, 2003).



**Figura 01.** 2-metil-1-3-butadieno (Isopreno)

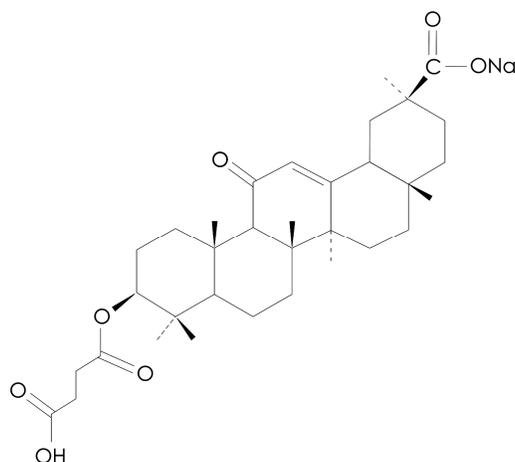
Na natureza, os terpenóides exercem importante papel em quase todas as interações ecológicas planta/animal, planta/planta, planta/microorganismos como, por exemplo, as fitoalexinas, repelentes, agentes de defesa, ferormônios e moléculas sinalizadoras (Harborne, 1991).

Os terpenóides são consumidos pelo homem em sua dieta normal, em diferentes composições e concentrações; portanto, estas substâncias são responsáveis por diferentes implicações no corpo humano – razão pela qual os terpenóides são considerados como “funcionais”. Com base na definição da Functional Food Science (projeto Europa), um alimento ou ingrediente de certo alimento pode ser classificado como “funcional” caso ele contenha algum componente que afete uma ou mais funções no organismo de forma a lhe trazer algum benefício (Diplock et al., 1999). Além disso, um alimento (ou composto) funcional deve possuir um relevante benefício ao bem estar ou saúde humana, ou mesmo resultar numa redução do risco de se desenvolver certa doença.

As plantas desempenham um importante papel na manutenção da saúde humana; foram elas que possibilitaram uma melhoria na qualidade de vida por milhares de anos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 80% da população mundial conta com o uso da medicina tradicional como primeira alternativa de tratamento (Craig, 1999). Grande parte das terapias tradicionais envolve o uso de extratos vegetais ou de seus compostos ativos, por exemplo, os terpenóides.

Sobre o ponto de vista biológico, os terpenóides são extremamente importantes; a principal evidência do interesse científico e econômico por estas substâncias é o número de citações presentes no banco de dados Pubmed ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)). Elas excediam 162.000 citações para a palavra chave “terpene” e 1.000 para a palavra “terpene and ulcer”, até o dia 29 de Dezembro de 2006.

Diversos terpenóides, incluindo lactonas sesquiterpênicas, diterpenos e triterpenos já foram avaliados cientificamente quanto ao seu potencial antiulcerogênico, conforme podemos verificar na tabela 01. Entretanto, o único terpenóide comercializado para o tratamento de úlceras gástricas é a Carbenoxolona (02 e 36b), um triterpeno pentacíclico derivado do ácido glicirretínico (U.S. Patent 3.070.623). Sintetizada em 1960 pela Biorex Laboratories, a Carbenoxolona já foi amplamente usada na Europa para o tratamento de úlceras gástricas. Entretanto, seus efeitos benéficos são acompanhados por graves efeitos colaterais em um número significativo de pacientes. Estudos *in vitro* demonstraram que a Carbenoxolona inibe a enzima Cortisona 5 $\beta$ -redutase e a 11 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase responsáveis pela regulação do metabolismo do cortisol e da aldosterona (Baker, 1994; Dzubak et al., 2006). Essa inibição aumenta a meia-vida do cortisol, o que leva a um prolongamento de sua atividade biológica. Conseqüentemente, os pacientes podem desenvolver um quadro de hiper-aldosteronismo, responsável pela encefalopatia hipertensiva, ganho de peso, edema e hipertensão (Lewis e Hanson, 1991; Farina et al., 1998; Dzubak et al., 2006).



**Figura 02.** Carbenoxolona

Na última década, o grupo dos triterpenóides cíclicos, com pelo menos 4.000 diferentes compostos já identificados, tornou-se de grande interesse econômico devido aos seus diversos e importantes efeitos biológicos (Dzubak et al., 2006). Dentro deste grupo existe ainda uma família cuja atividade gastroprotetora foi pouco estudada, a família dos Lupanos. Um dos principais compostos desta família é o Lupeol (descrito com maiores

detalhes no próximo item), substância amplamente distribuída pelo reino vegetal e encontrada principalmente nas ceras vegetais.

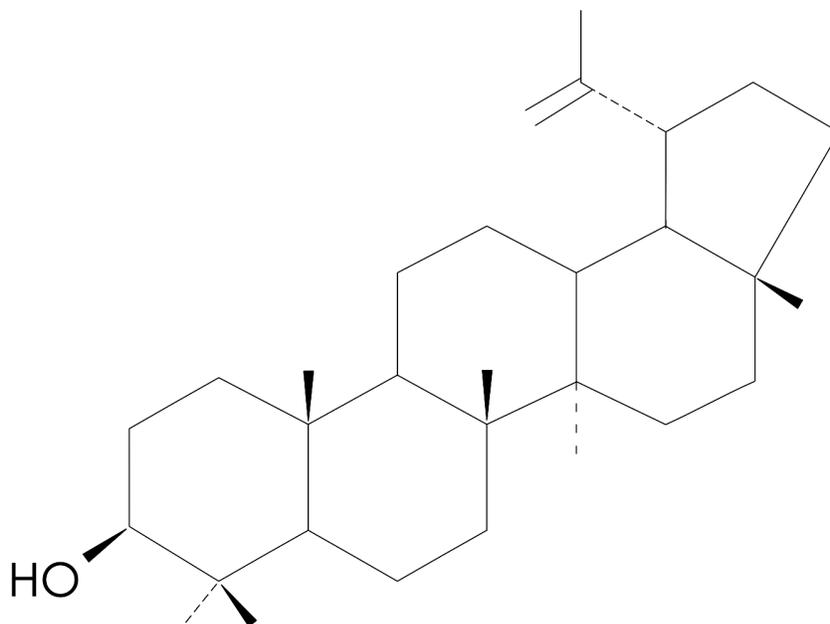
**Tabela 01.** Sumário de alguns dos principais terpenóides descritos na literatura com atividade antiulcerogênica

Composto	Classe fitoquímica	Origem
<b>Trans-crotonina</b> (Hiruma-Lima et al., 2002)	Lactona sesquiterpênica	<i>Croton cajucara</i>
<b>Onodorpicrina</b> (Almeida, 2005)	Lactona sesquiterpênica	<i>Arctium lappa</i>
<b>Ferruginol</b> (Rodriguez et al., 2006)	Diterpeno	<i>Prumnopitys andina</i>
<b>Ácido Oleanólico</b> (Astudillo et al., 2002)	Triterpeno	<i>Fabiana imbricata</i>
<b>Ácido Glicirretínico</b> (DOLL e HILL, 1962)	Triterpeno	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
<b>Theasaponina</b> (Morikawa et al., 2006)	Saponina triterpênica	<i>Camellia sinensis</i>

### 1.5.1. Lupeol

O lupeol (figura 03), Lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol (triterpeno pentacíclico da família dos lupanos), composto ativo da espécie *Vernonia polyanthes*, já foi objeto de diversos estudos biológicos e pedidos de patente. Entretanto, até o presente momento, nada foi estudado e/ou publicado sobre sua propriedade antiulcerogênica. A toxicidade do lupeol é muito baixa; em teste *in vivo* demonstrou-se um grande potencial hepatoprotetor (Sunitha et al., 2001; Sudhahar et al., 2006). Quando administrado oralmente, na dose de 2 g.kg<sup>-1</sup>, não produz sinais e sintomas indesejáveis em ratos e em camundongos; mesmo após 96 h de observação nenhuma morte ocorreu. O lupeol, administrado oralmente e por via intraperitoneal, nas doses de 25-200 mg.kg<sup>-1</sup>, demonstrou possuir atividade antiinflamatória em modelos de inflamação aguda e crônica tanto em ratos quanto em camundongos (Geetha e Varalakshmi, 1998). A melhor atividade (v.o.) foi observada no modelo de inflamação induzida por carragenina. Uma marcante atividade antiinflamatória foi também demonstrada no modelo de artrite crônica, quando o efeito observado do lupeol, na dose de 100 mg.kg<sup>-1</sup>, foi comparável ao do ácido acetilsalisílico. No modelo de artrite induzida por formaldeído, o lupeol foi eficaz numa dose comparável a do ácido acetilsalisílico. Similarmente a outros agentes antiinflamatórios, ele reduziu significativamente o volume do exudado inflamatório, bem como o número total de leucócitos. A redução do exudado (cerca de 32%) após tratamento com o lupeol (200 mg.kg<sup>-1</sup>) foi também observada no

modelo de indução de permeabilidade vascular por ácido acético em camundongos. Verificou-se também que este triterpeno é um inibidor competitivo tanto da tripsina quanto da quimiotripsina (Rajic et al., 2000).



**Figura 03.** Lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol (lupeol)

O lupeol não apresentou efeitos analgésicos nem antipiréticos; por outro lado, também não apresentou atividade ulcerogênica, principal característica das drogas antiinflamatórias não esteroidais. Essas observações sugerem que o lupeol atua na inflamação diferentemente do ácido acetilsalisílico, ou seja, sua atividade antiinflamatória é independente da inibição da enzima cicloxigenase (COX), e da diminuição da síntese de prostaglandinas (Kweifiookai et al., 1995). É possível, portanto, que sua atividade antiinflamatória possa estar vinculada a uma ação imunossupressora, com uma inibição da migração celular ao local do edema e da liberação de fatores quimiotáticos pro-inflamatórios (Fernandez et al., 2001).

Foi observada também uma atividade antiinflamatória nos derivados 3-O-acil do lupeol, que também estão presentes em diferentes plantas medicinais, como por exemplo: o acetato de lupeol e o docosanoilato de lupeol na espécie *Willughbeia firma* (Subhadhirasakul et al., 2000); o linoleato de lupeol isolado da *Crateva nurvala* (Geetha et al., 1998); ou mesmo o linoleato de lupeol e o palmitato de lupeol presentes na casca e raiz da espécie *Alstonia bornei*. Em 1981, Gupta e colaboradores avaliaram a atividade

antiulcerogênica do acetato de lupeol nos modelos de úlcera induzida por estresse e ligadura do piloro, obtendo resultados positivos na dose de 100 mg.kg<sup>-1</sup>, única dose testada. Entretanto, este mesmo derivado do lupeol, quando administrado em ratos na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>/dia, promoveu a infertilidade dos animais (Gupta et al., 2005). O trabalho de Gupta (1981) foi o único estudo de atividade antiulcerogênica de um composto triterpênico da família dos lupanos até o presente momento. Até agora o interesse estava voltado apenas para compostos das famílias dos ursanos e dos oleananos (Snyckers e Fourie, 1983).

Por possuir atividades antiinflamatória e antioxidante *in vivo* (Geetha e Varalakshmi, 2001; Sudhahar et al., 2006), independente da inibição da síntese de prostaglandinas (Kweifiookai et al., 1995); por haver um histórico de atividade antiulcerogênica já comprovada em compostos da mesma família (triterpenos pentacíclicos) e em alguns de seus derivados (Lewis et al., 1991); e por possuir uma baixa toxicidade *in vivo*, além de ser hepatoprotetor (Sunitha et al., 2001; Sudhahar et al., 2006), o lupeol surge como um potencial sucessor, ou mesmo coadjuvante, da terapêutica atual para o tratamento de úlceras gástricas e outras doenças do TGI.

Neste trabalho foi estudada a atividade antiulcerogênica do lupeol, corroborando as informações encontradas na literatura, e sugerindo outros mecanismos de ação.

## **1.6. ESPÉCIES ESTUDADAS**

De acordo com Dematteis e Fernandez (1998), do ponto de vista sistemático, *Vernonia* é um dos gêneros mais complexos da família Asteraceae. Esta complexidade é gerada principalmente pela extrema diversidade de formas biológicas que o gênero exhibe (Stutts, 1988), desde pequenas ervas rosuladas escaposas até grandes árvores. Em uma revisão bibliográfica (Jones, 1977) foram relacionados cerca de 70 gêneros e 1.456 espécies na tribo Vernonieae, com base na morfologia de pólen, número cromossômico e presença de terpenóides, sendo que apenas o gênero *Vernonia* Schreb. contribuiria com cerca de 1.000 espécies.

Dentro do gênero *Vernonia* podemos citar diversas espécies com estudos de atividade biológica já comprovada cientificamente, como podemos observar na tabela 02. Todas estas atividades tornam este gênero interessante sobre o ponto de vista econômico e farmacológico.

**Tabela 02.** Sumário de algumas espécies do gênero *Vernonia* descritas na literatura com atividade biológica.

<b>Espécie</b>	<b>Parte usada</b>	<b>Atividade biológica</b>
<i>Vernonia cinerea</i> (Chea et al., 2006)	Planta inteira	Antimalárico
<i>Vernonia amygdalina</i> (Erasto et al., 2006)	Folhas	Bactericida e fungicida
<i>Vernonia chinensis</i> (Chen et al., 2005)	Folhas	Anticancerígeno
<i>Vernonia scorpioides</i> (Pagno et al., 2006)	Folhas	Anticancerígeno
<i>Vernonia colorata</i> (Cioffi et al., 2004)	Folhas	Antiinflamatório
<i>Vernonia colorata</i> (Sy et al., 2006)	Folhas	Hipo/hiperglicêmico
<i>Vernonia condensata</i> (Frutuoso et al., 1994)	Folhas	Antiulcerogênico
<i>Vernonia polyanthes</i> (da Silveira et al., 2003)	Folhas	Vasodilatador

As duas espécies estudadas neste trabalho foram a *Vernonia polyanthes* Less. e *Vernonia ferruginea* Less:

***Vernonia polyanthes* Less. (figura 04)**

Popularmente conhecida como assa-peixe ou cambará-guassú, esta é uma planta de ampla distribuição, principalmente em áreas abertas como beira de estradas, pastagens e terrenos baldios. Arbusto grande ou arvoreta, perene, ereto, pouco ramificado, rizomatoso, de caules pubescentes de coloração acinzentada, com 1-3 m de altura, é planta nativa da Bahia e Minas Gerais até Santa Catarina, principalmente na orla atlântica. Folhas simples, ásperas ao tato, de 10-24 cm de comprimento; flores esbranquiçadas, melíferas, reunidas em capítulos pequenos dispostos em panículas terminais são as principais características morfológicas desta espécie (Lorenzi e Matos, 2002).

Suas folhas e raízes, em decocção ou infusão, são empregadas na medicina popular como diuréticas, balsâmicas e anti-reumáticas, usadas em casos de gripe, bronquite, pneumonia e tosse persistente (Rossato, 1996; Rodrigues e Carvalho, 2001). Estudos recentes reportaram a atividade vasodilatadora do extrato hidroalcoólico desta espécie (ver tabela 02).



**Figura 04.**

*Vernonia polyanthes*, uma planta indicativa de solos pobres.

(Lorenzi et al., 2002)

***Vernonia ferruginea* Less. (figura 05).**

Popularmente conhecida como assa-peixe-do-pará ou calção-de-velho, é perene, arbustiva ou arbórea, ereta, muito ramificada, de caule lenhoso e rugoso na base, com densa pilosidade ferruginea no ápice. Mede de 2-3,5 m de altura e é nativa do Brasil. É uma das plantas daninhas mais freqüentes em nossas pastagens, ocorrendo em todo o território brasileiro exceto na Região Sul. É mais comum em solos de cerrado e de baixa fertilidade, sendo considerada como um padrão de terras fracas (Lorenzi, 2000).

Suas raízes, em infusão, são empregadas na medicina popular como depurativas e diuréticas (Rodrigues et al., 2001). Até a presente data, não há estudos de atividade biológica reportados na literatura sobre esta espécie.



**Figura 05.**  
*Vernonia ferruginea*, também  
indicativa de solos pobres.

(Lorenzi et al., 2002)

---

## II. Objetivos

1. Avaliar a atividade antiulcerogênica de extratos brutos das espécies *Vernonia polyanthes* Less. e *Vernonia ferruginea* Less, e seus principais mecanismos de ação;
2. Avaliar a atividade antiulcerogênica e cicatrizante de frações semi-purificadas dos extratos brutos com melhor atividade;
3. Identificar o composto majoritário presente nas frações semi-purificadas com melhor atividade;
4. Avaliar a atividade antiulcerogênica e cicatrizante dos compostos ativos majoritários presentes nas frações semi-purificadas com melhor atividade, e seus principais mecanismos de ação.

### 3. Coleta das espécies

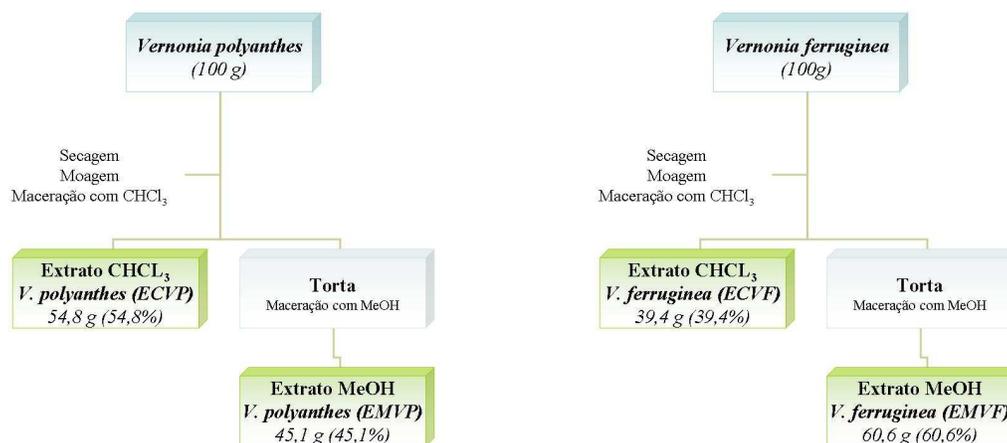
Partes aéreas da *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea* foram coletadas, respectivamente, no cerrado de Rubião Júnior, próximo ao Campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu/SP, e próximo ao Jardim Arroyo em São José do Rio Preto/SP. A identificação botânica e o depósito das exsicatas foram feitos pela Profa Dra. Neusa Taroda Ranga herbário do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São José do Rio Preto/SP sob os números SJRP 131.827 (*V. polyanthes*) e SJRP 27.880 (*V. ferruginea*).

#### 3.1. Preparação dos extratos brutos e frações

Partes aéreas da *V. polyanthes* e *V. ferruginea* foram secas em estufa (7 dias a 40°C) e pulverizadas em moinho de facas. O pó foi exaustivamente extraído com os solventes clorofórmico e metanólico (3 vezes, 72 horas para cada solvente). Os extratos foram concentrados a vácuo, em rotavapor TECNAL<sup>®</sup> modelo TE-058, fornecendo os extratos CHCl<sub>3</sub> e MeOH, conforme apresentados na tabela 03 e nos fluxogramas 01 e 02. Os extratos brutos foram preparados pelo aluno de doutorado Ely Eduardo Saranz Camargo, no Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara/SP, sob a orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

**Tabela 03.** Sumário dos extratos brutos preparados a partir das espécies *V. polyanthes* e *V. ferruginea*. São apresentados os rendimentos de cada extrato e suas siglas.

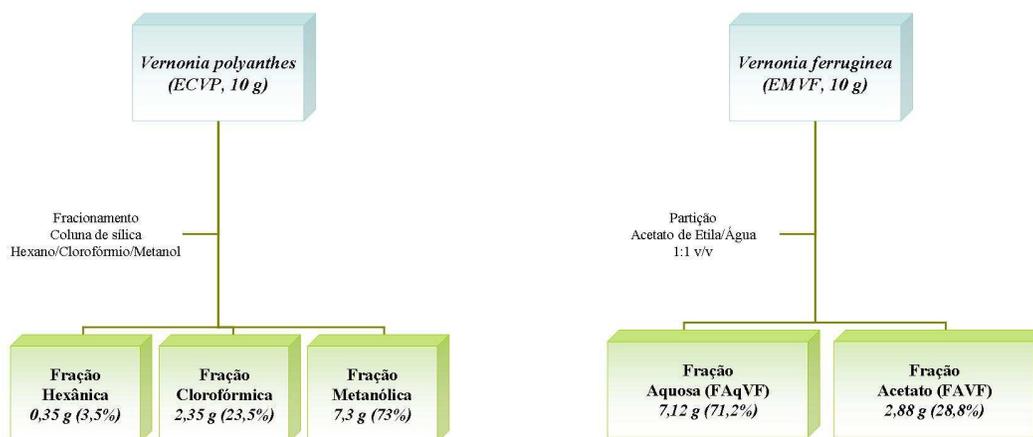
	<i>Vernonia polyanthes</i> (100 g)	<i>Vernonia ferruginea</i> (100 g)
Extrato clorofórmico (CHCl <sub>3</sub> )	ECVP 54,8 g (54,8%)	ECVF 39,4 g (39,4%)
Extrato metanólico (MeOH)	EMVP 45,1 g (45,1%)	EMVF 60,6 g (60,6%)



**Fluxograma 01.** Preparação do ECVP e **Fluxograma 02.** Preparação do ECVF e EMVP a partir das partes aéreas da *V. polyanthes*. **Fluxograma 02.** Preparação do ECVF e EMVF a partir das partes aéreas da *V. ferruginea*.

Para a espécie *V. ferruginea* (fluxograma 04), uma porção (10,0 g) do extrato EMVF foi particionada com uma mistura de acetato de etila e água (1:1, v/v). O rendimento da fração acetato (FAVF) foi de (28,8%) e da fração aquosa foi de (71,2%).

Para a espécie *V. polyanthes* (fluxograma 03), uma porção (10,0 g) do extrato ECVP foi fracionada por Cromatografia em Coluna utilizando como fase estacionária Sílica Gel 60, e como fase móvel os solventes hexano, clorofórmio e metanol. Os rendimentos da fração hexânica (FHVP), fração clorofórmica (FCVP) e da fração metanólica (FMVP) foram de (3,5%), (23,5%) e (73%), respectivamente.



**Fluxograma 03.** Preparação das frações a partir do ECVP da *V. polyanthes*. **Fluxograma 04.** Preparação das frações a partir do EMVF da *V. ferruginea*.

### ***3.2. Triagem fitoquímica dos extratos e identificação do constituinte ativo***

Inicialmente foi feita uma triagem fitoquímica dos extratos metanólico e clorofórmico brutos de ambas as espécies (Wagner e Bladt, 1996). Análises cromatográficas foram feitas por CCD em placas comerciais de sílica-gel (Fluka, 20 x 20 cm x 0.25 mm) eluídas em hexano/acetato de etila (3:1, v/v), para os extratos apolares, ou em metanol/clorofórmio (1:20, v/v) para os extratos polares. Teste para alcalóides foram realizados após revelação com reagente de Dragendorff e iodoplatinado (MATOS, 1997). Flavonóides foram detectados através de sua intensa fluorescência na luz ultravioleta (UV), após revelar as placas com reagente NP/PEG (natural products/polyethylene glycol). Saponinas e triterpenos foram detectados ao verificar manchas roxas nas placas cromatográficas, quando reveladas com anisaldeído/ácido sulfúrico e aquecidas em estufa por cinco minutos a 100°C (Wagner et al., 1996). Teste para taninos foram realizados após adição de cloreto férrico 5% diluído em metanol aos extratos (Simões et al., 2001).

Após realização dos ensaios farmacológicos nos extratos e frações, foi realizado um fracionamento por Cromatografia em Coluna utilizando como fase estacionária Sílica Gel 60 e fase móvel Hexano/Acetato de etila (9:1, v/v), a fim de se identificar a substância majoritária apenas na fração com melhor atividade biológica.

A identificação foi realizada por CCD através da comparação da coloração das manchas e Rf's com padrões comerciais disponíveis no laboratório. Posteriormente, foram realizados experimentos de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C como forma de comprovação da substância identificada. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, experimentos uni e bidimensionais foram registrados nos espectrômetros Varian® INOVA 500 e Brüker® AC-200 F, operando a 500 e 200 MHz para o núcleo de <sup>1</sup>H e 125 e 50 MHz para o núcleo de <sup>13</sup>C respectivamente. Os espectros foram registrados com amostras dissolvidas em DMSO-*d*<sub>6</sub> e utilizando TMS como referência interna. A identificação da substância majoritária foi realizada pelo aluno de doutorado Daniel Rinaldo, no Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara/SP, sob a orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

### **3.3. Animais**

Para avaliação da atividade antiulcerogênica e elucidação do mecanismo de ação dos extratos, frações e compostos ativos obtidos das espécies de *V. polyanthes* e *V. ferruginea*, foram utilizados camundongos machos Swiss, pesando entre 25 a 35 g e ratos machos Wistar, pesando entre 180-250 g, todos provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de 15 dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura de  $(23 \pm 2^\circ\text{C})$  e ciclos claro escuro controlados de 12 h. Os animais foram alimentados com ração Nuvital (Nuvilab) água *ad libitum* à vontade e distribuídos, ao acaso, nos diferentes grupos experimentais. Os períodos de jejum a que foram submetidos os animais estão de acordo com o preconizado para cada uma das metodologias empregadas (especificados nos próximos itens). Os protocolos experimentais dos testes utilizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (Protocolo nº474-1). Todos os experimentos foram iniciados no período da manhã.

### **3.4. Drogas utilizadas**

As drogas utilizadas para determinação da atividade antiulcerogênica e mecanismo de ação foram: carbenoxolona (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), cimetidina (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), lansoprazol (MEDLEY, Campinas, Brasil), piroxicam (EMS Sigma Pharma, São Bernardo do Campo, Brasil), indometacina (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), N-etilmaleimida (NEM) (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), ácido acético P.A. (CHEMCO, Campinas, Brasil) e ácido clorídrico P. A. (CHEMCO, Campinas, Brasil), cloreto de sódio P.A. (CHEMCO, Campinas, Brasil), Tween 80 (SYNTH, Diadema, Brasil).

Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso.

### **3.5. Procedimentos experimentais**

O modelo escolhido para avaliar a atividade gastroprotetora preventiva dos extratos, frações e compostos ativos foi o de úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto. Os extratos brutos com maior eficácia neste modelo eram fracionados objetivando concentrar

os seus constituintes com melhor atividade biológica. Já as melhores frações tiveram seus compostos analisados para posterior isolamento, ou, no caso de ser uma substância já conhecida e comercial, sua compra.

Os possíveis mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção das espécies estudadas foram determinados nos seguintes modelos: a) análise do pH e volume gástrico; b) produção de muco gástrico; c) proteção contra úlceras induzidas por piroxicam; d) produção de prostaglandina (PGE<sub>2</sub>); e) envolvimento do NO e compostos sulfidrila na gastroproteção; f) avaliação da atividade da mieloperoxidase; g) atividade cicatrizante das úlceras induzidas por ácido acético; e h) análise qualitativa de proteínas envolvidas com cicatrização como HSP 70 e PCNA.

Os extratos, frações e composto ativo foram administrados em diferentes doses, por via oral, com exceção do modelo de ligadura do piloro onde a administração foi via intraduodenal.

Para cada um dos modelos experimentais foram utilizados animais como controles positivos (tratados com cimetidina, lansoprazol ou carbenoxolona) e controles negativos (Tween 80<sup>®</sup> 12%).

Nos experimentos de indução de úlcera gástrica, por etanol, piroxicam ou ácido acético, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as lesões ulcerativas gástricas fotografadas para posterior quantificação através do programa Bioview 4 (AvSoft, Brasil), um software de análise de imagens (Khan, 2004).

### **3.6. Toxicidade subcrônica**

O experimento de toxicidade subcrônica é uma estimativa das propriedades tóxicas *in vivo* da substância teste na sua dose terapêutica (Lima et al., 2006). Ratos machos Wistar foram separados em 3 grupos (controle negativo, controle positivo e Lupeol 3 mg.kg<sup>-1</sup>) e tratados (v.o.) durante 14 dias. O peso dos animais foi registrado durante os 14 dias de tratamento. No 15<sup>o</sup> dia os animais foram sacrificados e os órgãos (coração, fígado, rins, pulmões e testículos) removidos para pesagem.

### ***3.7. Úlcera aguda induzida por etanol absoluto***

Ratos machos Wistar foram tratados (v.o.), após 24 horas de jejum, com os extratos, frações ou composto ativo e com os controles: 30 mg.kg<sup>-1</sup> de lansoprazol (controle positivo) ou Tween 80 12% (controle negativo), uma hora antes da indução da lesão gástrica pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto. Após 1 hora da indução os animais foram sacrificados e os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, fixados entre duas lâminas de vidro e fotografados. A área das lesões foi quantificada conforme descrito anteriormente (Morimoto et al., 1991).

### ***3.8. Úlcera aguda induzida por piroxicam (DAINE)***

Camundongos machos Swiss foram tratados, após 24 horas de jejum, com os extratos, brutos e com os controles: 100 mg.kg<sup>-1</sup> de cimetidina (controle positivo) ou Tween 80 12% (controle negativo), 30 minutos antes da indução da lesão gástrica pela administração subcutânea de piroxicam (30 mg.kg<sup>-1</sup>). 4 horas após indução os animais foram sacrificados e os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, fixados entre duas lâminas de vidro e fotografados. A área das lesões foi quantificada conforme descrito anteriormente (Rainsford, 1987).

### ***3.9. Determinação da secreção ácida***

A metodologia utilizada foi descrita por Shay e colaboradores (1945), com algumas modificações (Batista et al., 2004). Após 24 horas de jejum os animais (ratos machos Wistar), sob anestesia (ketamina - 30 mg.kg<sup>-1</sup> /xilazina - 0,3 mg.kg<sup>-1</sup>), sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a localização e amarradura de piloro. As administrações dos extratos brutos, composto ativo, cimetidina 100 mg.kg<sup>-1</sup> (controle positivo) e Tween 80 12% (controle negativo) foram realizadas logo após a amarradura, por via intraduodenal, e as incisões foram suturadas. Quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a incisão reaberta; após ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico), o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida, foram determinados volume gástrico e pH da secreção gástrica com pHmetro (modelo Q 400A Quimis Aparelhos Científico Ltda – Brasil).

### ***3.10. Determinação do muco aderido à mucosa gástrica***

Os animais (ratos machos Wistar) permaneceram em jejum por 24 horas. Foi administrado por via oral os seguintes grupos: salina ou Tween 80 12%, carbenoxolona 200 mg.kg<sup>-1</sup> e extratos brutos ou composto ativo. Os animais, 1 hora após o tratamento, foram anestesiados (ketamina - 30 mg.kg<sup>-1</sup> /xilazina - 0,3 mg.kg<sup>-1</sup>) e sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a localização e amarradura do piloro. Quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a incisão reaberta; o estômago foi retirado, a porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa por 2 horas em 10 mL de solução de Alcian blue de acordo com a metodologia descrita por Corne e colaboradores (1974). O excesso de alcian blue foi removido lavando-se o estômago por duas vezes sucessivas com 7 mL de solução de sacarose 0,25 mol/L; a primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos. O corante complexado ao muco aderido à parede gástrica foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, agitando-se intermitentemente por um minuto a cada 30 minutos durante 2 horas. A 4 mL da mistura foi adicionados 4 mL de éter etílico e, então, a solução foi submetida à agitação por 2 minutos. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 2.000 g e o sobrenadante foi descartado. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 600 nm. A leitura foi feita após realização de uma curva padrão com várias concentrações de alcian blue. Os resultados foram expressos em µg de Alcian blue/mL/g de tecido.

### ***3.11. Determinação da PGE<sub>2</sub> produzida na mucosa gástrica***

O ensaio foi realizado pelo método de Curtis (1995). Ratos machos Wistar permaneceram em jejum por 12 horas. Os animais foram tratados (v.o.) com Tween 80 12% ou composto ativo trinta minutos após pré-tratamento com solução salina 0,9% ou Indometacina (30 mg.kg<sup>-1</sup>, s.c.). Trinta minutos depois, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para retirada do estômago. A porção glandular do estômago foi raspada, pesada e suspensa em 1 mL de tampão Fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,4. O tecido foi homogeneizado com Polytron (PT-10-35, Kinematica AG-Switzerland), e encubado a 37°C por 20 minutos. A prostaglandina, no tampão, foi medida através de técnica de enzimoimunoensaio (EIA) usando o kit KGE004 Parameter (R&D Systems).

### ***3.12. Envolvimento do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção***

Ratos machos Wistar em jejum prévio de 24 horas foram divididos em grupos de acordo com os respectivos tratamentos. Os animais foram pré-tratados com uma injeção subcutânea de solução salina ou L-NAME (70 mg.kg<sup>-1</sup>, diluído em solução salina 0.9%), N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine-methyl-ester, um inibidor da NO-sintase. Após 30 min, os grupos receberam por via oral os respectivos tratamentos, Tween 80 12% ou os extratos brutos. Após 1h, os animais foram tratados oralmente com etanol absoluto. Os animais foram sacrificados após 1 hora e os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, fixados entre duas lâminas de vidro e fotografados. A área das lesões foi quantificada conforme descrito anteriormente (Matsuda et al., 1999).

### ***3.13. Envolvimento do grupamento sulfidrila (SHs) na citoproteção***

Ratos machos Wistar em jejum prévio de 24 horas foram divididos em grupos de acordo com os respectivos tratamentos. Os animais foram pré-tratados com uma injeção subcutânea de solução salina ou NEM (10 mg.kg<sup>-1</sup>, diluído em solução salina 0.9%), N-etilmaleimida, um bloqueador de grupamento sulfidrila. Após 30 min, os grupos receberam por via oral os respectivos tratamentos, Tween 80 12% ou os extratos brutos. Após 1h, os animais foram tratados oralmente com etanol absoluto. Os animais foram sacrificados após 1 hora e os estômagos retirados, abertos no sentido da maior curvatura, fixados entre duas lâminas de vidro e fotografados. A área das lesões foi quantificada conforme descrito anteriormente (Matsuda et al., 1999).

### ***3.14. Atividade da mieloperoxidase (MPO)***

A atividade da MPO na mucosa gástrica foi determinada de acordo com o método de Krawisz e colaboradores (1984). Após o experimento de indução de úlcera por etanol absoluto (descrito acima) a porção glandular do estômago dos animais foi raspada e suspensa em 1 mL de tampão Fosfato de sódio a 50 mM, pH 7,4. O tecido foi homogeneizado com o uso de um Polytron, centrifugado (17.000 g, 4°C por 15 minutos) e o sobrenadante foi analisado. A atividade da MPO foi medida adicionando-se a 10 µL da amostra, 290 µL de tampão Fosfato de sódio a 50 mM (pH 7,4) contendo 0,167 g/L de dihidroclorato o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi

medida em espectrofotômetro a 460 nm, a qual foi realizada entre 1 e 10 minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

### ***3.15. Úlcera crônica induzida por ácido acético***

O experimento foi realizado conforme descrito por Takagi e colaboradores (1969). Os animais (ratos machos Wistar) foram anestesiados (ketamina - 30 mg.kg<sup>-1</sup> /xilazina - 0,3 mg.kg<sup>-1</sup>) e foi realizada uma incisão abdominal. A parede anterior do estômago foi exposta e 50 µL de ácido acético a 30% com auxílio de uma micro seringa, foram injetados na camada submucosa da junção do fundo com o antro. Dois dias após a cirurgia foram iniciados os tratamentos por via oral, diários (uma vez ao dia) durante 14 dias com as frações estudadas ou composto ativo, carbenoxolona 100 mg.kg<sup>-1</sup> (controle positivo) e Tween 80 12% (controle negativo). Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos foram removidos, abertos no sentido da maior curvatura, fixados entre duas lâminas de vidro e fotografados. A área das lesões foi quantificada conforme descrito anteriormente. A lesão, após ser fotografada, foi cortada e fixada imediatamente em uma solução de ALFAC para posteriores análises histológicas, conforme descrito no próximo item.

### ***3.16. Análise histológica***

Os cortes histológicos e lâminas foram todos preparados no laboratório de histologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP- Botucatu/SP) sob a orientação da Profa. Dra. Claudia Helena Pelizzon. Após o experimento de úlcera gástrica induzida por ácido acético, os estômagos dos animais foram abertos no sentido da maior curvatura, a lesão foi medida em área (mm<sup>2</sup>) e, após cuidadosa fixação em placa de isopor com alfinetes, o material foi fixado em solução de ALFAC (formalina, álcool 80%, ácido acético), onde ficou imerso por 24 horas. As peças foram desidratadas e incluídas em paraplast. Posteriormente, os blocos de paraplast foram cortados (7 µm de espessura) em micrótomo de maneira semi-seriada. As lâminas obtidas segundo esse processo foram submetidas à coloração por HE ou hematoxilina-eosina (Behmer et al., 1976) e PAS ou ácido periódico de Schiff (Vacca, 1985) para análises morfológicas em microscopia de luz.

### 3.17. *Imunohistoquímica*

Para análise imunohistoquímica foi utilizada uma lâmina representativa de cada tratamento, dos animais que sofreram úlcera induzida por ácido acético, que foi desparafinizada, re-hidratada e destinada a imunohistoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com leite desnatado e soro normal de carneiro, posteriormente à recuperação antigênica conforme indicação da tabela 04 e as amostras foram incubadas com anticorpos específicos (tabela 04) em solução de bloqueio “overnight”. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão fosfato (0.01 mol/L, pH 7.4) e incubadas em anticorpo secundário (Kit ABC Vector) e revelado com o Avidina-Biotina associado com 3-3`diaminobenzina tetrahydrochloride (DAB, Sigma), e analisadas posteriormente no microscópio LEICA DM acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.1.0 Abril de 2004, Reino Unido. Esse trabalho foi realizado no Setor de Histologia do Departamento de Morfologia, UNESP-Botucatu, sob a orientação da Profa. Dra. Claudia Helena Pellizzon.

**Tabela 04.** Anticorpos e diluições específicas para as reações de imunohistoquímica

<b>Anticorpo</b>	<b>Código</b>	<b>Empresa</b>	<b>Titulação</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Referência</b>
PCNA	NCL-PCNA	Novo Castra	1:100	Citrato+ MW	(Kitajima et al., 1993)
HSP 70	SC-1060	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Não necessita	(Guo et al., 2002)

Citrato+ MW= Tampão citrato 0,01 M com irradiação em forno de microondas.

### 3.18. *Análise estatística*

Os resultados farmacológicos obtidos em ensaios de indução de úlcera gástrica, úlcera subcrônica e estudo do mecanismo de ação, foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média. Esses dados foram submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste a posteriori de Dunnett ou Tukey. O nível de significância permitido foi de  $p < 0,05$  em todas as análises.

Para uma melhor compreensão da seqüência dos experimentos realizados, os resultados foram agrupados por espécie vegetal. Para cada espécie são apresentados os resultados relativos aos testes com os extratos brutos (ECVP e EMVP da *V. polyanthes*; EMVF e ECVF da *V. ferruginea*) e frações semi-purificadas (FCVP e FMVP da *V. polyanthes*; FAVF da *V. ferruginea*). No último item desta seção são apresentados os resultados referentes ao composto ativo isolado do extrato clorofórmico da *V. polyanthes*, o Lupeol.

#### 4.1. *Vernonia polyanthes*

##### a) *Triagem fitoquímica*

A tabela 05 resume os resultados obtidos na etapa de triagem fitoquímica para a espécie *V. polyanthes*. Na figura 06 é apresentada uma CCD realizada com o extrato clorofórmico, com seu respectivo eluente e revelada com anisaldeído sulfúrico. Os dados coletados e apresentados a seguir são essencialmente qualitativos.

**Tabela 05.** Triagem fitoquímica dos extratos clorofórmico (ECVP) e metanólico (EMVP) da *V. polyanthes*.

Constituintes químicos (Reagentes utilizados)	Extratos	
	EMVP	ECVP
Flavonóides (NP/PEG)	+	+
Taninos (Cloreto férrico)	-	-
Saponinas (Anisaldeído)	-	-
Terpenóides (Anisaldeído)	+	+
Alcalóides (Dragendorff)	-	-

-: Ausência do constituinte;

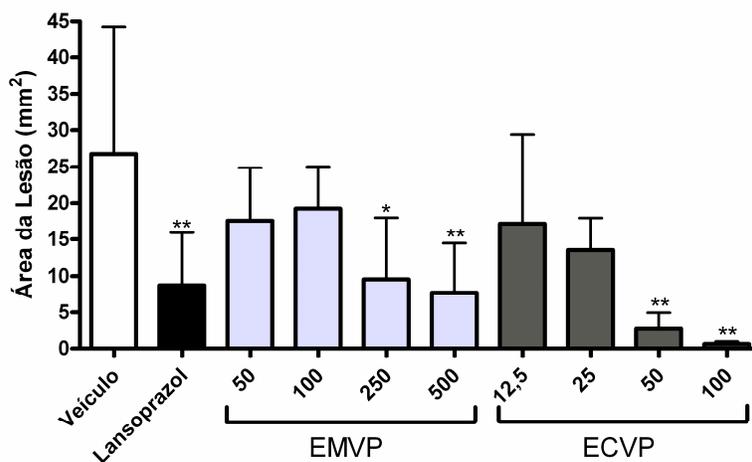
+: Presença do constituinte;



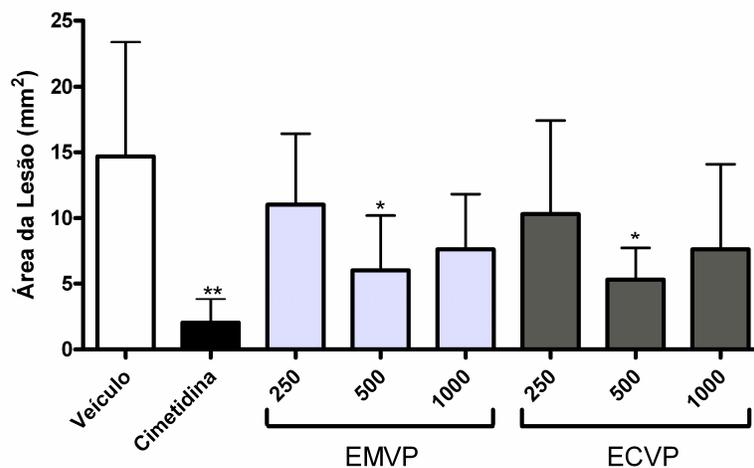
**Figura 06.** CCD dos extratos ECVP da *V. polyanthes* revelada com anisaldeído sulfúrico.

### b) Atividade antiulcerogênica

Os experimentos iniciais tiveram como objetivo demonstrar a atividade antiulcerogênica da espécie estudada em dois modelos experimentais. Os modelos utilizados de indução de lesões gástricas representam duas das principais causas de úlcera no homem, etanol e droga antiinflamatória não esteroidal (DAINEs).



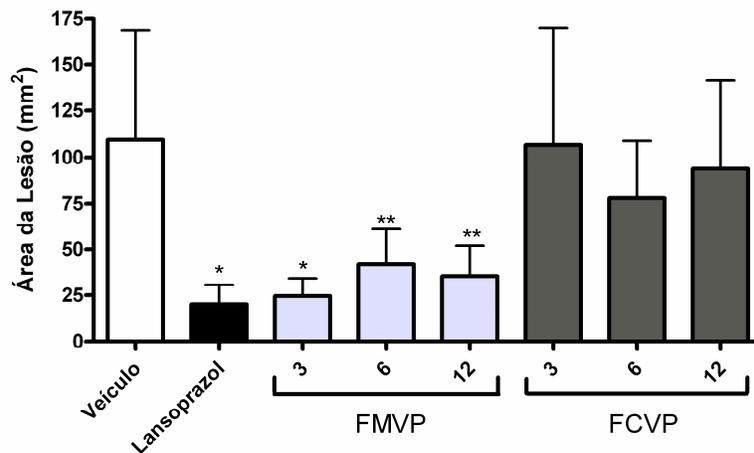
**Figura 07.** Efeito gastroprotetor dos extratos (mg.kg<sup>-1</sup>) EMVP e ECVP da espécie *V. polyanthes* no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Dados expressos como média ± d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\* p<0.01, \* p<0.05 comparados ao veículo.



**Figura 08.** Efeito gastroprotetor dos extratos ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) EMVP e ECVP da espécie *V. polyanthes* no modelo de úlcera gástrica induzida por Piroxicam (DAINE) em camundongos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  comparados ao veículo.

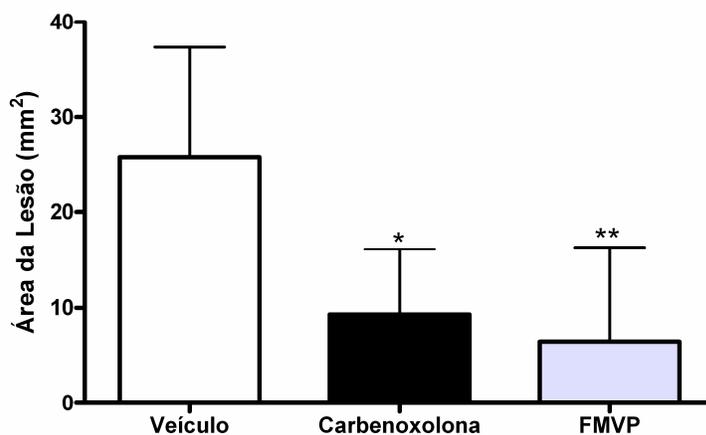
A partir da análise da atividade antiulcerogênica dos extratos EMVP e ECVP da espécie *V. polyanthes* (figuras 07 e 08) observamos que o extrato que melhor protegeu a mucosa gástrica foi o ECVP na dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto. Partimos então para a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica do ECVP na dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  (dados apresentados no item c), enquanto preparávamos as frações do mesmo. As três frações preparadas a partir do ECVP foram a hexânica (FHVP), clorofórmica (FCVP) e metanólica (FMVP).

Uma vez que o ECVP foi fracionado analisamos a atividade antiulcerogênica das frações FCVP e FMVP da espécie *V. polyanthes* (figura 09). A fração FHVP não foi analisada por possuir um baixo rendimento e solubilidade, inviabilizando dessa forma os ensaios *in vivo*.

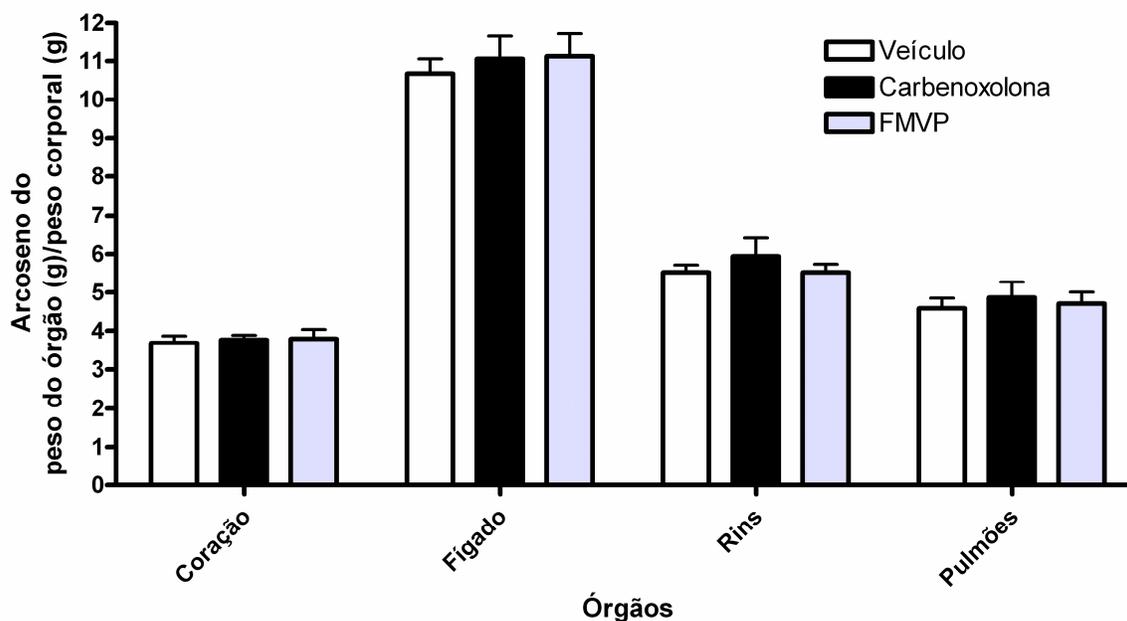


**Figura 09.** Efeito gastroprotetor das frações ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) FCVP e FMVP da espécie *V. polyanthes* no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  comparados ao veículo.

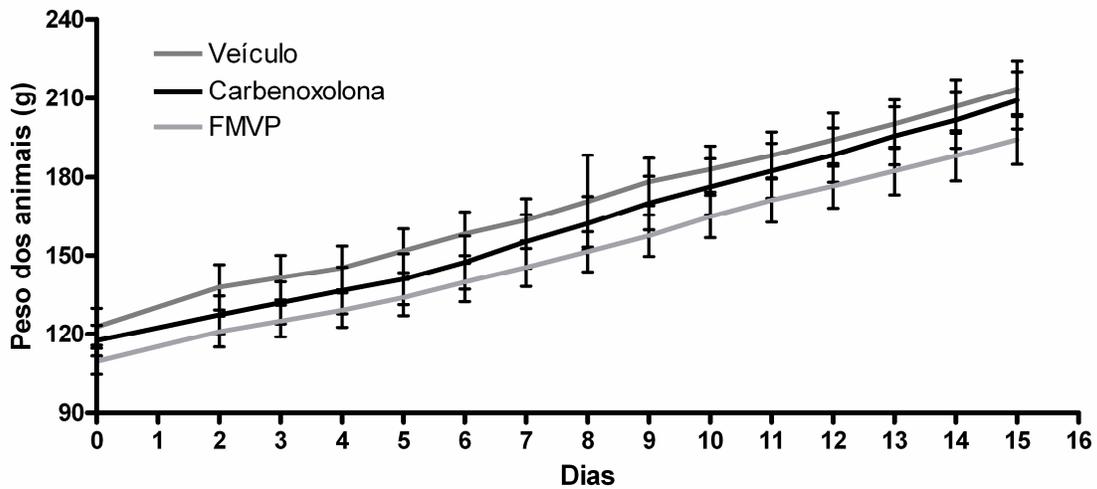
A fração que melhor protegeu a mucosa gástrica foi a FMVP na dose de  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Verificamos então a atividade cicatrizante da FMVP ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera crônica induzida por Ácido Acético e também sua toxicidade *in vivo* (figuras 10, 11 e 12), após tratamento por 14 dias consecutivos.



**Figura 10.** Efeito cicatrizante da fração FMVP (3 mg.kg<sup>-1</sup>) da espécie *V. polyanthes* no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Animais tratados por 14 dias consecutivos. Dados expressos como média ± d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\* p<0.01, \* p<0.05 comparados ao veículo.



**Figura 11.** Avaliação da toxicidade da fração FMVP (3 mg.kg<sup>-1</sup>) da espécie *V. polyanthes* no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FMVP administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos. Dados expressos como média ± d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, p>0.05 comparados ao veículo.

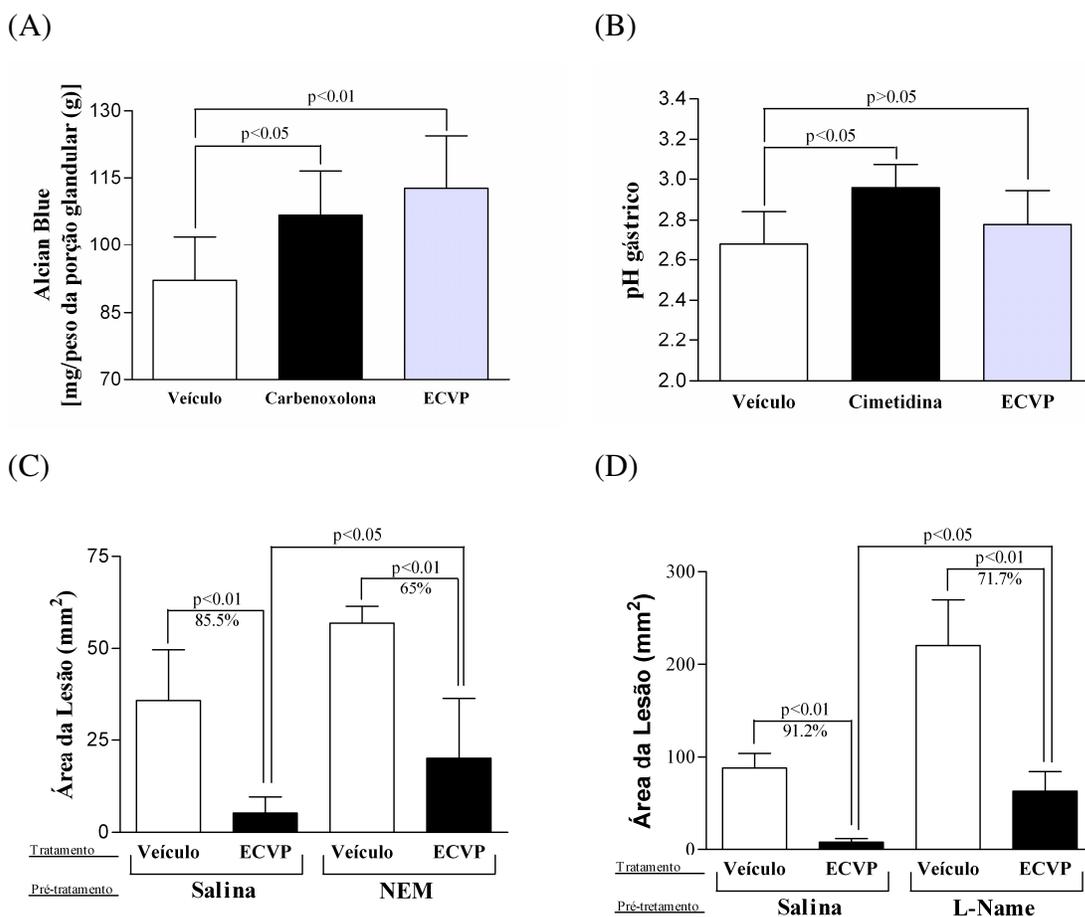


**Figura 12.** Avaliação da toxicidade da fração FMVP ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) da espécie *V. polyanthes* no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FMVP administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett,  $p > 0.05$  comparados ao veículo.

A ótima atividade preventiva e cicatrizante de úlceras gástricas observadas na FMVP nos levou a identificar o seu composto ativo majoritário. No item 4.3. apresentamos todos os resultados obtidos com lupeol, composto ativo majoritário da fração FMVP.

## b) Mecanismos de ação

Nas figuras a seguir mostramos os principais mecanismos de ação envolvidos com a atividade antiulcerogênica do extrato ECVP.



**Figura 13.** Efeito do tratamento agudo com o extrato clorofórmico ECVP no (A) conteúdo de muco aderido à mucosa gástrica; (B) no pH do suco gástrico; (C) no efeito gastroprotetor após tratamento com NEM, um bloqueador dos grupamentos SH; e (D) no efeito gastroprotetor após tratamento com L-NAME, um inibidor da enzima NO sintase. Dados expressos como média  $\pm$  d.p. (n=6-8). ANOVA com análise a posteriori de Dunnett.

## 4.2. *Vernonia ferruginea*

### a) *Triagem fitoquímica*

A tabela 06 resume os resultados obtidos na etapa de triagem fitoquímica para a espécie *V. ferruginea*. Na figura 14 é apresentada uma CCD realizada com o extrato metanólico, com seu respectivo eluente e revelada com anisaldeído sulfúrico. Os dados coletados e apresentados a seguir são essencialmente qualitativos.

**Tabela 06.** Triagem fitoquímica dos extratos clorofórmico (ECVF) e metanólico (EMVF) da *V. ferruginea*.

Constituintes químicos (Reagentes utilizados)	Extratos	
	ECVF	EMVF
Flavonóides (NP/PEG)	+	+
Taninos (Cloreto férrico)	-	-
Saponinas (Anisaldeído)	-	-
Terpenóides (Anisaldeído)	+	+
Alcalóides (Dragendorff)	-	-

-: Ausência do constituinte;

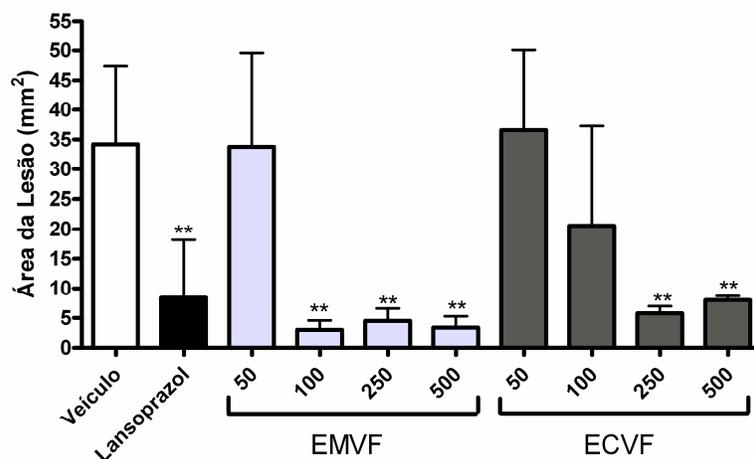
+: Presença do constituinte;



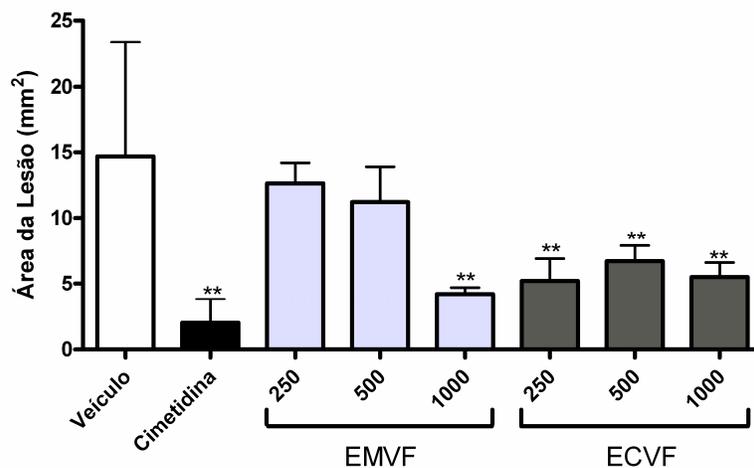
**Figura 14.** CCD dos extratos EMVF da *V. ferruginea* revelada com anisaldeído sulfúrico.

### b) Atividade antiulcerogênica

Os experimentos iniciais tiveram como objetivo demonstrar a atividade antiulcerogênica da espécie estudada em dois modelos experimentais. Os modelos utilizados de indução de lesões gástricas representam duas das principais causas de úlcera no homem, etanol e droga antiinflamatória não-esteroidal (DAINEs).



**Figura 15.** Efeito gastroprotetor dos extratos ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) EMVF e ECVF da espécie *V. ferruginea* no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*  $p < 0.01$ , comparados ao veículo.



**Figura 16.** Efeito gastroprotetor dos extratos ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) EMVF e ECVF da espécie *V. ferruginea* no modelo de úlcera gástrica induzida por Piroxicam (DAINE) em camundongos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  comparados ao veículo.

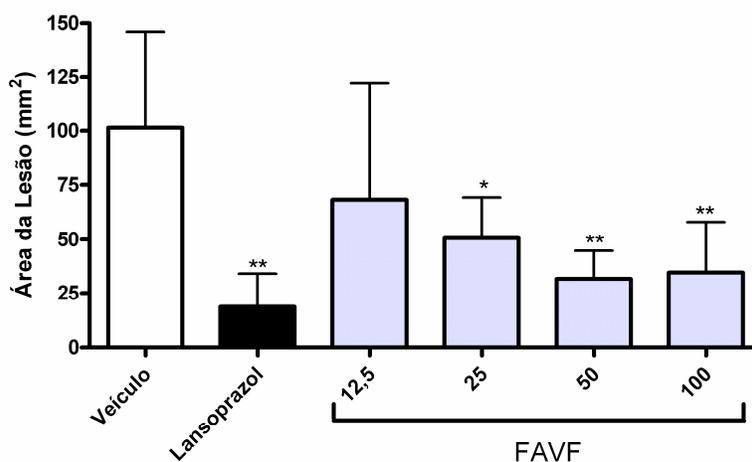
A partir da análise da atividade antiulcerogênica dos extratos EMVF e ECVF da espécie *V. ferruginea* (figuras 15 e 16) observamos que o extrato que melhor protegeu a mucosa gástrica foi o EMVF na dose de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto. Partimos então para a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica do EMVF na dose de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  (dados apresentados no item c), enquanto preparávamos uma partição do mesmo.

Na figura a seguir podemos analisar o perfil por CCD da fração FAVF comparada ao extrato EMVF da espécie *V. ferruginea*.



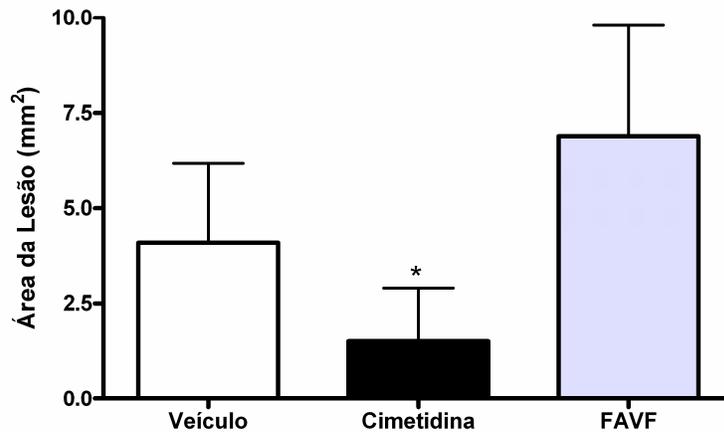
**Figura 17.** CCD comparativo entre o extrato bruto EMVF e a partição acetato FAVF da *V. ferruginea*.

Uma vez que o EMVF foi particionado analisamos a atividade antiulcerogênica da fração FAVF da espécie *V. ferruginea* (figura 18). A fração aquosa FAQVF foi desprezada, por possuir uma baixa concentração de flavonóides e terpenos.

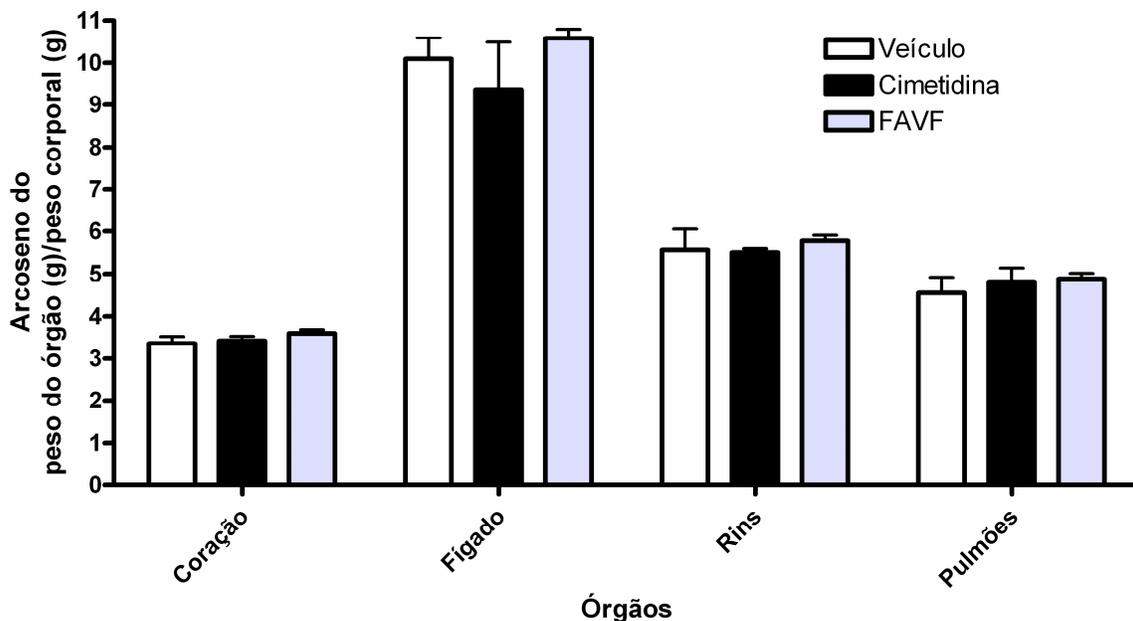


**Figura 18.** Efeito gastroprotetor das frações ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) FAVF da espécie *V. ferruginea* no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  comparados ao veículo.

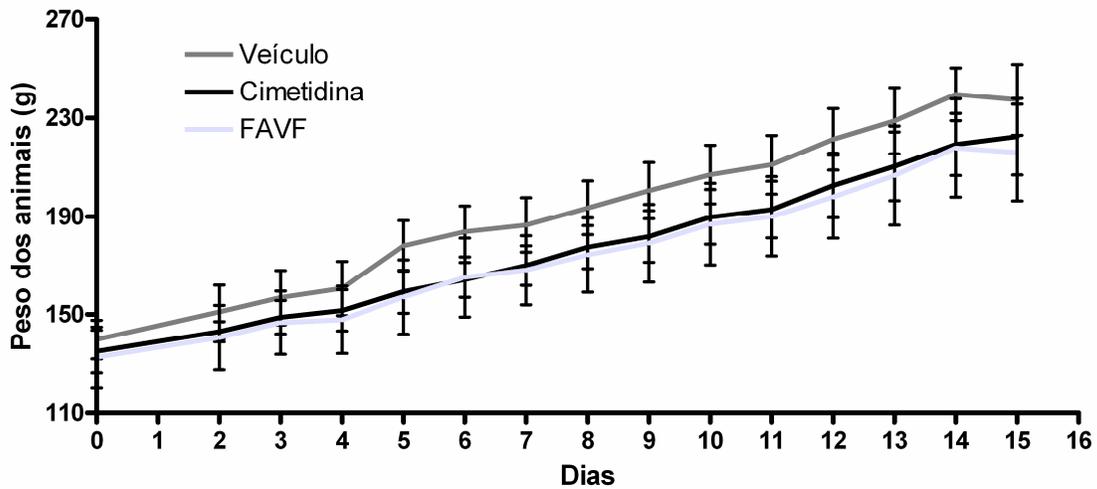
Concluimos que a dose da fração FAVF que melhor protegeu a mucosa gástrica foi a de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Verificamos então a atividade cicatrizante da FAVF ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera crônica induzida por Ácido Acético e também sua toxicidade *in vivo* (figuras 19, 20 e 21).



**Figura 19.** Efeito cicatrizante da fração FAVF (50 mg.kg<sup>-1</sup>) da espécie *V. ferruginea* no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Dados expressos como média ± d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \* p<0.05 comparados ao veículo.



**Figura 20.** Avaliação da toxicidade da fração FAVF (50 mg.kg<sup>-1</sup>) da espécie *V. ferruginea* no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FAVF administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos. Dados expressos como média ± d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, p>0.05 comparados ao veículo.

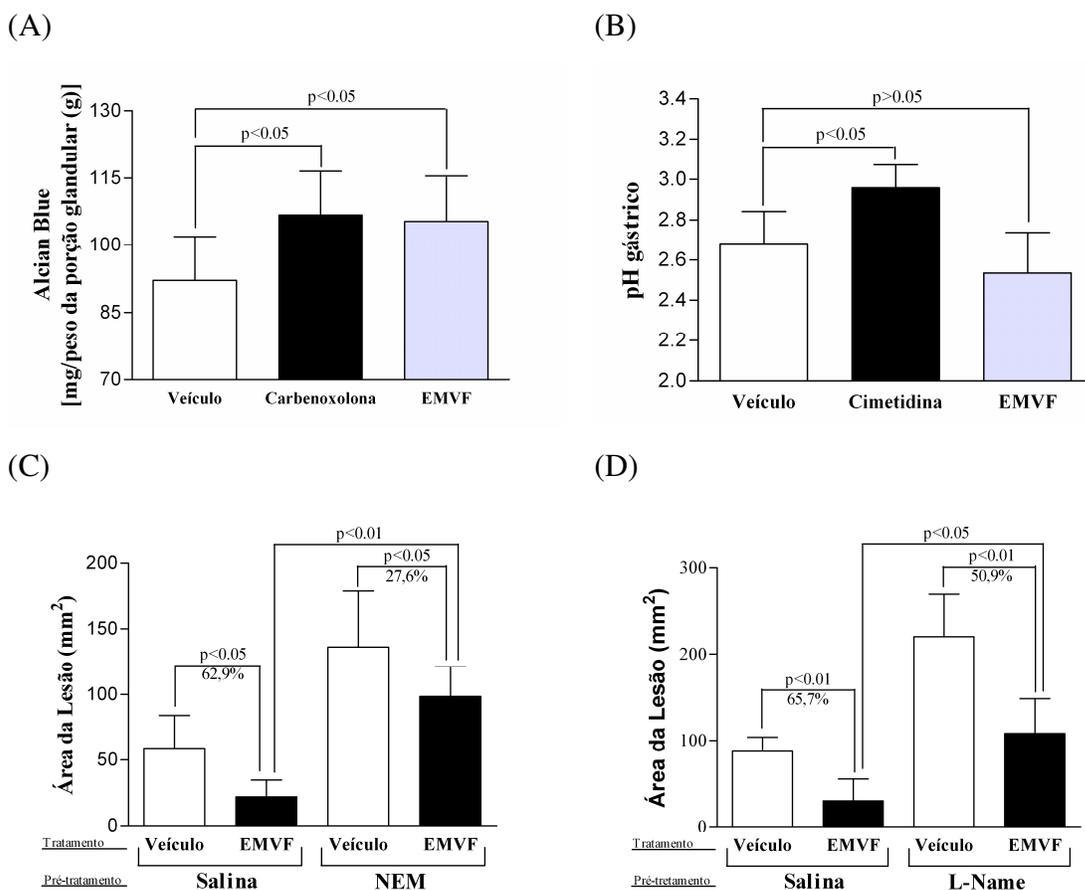


**Figura 21.** Avaliação da toxicidade da fração FAVF ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) da espécie *V. ferruginea* no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FAVF administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett,  $p > 0.05$  comparados ao veículo.

Mesmo com uma boa atividade gastroprotetora preventiva, a ausência de atividade cicatrizante de úlceras gástricas observadas na FAVF nos levou a interromper os teste com esta fração.

### c) Mecanismos de ação

Nas figuras a seguir mostramos os principais mecanismos de ação envolvidos com a atividade antiulcerogênica do extrato EMVF.



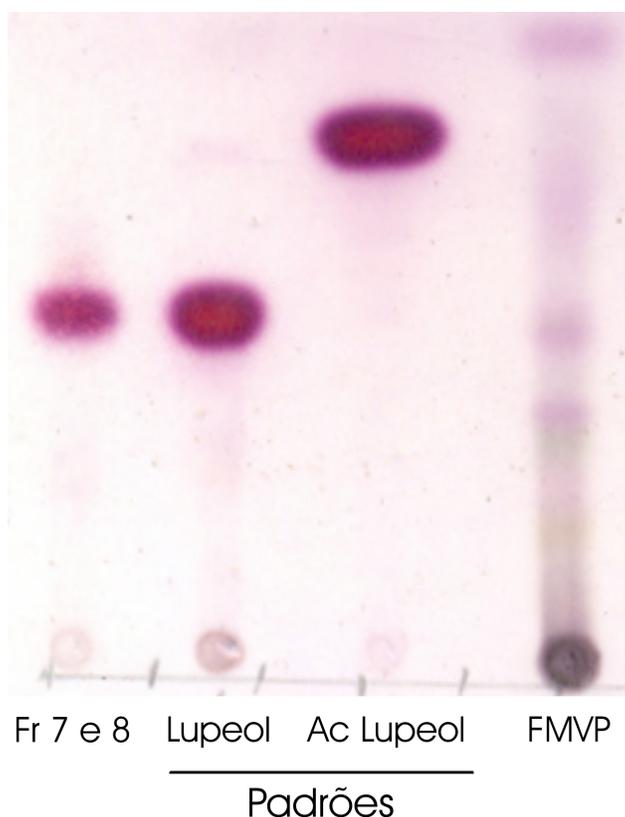
**Figura 22.** Efeito do tratamento agudo com o extrato metanólico EMVF no (A) conteúdo de muco aderido à mucosa gástrica; (B) no pH do suco gástrico; (C) no efeito gastroprotetor após tratamento com NEM, um bloqueador dos grupamentos SH; e (D) no efeito gastroprotetor após tratamento com L-NAME, um inibidor da enzima NO sintase. Dados expressos como média  $\pm$  d.p. (n=6-8). ANOVA com análise a posteriori de Dunnett.

### 4.3. Lupeol

#### a) Identificação química

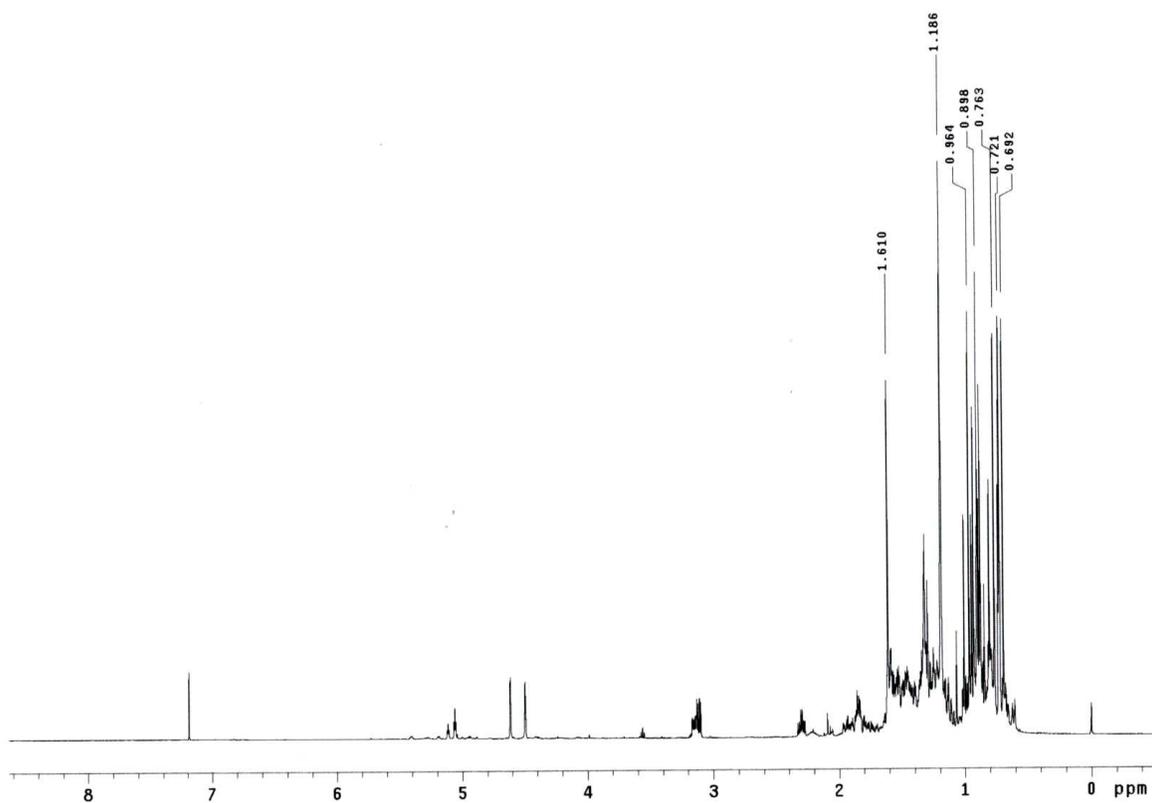
A identificação do composto lupeol, 20(29)-Lupen-3 $\beta$ -ol (triterpeno pentacíclico da família dos lupanos), foi realizada por CCD através da comparação da coloração das manchas e Rf's com padrões comerciais disponíveis no laboratório (figura 23). Em seguida, foram realizados experimentos de RMN- $^1\text{H}$  e RMN- $^{13}\text{C}$  como forma de comprovação da substância identificada (figura 24 e 25). A comparação dos dados obtidos da substância presente nas frações 7 e 8 com os descritos na literatura (Mahato e Kundu, 1994) sugeriu propor a substância como sendo lupeol.

O lupeol aparenta, portanto, ser a substância majoritária da FMVP, uma vez que não foram realizados ensaios quantitativos na fração.

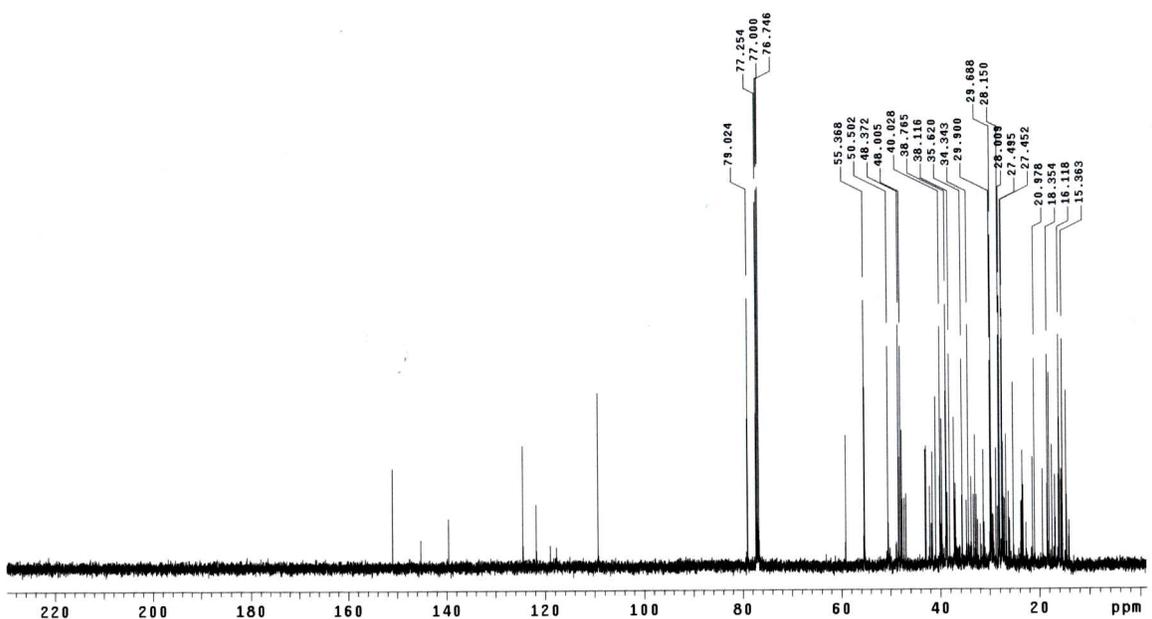


**Figura 23.** CCD da fração FMVP, dos padrões lupeol e lupeol acetato e das frações 7 e 8 resultantes do fracionamento da FMVP por cromatografia em coluna.

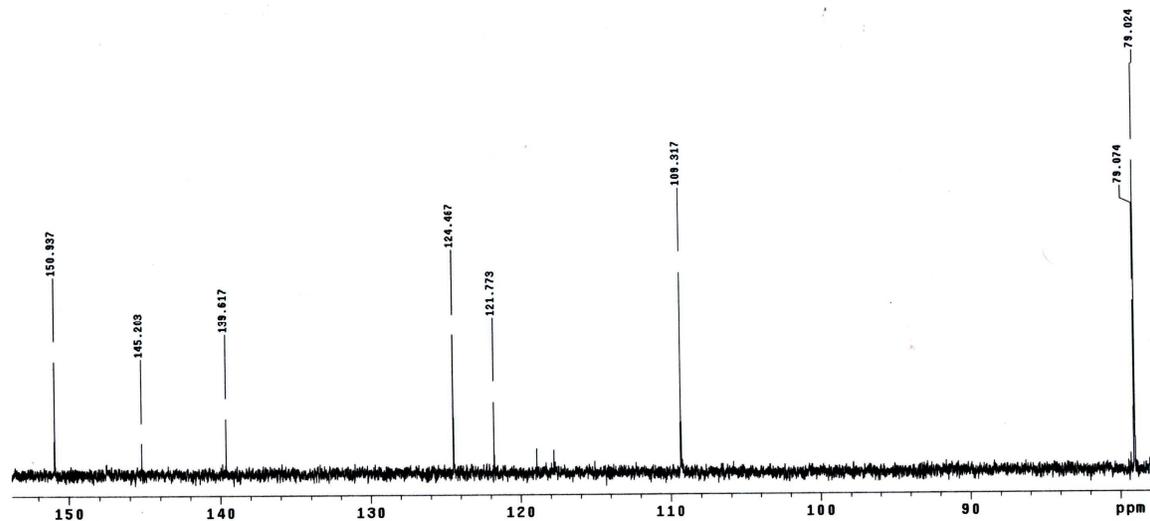
(a)



(b)



**Figura 24.** Ressonância magnética nuclear, a) RMN-<sup>1</sup>H e b) RMN-<sup>13</sup>C, das frações 7 e 8 resultantes do fracionamento da FMVP por cromatografia em coluna. Comprovação estrutural da substância identificada lupeol.



**Figura 25.** Ressonância magnética nuclear, RMN-<sup>13</sup>C, das frações 7 e 8 resultantes do fracionamento da FMVP por cromatografia em coluna. Ampliação da região 80-160 ppm da figura 24b.

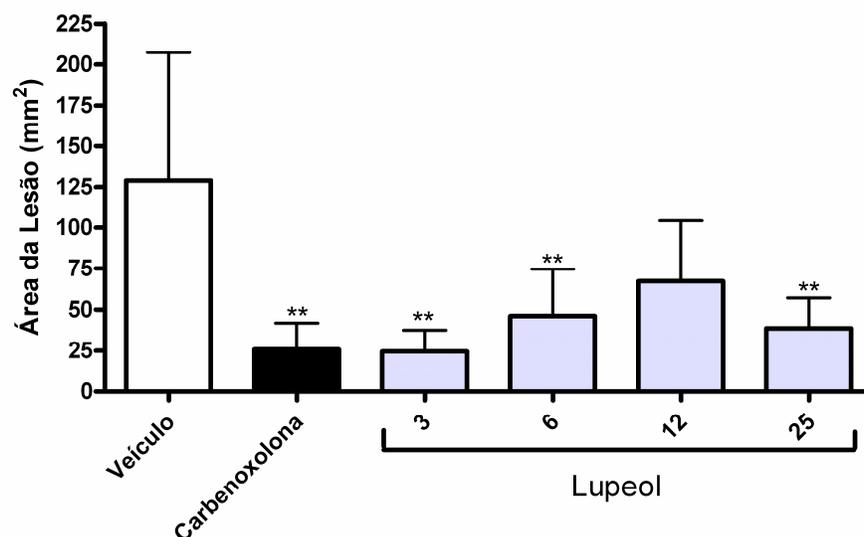
O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do lupeol (figura 24a) caracterizou-se pela predominância de sinais na região diamagnética característicos de triterpenos e pela presença de singletos largos na região relativa aos hidrogênios olefínicos. Na primeira região observou-se entre outros, os singletos em  $\delta$  0,74; 0,77; 0,81; 0,92; 0,95 e 1,01 atribuídos aos seis grupos metílicos presentes na estrutura e um singlete em  $\delta$  1,67 correspondente aos hidrogênios metílicos H-30 do derivado lupano. Observou-se também um multipletto em  $\delta$  3,20 característico de um hidrogênio oximetínico. Na região dos hidrogênios olefínicos observou-se um singlete largo em  $\delta$  4,55 e outro em  $\delta$  4,67 referentes a dois hidrogênios não equivalentes de um grupo metilênico em ligação dupla exocíclica.

A análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (figura 24b e 25) confirmou a presença de ligação dupla pelos sinais em  $\delta$  109,3 (CH<sub>2</sub>) e 105,9 (C) característicos dos carbonos olefínicos C-29 e C-20, respectivamente, de triterpeno derivado do lupano. As metilas foram confirmadas pela presença dos carbonos em  $\delta$  14,5; 15,3; 15,9; 16,1; 17,9; 19,3 e 27,9. O sinal em  $\delta$  78,9 presente no espectro é característico de carbono carbinólico.

A comparação dos dados obtidos da substância isolada com os descritos na literatura propõe a substância como sendo o lupeol.

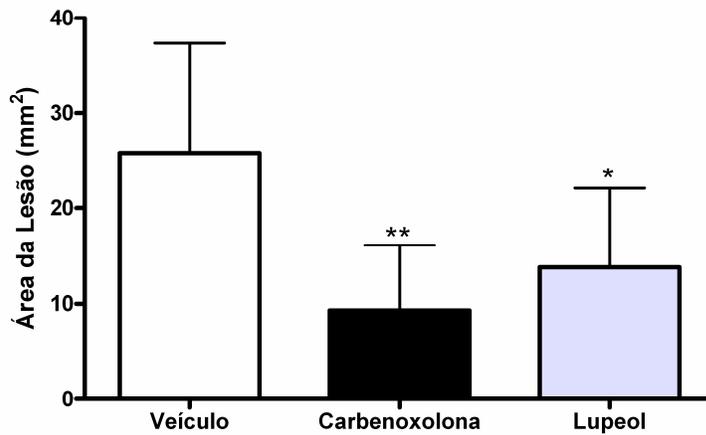
### ***b) Atividade antiulcerogênica***

O experimento inicial teve como objetivo demonstrar a atividade antiulcerogênica do lupeol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto (figura 26).

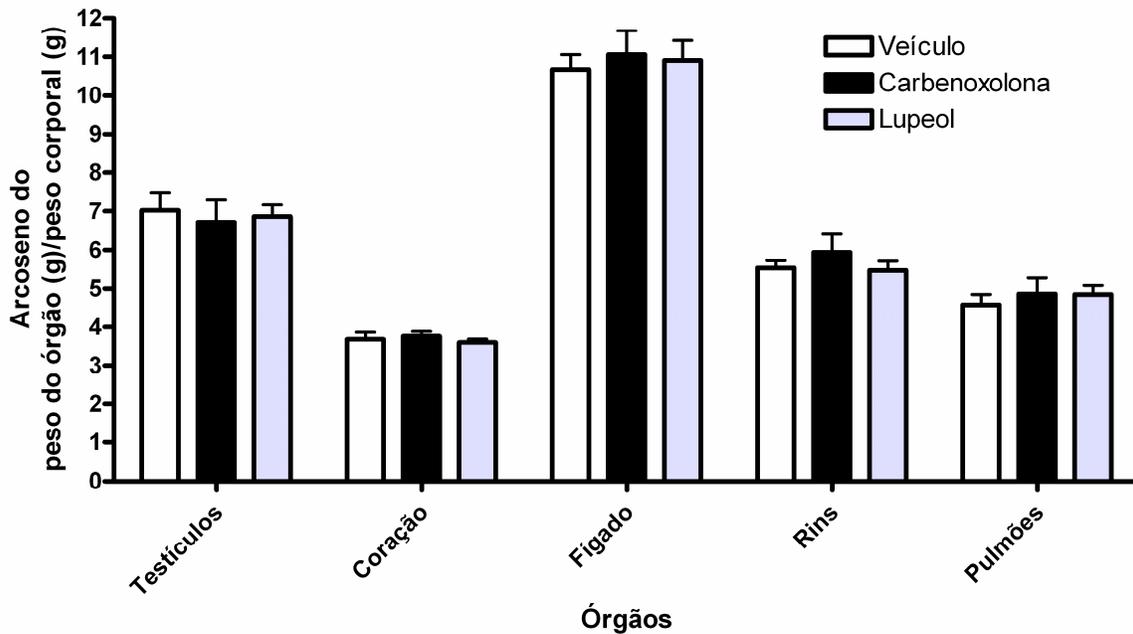


**Figura 26.** Efeito gastroprotetor do lupeol ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*  $p < 0.01$  comparados ao veículo.

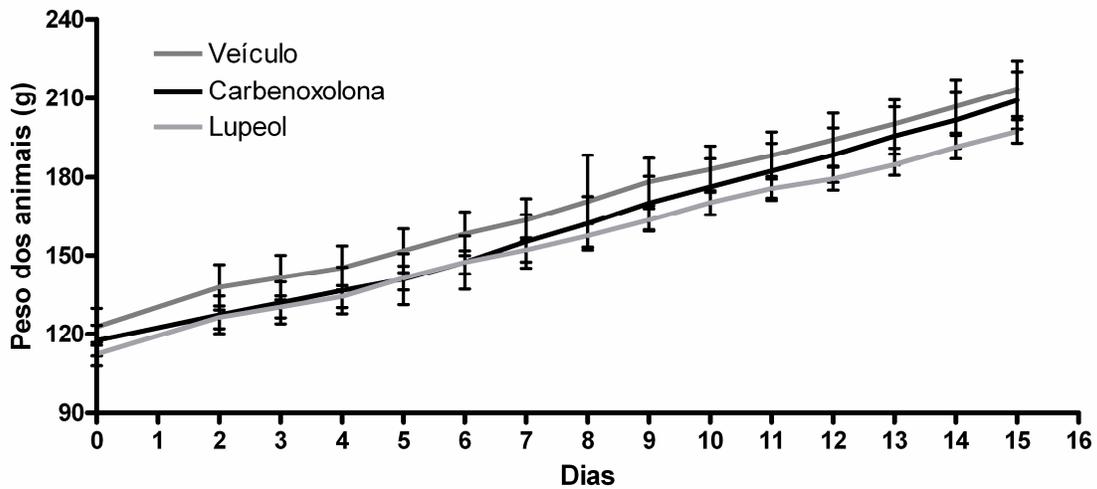
Concluimos que a dose do lupeol que melhor protegeu a mucosa gástrica foi a de  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ , mesma dose efetiva da sua fração de origem. Verificamos então a atividade cicatrizante do lupeol ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera crônica induzida por Ácido Acético e também sua toxicidade *in vivo* (figuras 27, 28 e 29).



**Figura 27.** Efeito cicatrizante do lupeol ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  comparados ao veículo.



**Figura 28.** Avaliação da toxicidade do lupeol ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FAVF administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos órgãos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett,  $p > 0.05$  comparados ao veículo.

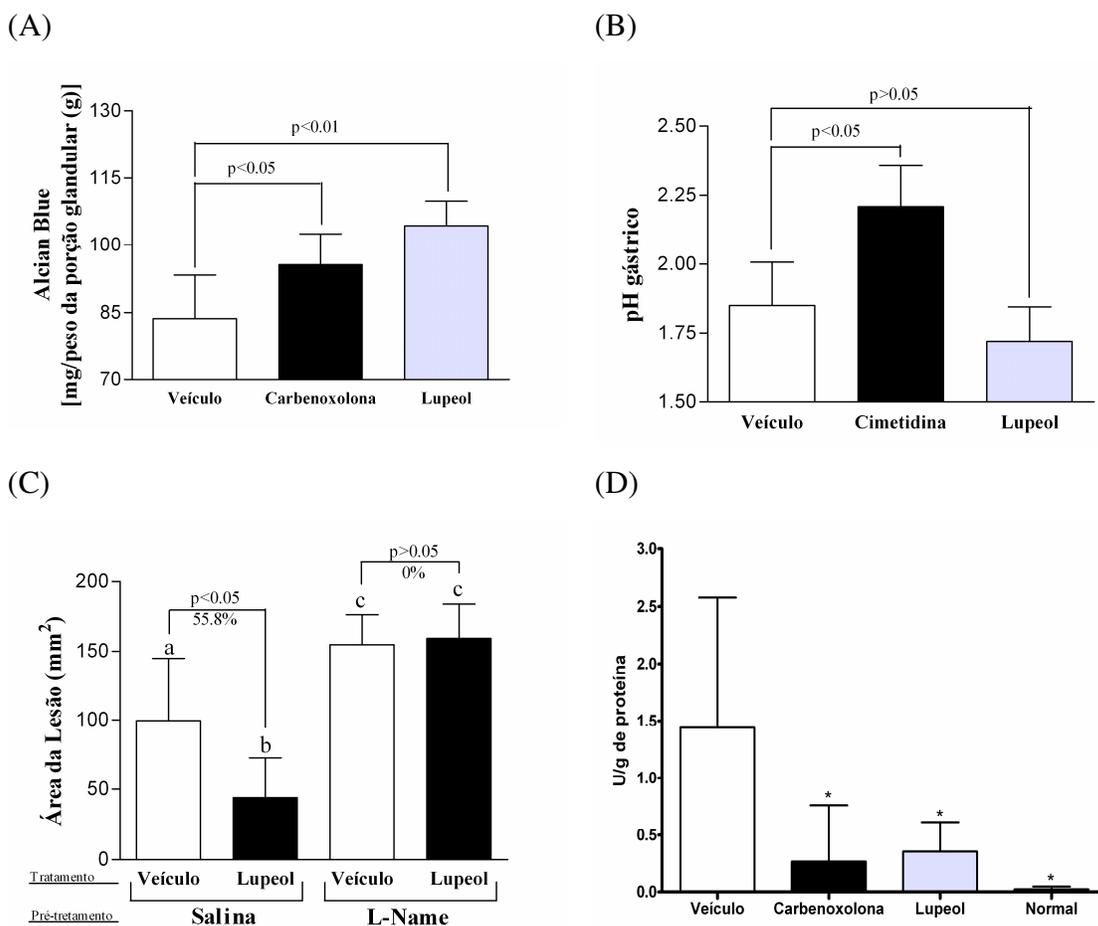


**Figura 29.** Avaliação da toxicidade lupeol ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) no modelo de úlcera gástrica induzida ácido acético em ratos. Efeito da FAVF administrada durante 14 dias consecutivos sobre o peso dos animais. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett,  $p > 0.05$  comparados ao veículo.

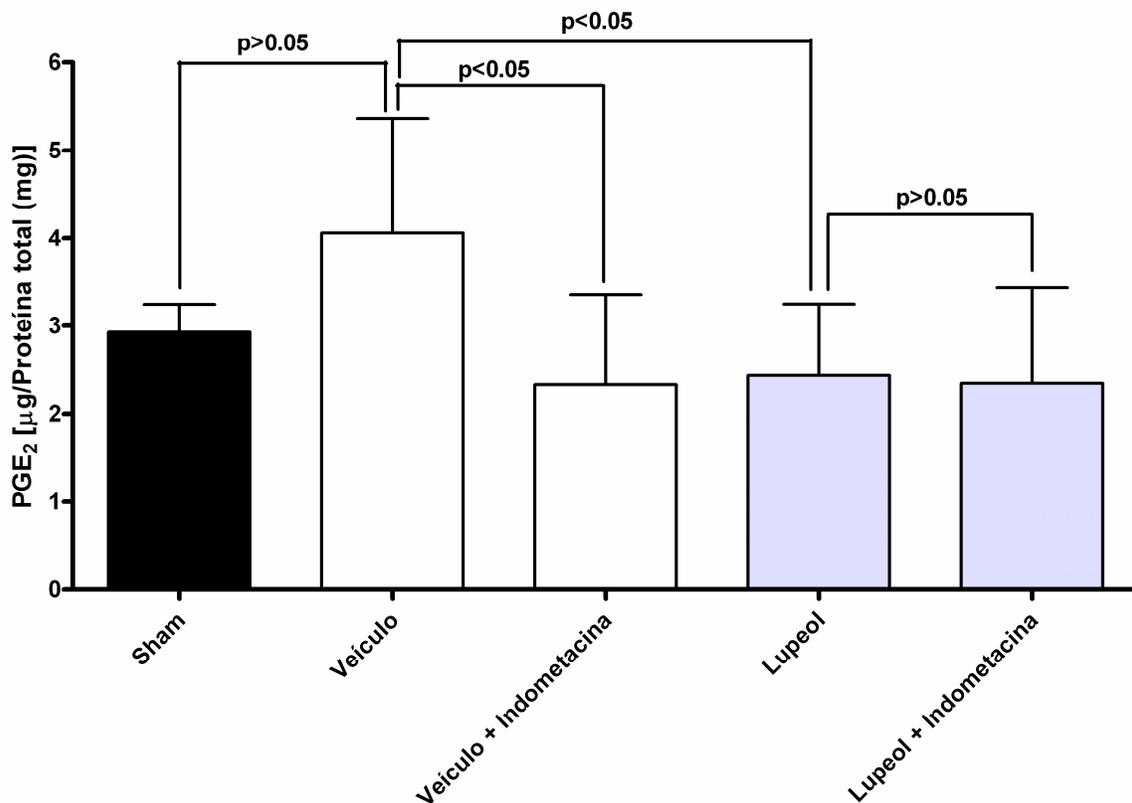
O lupeol apresentou uma forte atividade gastroprotetora em experimentos agudos e crônicos. Partimos então para a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica do lupeol na dose de  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ , apresentados no próximo item.

### c) Mecanismos de ação

Nas figuras a seguir mostramos alguns dos principais mecanismos de ação envolvidos com a atividade antiulcerogênica do Lupeol.



**Figura 30.** Efeito do tratamento agudo com o Lupeol na dose de 3 mg.kg<sup>-1</sup> no (A) conteúdo de muco aderido à mucosa gástrica; (B) no pH do suco gástrico; (C) no efeito gastroprotetor após tratamento com L-NAME, um inibidor da enzima NO sintase; e (D) na atividade da mieloperoxidase, um indicador de infiltração de neutrófilos. Dados expressos como média ± d.p. (n=6-8). ANOVA com análise a posteriori de Dunnett.



**Figura 31.** Efeito da administração oral do lupeol ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) na produção de prostaglandina  $E_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) na mucosa gástrica de ratos. Dados expressos como média  $\pm$  d.p.. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, comparados ao veículo.

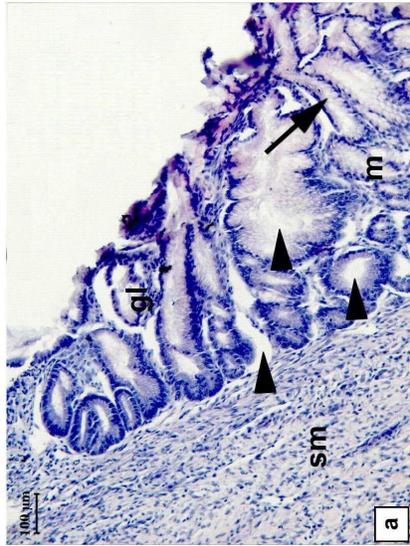
As próximas figuras (32 a 35) são demonstrativas dos resultados obtidos nos estudos histológicos e imunohistoquímicos dos estômagos de ratos tratados por 14 dias com a FMVP e o lupeol, após, terem sofrido indução de úlcera por ácido acético. As legendas das figuras indicam detalhadamente o tratamento, a coloração e o objeto de cada estudo em particular, além de conter os grupos controles (sham) de cada experimento. Os resultados encontrados aparecem colocados logo após a legenda da prancha que foi opcionalmente apresentada separadamente sempre na página seguinte.

**Figura 32. Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com a FMVP e o lupeol. Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise da organização morfológica da mucosa onde se observa em (a) grupo veículo (controle negativo – tween 80 12%); (b) grupo carbenoxolona (controle positivo – 100 mg.kg<sup>-1</sup>); (c) animal normal, sem lesão da mucosa; (d) FMVP (3 mg.kg<sup>-1</sup>); (e) lupeol (3 mg.kg<sup>-1</sup>).**

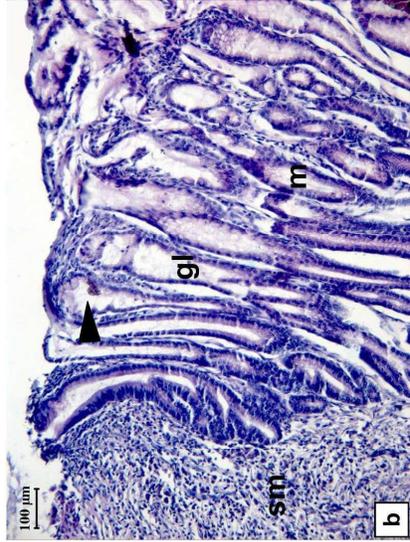
a) notar a grande dilatação (cabeça de seta) das glândulas estomacais da mucosa (gl) e presença de pouco material no interior das glândulas (seta); b) notam-se as glândulas da mucosa dilatadas (cabeça de seta), entretanto com uma menor dilatação quando comprada com o veículo; c) glândulas tubulosas retas sem dilatação (seta); d) e e) nota-se uma grande organização das glândulas da mucosa com uma dilatação discreta (cabeça de seta) e com material secretado no interior (seta). Chama a atenção a grau de organização do material do grupo lupeol.

# H&E

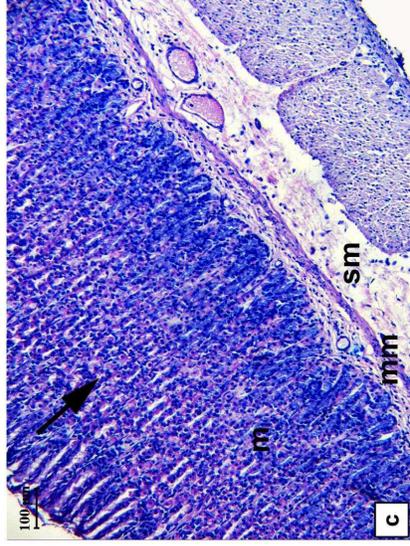
**Veículo**



**Carbenoxolona**



**Normal**



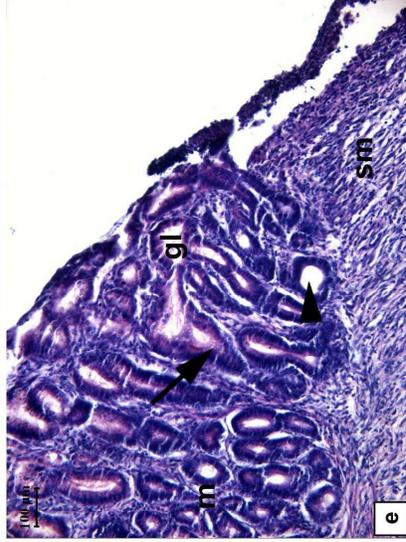
**Controles**

**Tratamentos**

**FMVP**



**Lupeol**

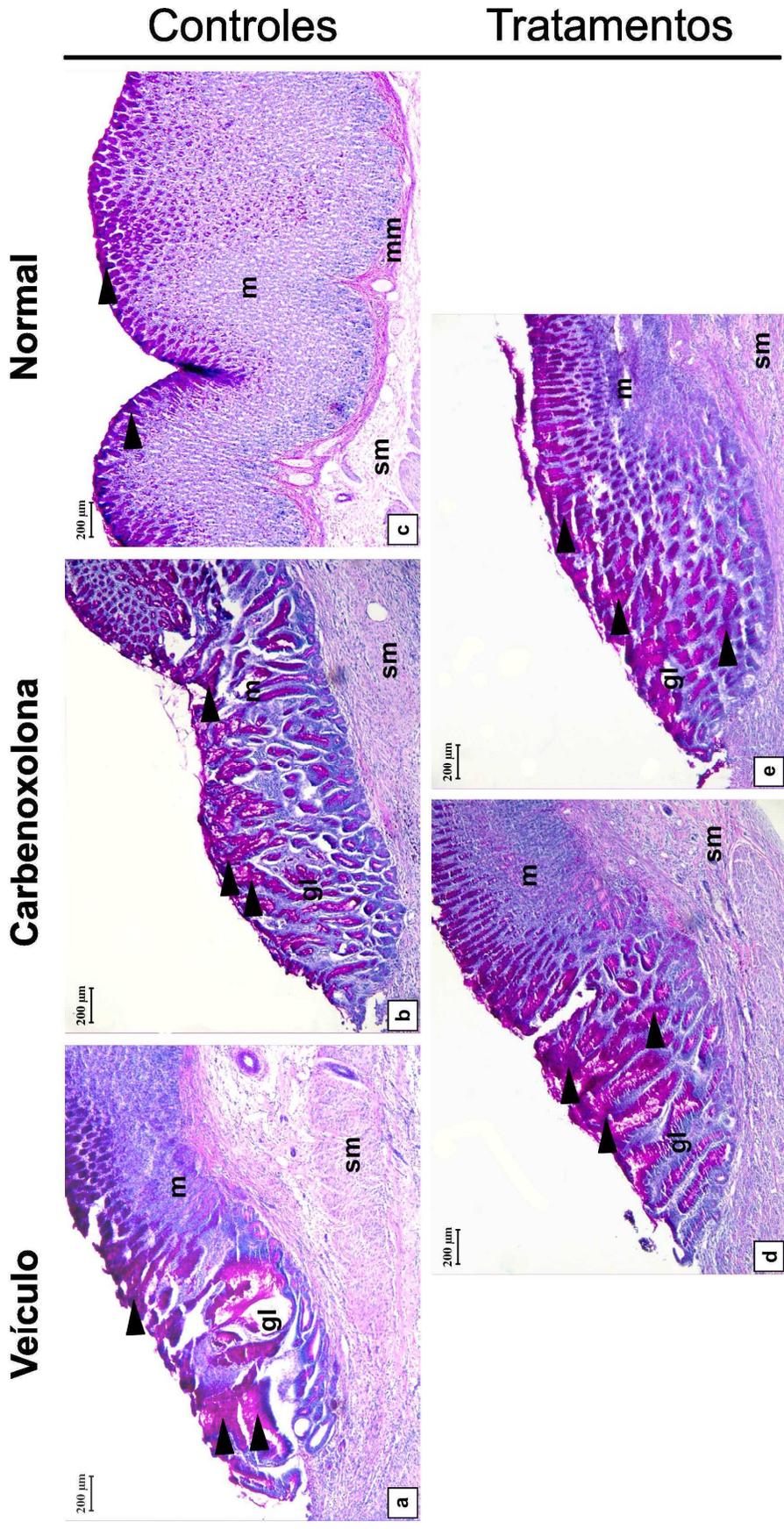


gl: glândulas da mucosa    m: mucosa gástrica    mm: muscular da mucosa    sm: sub-mucosa gástrica  
 Setas indicam a presença de dilatação nas glândulas da mucosa

**Figura 33. Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com a FMVP e o lupeol. Cortes histológicos corados com ácido periódico de Schiff (PAS), marcador de glicoproteínas, para visualização do muco gástrico. O muco produzido cora-se em púrpura em (a) grupo veículo (controle negativo – tween 80 12%); (b) grupo carbenoxolona (controle positivo – 100 mg.kg<sup>-1</sup>); (c) animal normal, sem lesão da mucosa; (d) FMVP (3 mg.kg<sup>-1</sup>); (e) lupeol (3 mg.kg<sup>-1</sup>).**

Nota-se uma maior quantidade de muco (cabeças de seta) nos grupos carbenoxolona (b), FMVP (d) e lupeol (e), quando comparados ao grupo veículo (a). Entretanto, observa-se no grupo lupeol uma maior homogeneidade na secreção de muco, o que corrobora os dados estequiométricos (figura 30a).

# PAS



**FMVP**

**Lupeol**

gl: glândulas da mucosa    m: mucosa gástrica    mm: muscular da mucosa    sm: sub-mucosa gástrica  
 Setas indicam a presença de muco aderido à mucosa

**Figura 34. Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com a FMVP e o lupeol. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de *Heat Shock Protein* (HSP) 70 revelado com 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase que promove a cor marrom como resposta positiva de reação. Esse experimento foi realizado para a verificação da participação dessa proteína no processo de cicatrização, onde se observa em (a) grupo veículo (controle negativo – tween 80 12%); (b) grupo carbenoxolona (controle positivo – 100 mg.kg<sup>-1</sup>); (c) animal normal, sem lesão da mucosa; (d) FMVP (3 mg.kg<sup>-1</sup>); (e) lupeol (3 mg.kg<sup>-1</sup>).**

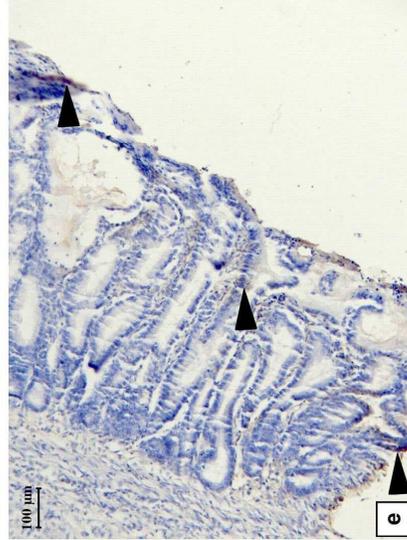
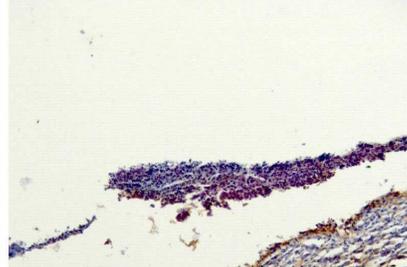
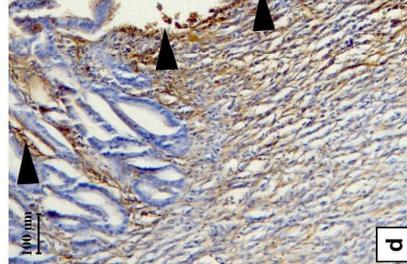
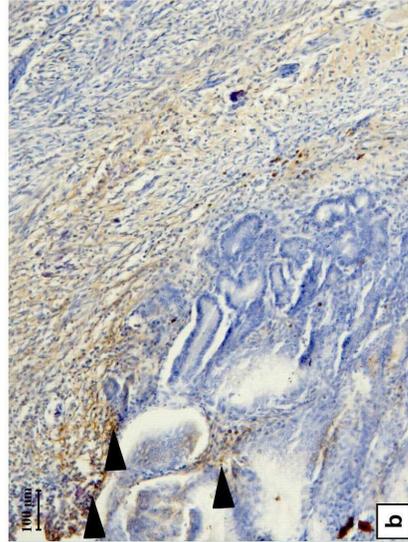
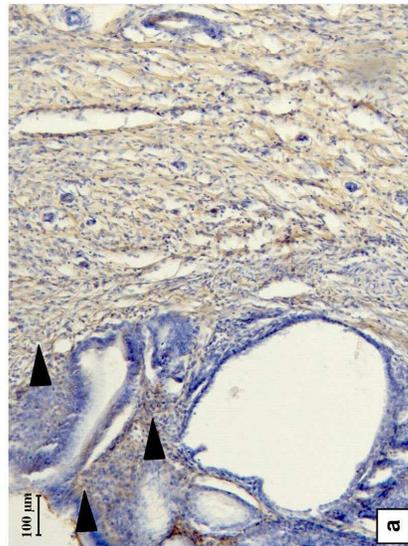
Nota-se a presença de HPS 70 nos grupos veículo (a), carbenoxolona (b) e FMVP (c). Eles apresentam positividade para essa proteína nas células do tecido conjuntivo da mucosa e submucosa (cabeças de seta). No grupo normal (c) e lupeol (e) não se observa grande positividade para essa proteína.

# HSP 70

**Veículo**

**Carbenoxolona**

**Normal**



**Controles**

**Tratamentos**

**Lupeol**

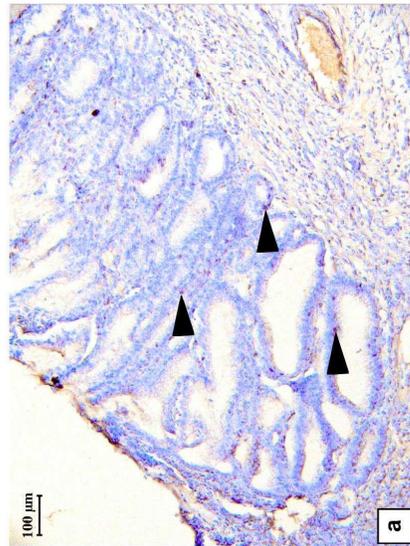
**FMVP**

**Figura 35. Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com a FMVP e o lupeol. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de *Proliferation cell nuclear antigen* (PCNA) revelado com 3´3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase que promove a cor marrom como resposta positiva de reação. Esse experimento foi realizado para a verificação do processo de divisão celular, onde se observa em (a) grupo veículo (controle negativo – tween 80 12%); (b) grupo carbenoxolona (controle positivo – 100 mg.kg<sup>-1</sup>); (c) animal normal, sem lesão da mucosa; (d) FMVP (3 mg.kg<sup>-1</sup>); (e) lupeol (3 mg.kg<sup>-1</sup>).**

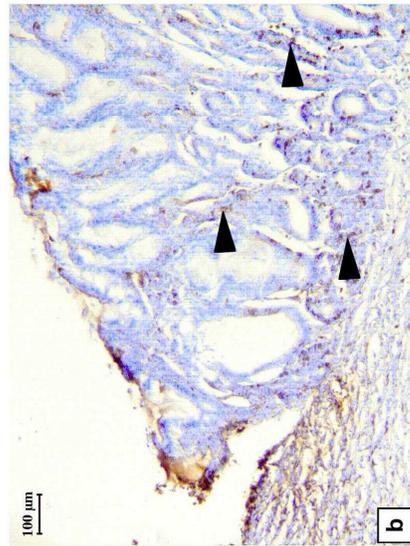
Nota-se nos grupos teste a proliferação celular não exacerbada, com células proliferativas presentes em sua maioria na base das glândulas gástricas (cabeças de seta). Somente no grupo lupeol (e) não se observa positividade para PCNA, nem na base das glândulas e nem na região da borda da lesão. No grupo normal (c) às células PCNA positivas são observadas predominantemente na região central das glândulas.

**PCNA**

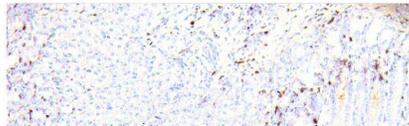
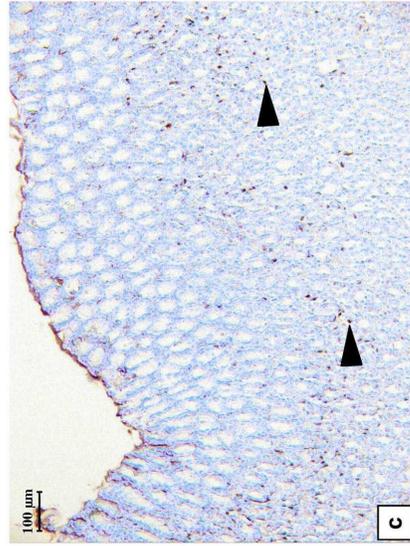
**Veículo**



**Carbenoxolona**



**Normal**



**Controles**

**Tratamentos**

**FMVP**

**Lupeol**

Para se realizar pesquisa com plantas medicinais e obter sucesso na investigação farmacológica são necessários critérios adequados na seleção das espécies vegetais. Segundo Holetz e colaboradores (2002), a escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) seria óbvia, devido ao acúmulo milenar das informações, o que aumenta a possibilidade de se descobrir novos compostos. Porém, a seleção com base nos constituintes químicos (potencialmente ativos) encontrados em um dado gênero ou família torna-se interessante principalmente pela possibilidade de se encontrar quantidades elevadas de compostos ativos.

Dentro do gênero *Vernonia* podemos citar diversas espécies com atividade biológica já comprovada cientificamente, citadas na tabela 02 (Introdução). Além disso, este gênero é citado em inúmeros trabalhos etnofarmacológicos como possuidor de atividades diuréticas, balsâmicas, anti-reumáticas, anti-gripal, no tratamento de bronquites, pneumonias e tosse persistente (Rossato, 1996; Rodrigues et al., 2001). Mais especificamente, a espécie *Vernonia condensata*, empregada popularmente no tratamento de desordens gastrintestinais (Rizzo et al., 1985), já teve suas atividades antiulcerogênica, analgésica e antiinflamatória comprovadas em estudos anteriores (Frutuoso et al., 1994; Valverde et al., 2001; Monteiro et al., 2001). Assim as atividades encontradas tornam este gênero interessante sobre o ponto de vista econômico e farmacológico.

Com base nas evidências supracitadas, na experiência do nosso laboratório no estudo da atividade gastroprotetora de plantas medicinais e em dados etnobotânicos, as espécies *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea* foram selecionadas para os estudos de atividade antiulcerogênica.

Diferentemente da *V. ferruginea*, que não possui estudos científicos de atividade farmacológica, a espécie *V. polyanthes* já foi objeto de um estudo envolvendo a avaliação da atividade hipotensora e de seus efeitos na excreção renal de sódio (da Silveira et al., 2003). Neste estudo, a *V. polyanthes* demonstrou possuir atividade vasodilatadora com aumento do fluxo sanguíneo. Esta característica, observada no extrato hidroalcoólico, é interessante sob o ponto de vista do estudo de plantas com atividade antiúlcera, uma vez que o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da

integridade da mucosa gástrica. Em outro estudo, desta vez fitoquímico (Bohlmann et al., 1981), foi detectada nas folhas da *V. polyanthes* a presença dos compostos estigmasterol (fitoesteróide); acetato de lupeol (triterpeno);  $\alpha$ -humuleno, hirsutinolida, germacreno, biciclogermacreno, vernopolyanthona e vernopolyanthofurano (sesquiterpenos).

Inicialmente, dois extratos de diferentes polaridades (metanólico e clorofórmico) foram preparados para cada uma das espécies. O objetivo de se trabalhar com extratos oriundos de maceração com solventes orgânicos (ex.: hexano, clorofórmio, metanol, butanol, etc.) é extrair um “pool” maior de substâncias. Por outro lado, quando o objetivo é validar o conhecimento tradicional, os extratos estudados são polares, geralmente extratos aquosos ou hidroalcoólicos, que mimetizam o uso popular das plantas em infusos, decocções ou garrafadas.

Após elaboração dos extratos metanólico e clorofórmico da *V. polyanthes* (EMVP e ECVP, respectivamente) e dos extratos metanólico e clorofórmico da *V. ferruginea* (EMVF e ECVF, respectivamente), uma triagem fitoquímica preliminar foi realizada (tabelas 05 e 06; figuras 06 e 14). Nesta triagem foi detectada a presença de flavonóides e terpenóides em todos os extratos. Entretanto, devido ao caráter polar da maioria dos flavonóides e apolar de diversos terpenóides, os extratos clorofórmicos mostraram a presença de terpenóides, enquanto que os extratos polares, como esperado, continham acentuada quantidade de flavonóides. Não foi detectada a presença de taninos, saponinas e alcalóides nos extratos estudados.

A integridade funcional da mucosa gástrica depende do equilíbrio entre fatores agressores e mecanismos protetores da mucosa gástrica; o sucesso da terapêutica em prevenir ou curar lesões gástricas ulcerativas não depende somente do bloqueio da secreção de ácido, mas também do aumento de fatores protetores na mucosa gástrica (Dajani e Klamut, 2000). Essa habilidade de certos fatores endógenos protegerem a mucosa gástrica contra danos através de mecanismos não relacionados à inibição da secreção ácida foi primeiramente designada como “citoproteção” também mencionado rotineiramente como “gastroproteção” ou defesa da mucosa (Szabo e Goldberg, 1990; Martin e Wallace, 2006).

A atividade protetora gástrica do ECVP e EMVF foi inicialmente caracterizada nos modelos de indução de lesões por agente necrosante (etanol) e por antiinflamatório não esteroideal (piroxicam). Estes modelos clássicos de lesão gástrica aguda que utilizam etanol

e piroxicam para a indução de úlceras não representam integralmente a patologia humana, uma vez que as lesões gástricas em roedores são superficiais, múltiplas e induzidas por diferentes mecanismos. No entanto, estes modelos experimentais fornecem importantes indicativos da ação de produtos sobre o trato gastrointestinal, já que o uso abusivo de álcool e o uso crônico de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs) são duas das causas mais freqüentemente envolvidas na etiologia das patologias gástricas no homem (Raiha et al., 1998; Schmassmann, 1998; Levenstein, 1998).

O dano causado na mucosa gástrica, pela ingestão crônica ou aguda do etanol, pode estar associado à geração de EROs, as quais produzem um desbalanço entre o processo oxidante e antioxidante celular (Repetto et al., 2002). A administração do etanol pode resultar em alterações na permeabilidade da membrana com uma redução na resistência e alteração na secreção de H<sup>+</sup> (Vazquez-Ramirez et al., 2006). As úlceras aparecem devido a ação necrotizante do etanol na mucosa gástrica, com menor participação na secreção ácida (Lewis et al., 1991). A úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, por ter uma etiologia bastante ampla e complexa, envolvendo depleção dos fatores protetores e aumento dos agressores, foi o modelo escolhido como padrão para eleição dos melhores extratos e suas respectivas melhores doses.

A atividade antiulcerogênica dos extratos brutos da *V. polyanthes* (EMVP e ECVP) e da *V. ferruginea* (EMVF e ECVF) foi comprovada através da significativa proteção da mucosa gástrica contra úlcera induzida por etanol em ratos. Os extratos, e suas respectivas doses, eleitos como mais efetivos foram o ECVP 50 mg.kg<sup>-1</sup> e o EMVF 100 mg.kg<sup>-1</sup> (figuras 07 e 15 ), com cerca de 89,7% e 91,2% de inibição das lesões ulcerativas, respectivamente.

A atividade antiulcerogênica dos extratos brutos foi também avaliada no modelo de úlcera induzida por DAINEs. As drogas antiinflamatórias não esteroidais, como a indometacina, aspirina, piroxicam dentre outras, induzem ulceração na mucosa gástrica principalmente pela redução da síntese de prostaglandinas. Tal diminuição traz como conseqüências uma diminuição da secreção de muco e bicarbonato e uma redução do fluxo sanguíneo local (Cryer, 2000). Além disso, o contato direto destas drogas com a mucosa gástrica ataca os fosfolipídios presentes tanto no muco quanto no epitélio gástrico, o que reduz severamente a hidrofobicidade da camada de muco, causando assim uma retrodifusão

de íons hidrogênio (Bjorkman, 1996; Berstad et al., 2002). A redução do nível de prostaglandina na mucosa gástrica, ao mesmo tempo em que diminui a inflamação, reduz as defesas do estômago. Neste modelo, todos os extratos avaliados, exceto o ECVF, passaram a proteger apenas em doses mais altas (figuras 08 e 16), demonstrando serem dependentes da presença de prostaglandinas. Ambos os extratos da *V. polyanthes* reduziram significativamente as lesões na dose de 500 mg.kg<sup>-1</sup>, enquanto que na espécie *V. ferruginea* a proteção obtida com os extratos foi dose dependente; o EMVF na dose de 1000 mg.kg<sup>-1</sup> e o ECVF na dose de 250 mg.kg<sup>-1</sup>. Conforme observado, os extratos da *V. polyanthes*, diferentemente dos da *V. ferruginea*, não protegeram a mucosa gástrica de forma dose dependente. Isso é uma característica frequentemente observada no estudo de extratos brutos de origem natural. Quando estudamos um “pool” de substâncias, ao invés de uma única substância isolada, muitas vezes o efeito protetor sobre a mucosa de uma dada substância pode ser mascarado pelo efeito deletério de outra e vice-versa.

Realizados os estudos de atividade antiulcerogênica, os extratos mais efetivos tiveram então alguns dos seus principais mecanismos de ação antiulcerogênica elucidados. A atividade anti-secretora, bem como a produção de muco aderido, e a participação do NO e do grupamento sulfidrila (SHs) na gastroproteção dos dois extratos mais efetivos, ECVP e EMVF, foram a seguir avaliadas.

A atividade anti-secretora dos extratos foi estudada no modelo de ligadura do piloro com administração via intraduodenal. A utilização desta via é importante para investigar a atividade sistêmica do composto, evitando o contato direto das substâncias testes com a mucosa gástrica dos animais. Os parâmetros avaliados foram pH e conteúdo gástrico. Nenhum dos extratos produziu alteração no pH (figuras 13b e 22b) e nem no conteúdo gástrico (dado não apresentado); portanto, o mecanismo pelo qual os extratos protegem a mucosa gástrica não envolve inibição da secreção ácida gástrica.

A atual terapêutica para o tratamento de úlceras pépticas consiste no emprego de fármacos com atividade anti-secretora. Esta estratégia, embora muito eficaz, pode causar quadros de hipergastrinemia em usuários crônicos. Uma vez interrompido o tratamento, a hipergastrinemia é responsável por um efeito rebote na secreção de ácido gástrico (Kuipers e Meuwissen, 2000). A atividade antiulcerogênica de certas plantas medicinais, independente de mecanismos antsecretórios, é desejável por prevenir o crescimento

microbiano e a hipergastrinemia (Lamberts et al., 1993). A ausência de atividade anti-secretora nos extratos conduziu à investigação de possíveis mecanismos protetores da mucosa gástrica.

O primeiro mecanismo protetor a ser investigado foi a produção de muco gástrico no modelo de muco gástrico aderido. O muco contribui para a defesa da mucosa por promover uma barreira física contra bactérias; age como lubrificante reduzindo os efeitos abrasivos na mucosa, além de participar na proteção da mucosa contra danos causados por ácidos e toxinas no lúmen (Wallace et al., 2000). Muitos açúcares (manitol, glicose) são potentes sequestradores de radicais livres de oxigênio; com base nisso, o muco gástrico, rico em glicoproteínas, também é um importante sequestrador de radicais livre de oxigênio (Mojzis et al., 2000).

De acordo com os resultados obtidos, um aumento significativo na produção de muco gástrico aderido foi observado (22,3% em ratos tratados com ECVP e 14,3% em ratos tratados com EMVF), o que possibilitou esclarecer um dos mecanismos envolvidos na gastroproteção promovida por ambas as espécies (figuras 13a e 22a).

O próximo passo foi investigar a participação do óxido nítrico (NO) e dos grupamentos sulfidrila (SHs) da gastroproteção dos extratos. Conforme revisado na introdução, estes dois compostos são importantes mecanismos de defesa da mucosa gástrica.

Para avaliar o envolvimento do NO na gastroproteção de ambos os extratos foi utilizado um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), o N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um análogo da L-arginina. O mesmo é hidrolisado em L-nitroarginina produzindo inibição da atividade da NOS (Pfeiffer et al., 1996); isto faz com que as úlceras induzidas pelo etanol sejam agravadas (Kawano et al., 2000). Foi observada uma redução significativa no efeito protetor da mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol em animais tratados com ambos os extratos (figuras 13d e 22d), indicando que o NO está envolvido na proteção da mucosa gástrica, ou seja, o efeito gastroprotetor dos extratos é dependente da liberação/produção de NO. Entretanto, enquanto a atividade gastroprotetora do ECVP caiu de 91,2% para 71,7%, a do EMVF caiu de 65,7% para 50,9%, indicando uma maior participação do NO na proteção do extrato ECVP.

Em relação ao envolvimento dos SHs na gastroproteção de ambos os extratos, o estudo envolveu a utilização de um agente bloqueador de compostos sulfidríla, o composto N-etilmaleimida (NEM). Foi observada uma redução significativa no efeito protetor da mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol em animais tratados com ambos os extratos (figuras 13c e 22c). Isso mostra que os grupamentos SHs estão envolvidos na proteção da mucosa gástrica, ou seja, o efeito gastroprotetor dos extratos é dependente da presença/produção de SHs. Entretanto, enquanto a atividade gastroprotetora do ECVP caiu de 85,5% para 65,0%, a do EMVF caiu de 62,9% para 27,6%, indicando uma maior participação dos SHs na proteção do extrato EMVF.

Depois de estabelecido quais extratos exibiam maior atividade, a próxima etapa de fracionamento biomonitorado, objetivando identificar os princípios ativos responsáveis por estas ações, através do modelo de indução de úlcera por etanol. O extrato apolar ECVP foi fracionado por cromatografia em coluna, dando origem às frações FCVP (clorofórmica) e FMVP (metanólica), enquanto que o extrato polar EMVF foi particionado, originando a fração FAVF (acetato).

As frações foram testadas primeiramente no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto (figuras 09 e 18), e, uma vez identificada a fração mais ativa de cada espécie, as mesmas foram testadas no modelo subcrônico de indução de úlcera por ácido acético. Neste modelo, além de avaliar o efeito cicatrizante de cada fração (figuras 10 e 19), a toxicidade subcrônica de cada fração é determinada indiretamente (figuras 11, 12, 20 e 21).

A fração do extrato ECVP, com melhor atividade no modelo de etanol, foi a FMVP na dose de 3 mg.kg<sup>-1</sup> (77,6% de proteção), enquanto que a FAVF do extrato EMVF só conseguiu proteger na dose de 50 mg.kg<sup>-1</sup> (68,8% de proteção). Nenhuma das frações promoveu alterações significativas no peso dos animais e no peso dos órgãos após tratamento por 14 dias consecutivos, demonstrando assim uma baixa toxicidade *in vivo* das frações nas suas doses efetivas. Já com relação à atividade cicatrizante, enquanto a FMVP na dose de 3 mg.kg<sup>-1</sup> reduziu em 75,2% a área da lesão gástrica, a FAVF na dose de 50 mg.kg<sup>-1</sup> não demonstrou efeitos cicatrizantes em relação ao grupo controle.

A úlcera induzida por ácido acético em ratos é um dos modelos que mais se assemelha à úlcera gástrica em humanos (Takagi et al., 1969). As fases de cicatrização da úlcera obedecem a seguinte ordem: 1) de 0 a 3 dias, fase do desenvolvimento da úlcera com

necrose do tecido, implantação da úlcera, infiltração inflamatória e formação da margem da úlcera; 2) de 3 a 10 dias, fase rápida de cicatrização envolvendo migração rápida de células epiteliais e contração da base da úlcera; 3) de 10 a 20 dias, fase lenta da cicatrização que compreende angiogênese, remodelação dos tecidos de granulação e completa re-epitelização da cratera da úlcera (Schmassmann, 1998).

A úlcera gástrica é resultado de um processo de necrose e isquemia da mucosa. A área do tecido necrosado passa a não receber mais nutriente porque ocorre dano microvascular, com constrição e consequente oclusão dos vasos. O tecido necrosado libera leucotrieno que atrai leucócitos e macrófagos. Estes últimos fagocitam o tecido necrosado liberando citocinas próinflamatórias como  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$  entre outras (Tarnawski, 2005). Histologicamente, a úlcera gástrica consiste em duas estruturas: a margem da úlcera formada pela borda adjacente não necrosada e que delimita a área da lesão, e a base ou cratera da úlcera apresentando o tecido necrosado. A cicatrização da úlcera é um processo complicado o qual envolve migração e proliferação celular, re-epitelização, angiogênese e formação de escara. Todos esses processos são controlados pelos fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas (Tarnawski, 2000). O tecido de granulação é desenvolvido na base da úlcera entre 48 e 72 h após a implantação da lesão. Ele é formado a partir da proliferação de células do tecido conjuntivo, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, formando microvasos através do processo de angiogênese (Tarnawski et al., 1991). A migração dos fibroblastos e a proliferação celular na lesão são mediadas pelos fatores de crescimento  $TGF\beta$ , PDGF, EGF e FGF e por citocinas principalmente  $TNF\alpha$  e IL-1 (Cotran et al., 1999). Além disso, o crescimento de um tecido de granulação e a formação de uma nova rede microvascular, através da angiogênese, é estimulada por FGF, VEGF, PDGF, angioproteínas e citocinas (Tarnawski et al., 2001).

Das duas frações testadas, FAVF e FMVP, a que melhor protegeu a mucosa gástrica nos dois modelos testados, agudo e subcrônico, de indução de úlcera foi a FMVP. A identificação de seus compostos majoritários, através de cromatografia em coluna e camada delgada foi o passo seguinte (figura 23), e, num segundo momento, foi feita uma análise estrutural por RMN (figura 24 e 25) para comprovação da substância identificada. Os ensaios químicos realizados foram essencialmente qualitativos.

O lupeol foi identificado na FMVP como sendo uma das substâncias majoritárias. Nesta fração foram também identificados outros compostos, tais como  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e diversos flavonóides metoxilados (CCD, comparando com padrões). Entretanto, apenas o lupeol foi escolhido para dar prosseguimento aos ensaios de atividade antiulcerogênica. Isso ocorreu basicamente devido: a) à sua aparente predominância na fração de origem; b) à inexistência de estudos anteriores de atividade antiúlcera relacionados ao lupeol e c) à existência de diversos indicativos na literatura para uma possível atividade antiulcerogênica do lupeol, dentre eles a atividade antioxidante e o efeito gastroprotetor, já descritos para outros compostos desta mesma classe química (triterpenos pentacíclicos).

O lupeol foi inicialmente estudado no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto. A melhor atividade encontrada foi com a dose de  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ , reduzindo em 81% a área da lesão gástrica (figura 26). A seguir, o efeito cicatrizante do lupeol foi analisado no modelo de úlcera induzida por ácido acético (figura 27); neste experimento, a toxicidade subcrônica da substância teste pode ser também analisada, já que o tratamento é de 14 dias (figura 28 e 29). O lupeol promoveu uma cicatrização de 46,5% da lesão, sem alterar significativamente o peso dos animais e dos órgãos, após tratamento por 14 dias consecutivos. Estes dados demonstram boa eficácia aliada a uma baixa toxicidade *in vivo*.

Uma vez realizados os estudos de atividade antiulcerogênica e cicatrizante, alguns dos principais mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica do lupeol foram elucidados. A atividade anti-secretora, a produção de muco aderido, a participação do NO na gastroproteção, a atividade da mieloperoxidase (MPO) como indicativo de infiltração de neutrófilos (figura 30a, b, c e d), a produção de  $\text{PGE}_2$  na mucosa gástrica (figura 31), e a participação de HSP70 e PCNA (figuras 34 e 35) na atividade cicatrizante do lupeol foram avaliadas. Uma análise morfológica qualitativa da lesão induzida por ácido acético, através dos métodos de coloração por hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), foi também realizada (figuras 32 e 33).

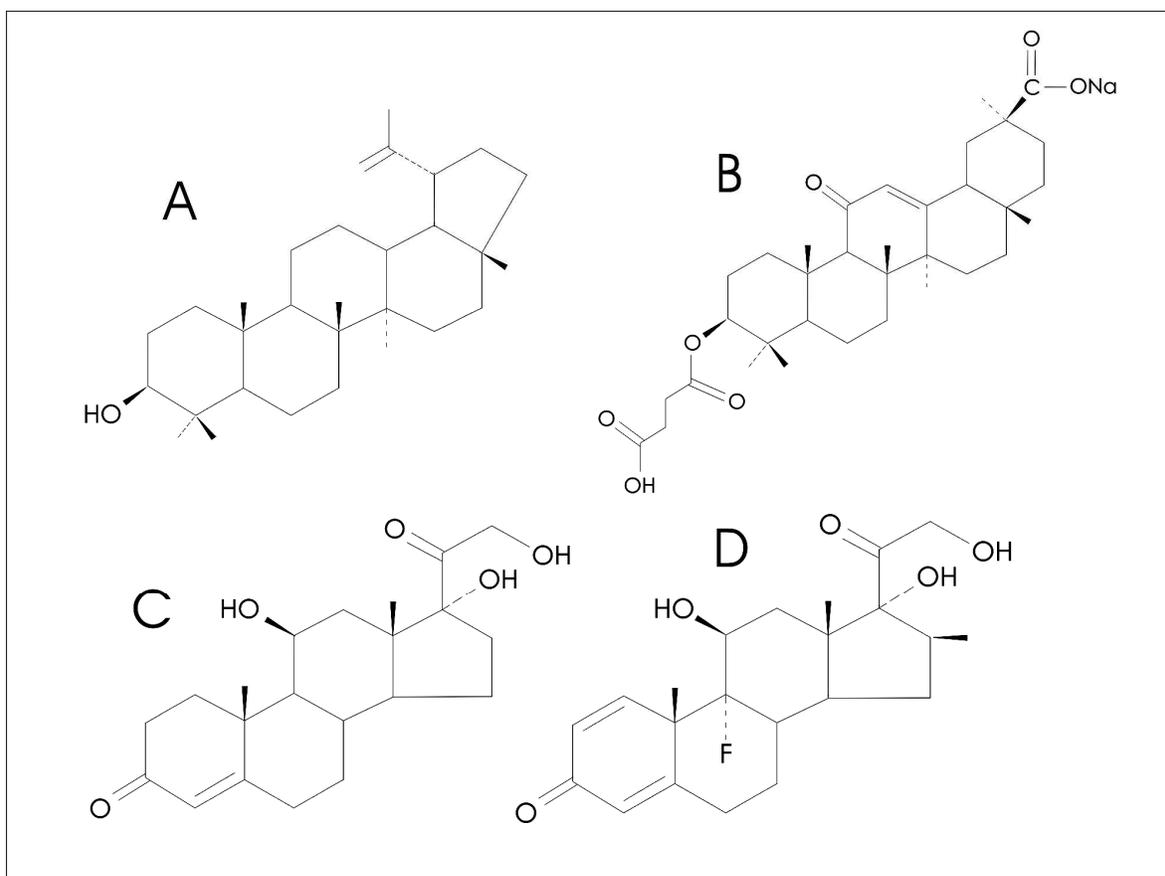
O tratamento com o lupeol, diferentemente da atual terapêutica inibidora de secreção ácida, não altera o pH gástrico. Por outro lado, o lupeol foi capaz de aumentar a produção de muco gástrico aderido em 24,7% (figura 30a e 33), indicando uma atividade predominantemente gastroprotetora.

A seguir, a atividade imunossupressora do lupeol na mucosa gástrica, através da avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase, foi investigada. A enzima mieloperoxidase está presente dentro dos lisossomos dos neutrófilos. Uma vez nos tecidos, após estímulos pró-inflamatórios, os neutrófilos sofrem um processo de degranulação com a liberação para o citoplasma da enzima mieloperoxidase (armazenada nos grânulos azurófilos). A enzima mieloperoxidase atua na presença do ânion superóxido e do ânion cloreto (Cl<sup>-</sup>) para formar o ácido hipoclorídrico. O ácido hipoclorídrico apresenta intensa ação tóxica sobre as bactérias, sendo também lesivo para as células do tecido (Halliwell e Gutteridge, 2006). A mieloperoxidase pode ser usada como um índice de infiltração de neutrófilos nos tecidos (Krawisz et al., 1984). O lupeol foi capaz de reduzir significativamente a atividade da MPO, demonstrando assim atividade antiinflamatória gástrica importante. A atividade antiinflamatória observada, além de ser corroborada, valida os estudos já relatados na literatura sobre a atividade antiinflamatória do lupeol (ver item 1.5.1).

Na seqüência, com o objetivo de justificar a alta produção de muco e inibição da MPO, a produção de PGE<sub>2</sub> na mucosa gástrica, após tratamento com o lupeol, foi quantificada. Uma importante inibição da produção de prostaglandinas foi observada, o que corrobora com a inibição da infiltração de neutrófilos nos tecidos da mucosa gástrica e com a ausência de atividade anti-secretora (ver item 1.4.1). Entretanto, o resultado obtido não justifica um aumento tão pronunciado na produção de muco aderido.

A produção de muco na mucosa gástrica é influenciada por diversos fatores, dentre eles o óxido nítrico (ver item 1.4.2.). Quando a participação do NO na gastroproteção mediada pelo lupeol foi investigada, observou-se que ela é totalmente dependente da presença de NO. Sabe-se que o NO e as prostaglandinas (PGs) estão ambas envolvidas na homeostase vascular. Num estudo recente foi demonstrado que a redução dos níveis de PGs é compensada por um aumento da atividade da enzima NO sintase (NOS); entretanto, a redução dos níveis de NO não é compensada por um aumento dos níveis de PGs (Vassalle et al., 2003). No momento em que o inibidor da NOS (L-NAME) foi administrado juntamente com um inibidor da síntese de PGE<sub>2</sub> (lupeol), toda a homeostase vascular gástrica foi interrompida, bloqueando assim qualquer possível forma de proteção envolvida com o lupeol.

Na tentativa de extrapolar os dados obtidos experimentalmente, e justificar a produção aumentada de muco, uma análise estrutural comparativa entre a molécula do lupeol e diversos outros compostos de estrutura semelhante foi realizada (figura 36).



**Figura 36.** Moléculas com estrutura química semelhante à do Lupeol (A). Carbenoxolona (B); Cortisol (C); e Dexametasona (D).

Primeiro, o lupeol (figura 36a) foi comparado à carbenoxolona (figura 36b), substância comercial já utilizada no tratamento de úlceras gástricas. Seu uso terapêutico foi interrompido devido aos inúmeros efeitos colaterais, associados principalmente a uma elevação das taxa de corticosteróides plasmáticos (ver item 1.5.). Tanto o lupeol quanto a carbenoxolona possuem atividade antiinflamatória e secretora de muco. Entretanto, no tratamento com a carbenoxolona, estas atividades são devidas à inibição do metabolismo das prostaglandinas e do cortisol; isso provocaria uma maior meia-vida destes hormônios que seriam responsáveis pelo aumento do muco gástrico (via PGs) e diminuição da

inflamação (via cortisol). Diferentemente da carbenoxolona, o lupeol inibe a produção de PGs, o que descartaria a hipótese de que ambos teriam mecanismo de ação similar.

O lupeol guarda semelhança estrutural com o hormônio cortisol; assim, foram investigadas as propriedades dos corticosteróides e de fármacos análogos (ex.: dexametasona) na mucosa gástrica (figuras 36c e 36d). Conforme descrito no item 1.4.6., tradicionalmente considerava-se que os glicocorticóides secretados em resposta ao estresse aumentariam a vulnerabilidade gástrica. Esse ponto de vista está hoje sendo revisto, e já se sabe que um dos efeitos gastroprotetores do cortisol ocorre devido ao aumento do muco gástrico. Por isso, é possível que o lupeol apresente atividade corticóide-like, o que seria responsável por suas atividades antiinflamatória e gastroprotetora em uma dose baixa.

Por fim, o lupeol apresentou uma significativa atividade cicatrizante no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético. Através da análise histológica da área da lesão, foi observada uma importante melhora na qualidade da cicatrização no grupo tratado com o lupeol, representada por um epitélio melhor organizado (figura 32) e uma secreção de muco mais homogênea (figura 33). Não foi observada a presença de células HSP70 e PCNA positivas (figuras 34 e 35) na borda da lesão de animais tratados com lupeol.

Este resultado sugere uma possível inibição da proliferação celular, uma vez que este fator é normalmente expresso no epitélio de ratos saudáveis; estes dados corroboram outros estudos de atividade anticarcinogênica do lupeol (Gauthier et al., 2006). Já a expressão de HSP70 no epitélio de ratos normais é mínima, e a expressão de HSP70 no estômago de ratos em fase final de cicatrização é igualmente pouco pronunciada (Tsukimi et al., 2001). Isso sugere que o processo de cicatrização da mucosa em ratos tratados com lupeol é antecipado, o que diminuiria assim o tempo necessário para total cicatrização.

De acordo com os resultados obtidos com os extratos brutos, frações semi-purificadas e com o lupeol, princípio ativo da fração FMVP da *V. polyanthes* foi possível concluir que:

### **ECVP obtido da *V. polyanthes***

- O ECVP comprovou sua atividade antiulcerogênica ao proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por etanol e piroxicam, modelos agudos;
- O mecanismo de ação pelo qual o ECVP protege a mucosa gástrica é atribuído a mecanismos citoprotetores, uma vez que o pH gástrico não foi alterado após a sua administração. Dentre os fatores responsáveis por esta proteção, podemos citar o aumento de muco e interação parcial com compostos sulfidrila e NO.

### **FMVP obtida da *V. polyanthes***

- A FMVP comprovou sua atividade antiulcerogênica ao proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por etanol e ácido acético, modelo agudo e crônico respectivamente;
- Não foram observadas alterações no peso nos órgãos e nem dos animais após tratamento consecutivo por 14 dias com a FMVP na sua dose eficaz.
- O lupeol, um triterpeno pentacíclico da família dos lupanos, foi identificado como composto ativo majoritário da FMVP.

### **Lupeol, composto ativo presente na *V. polyanthes***

- O lupeol comprovou sua atividade antiulcerogênica ao proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por etanol e ácido acético, modelo agudo e crônico respectivamente;
- Não foram observadas alterações no peso nos órgãos e nem dos animais após tratamento consecutivo por 14 dias com o lupeol na sua dose eficaz.
- O mecanismo de ação pelo qual o lupeol protege a mucosa gástrica é atribuído a mecanismos citoprotetores e imunossuppressores, uma vez que o pH gástrico

não foi alterado após a sua administração. Dentre os fatores responsáveis por esta proteção, podemos citar o aumento de muco gástrico, provavelmente relacionado a um aumento dos níveis de NO, diminuição na produção de PGE<sub>2</sub> com consequente diminuição da infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica.

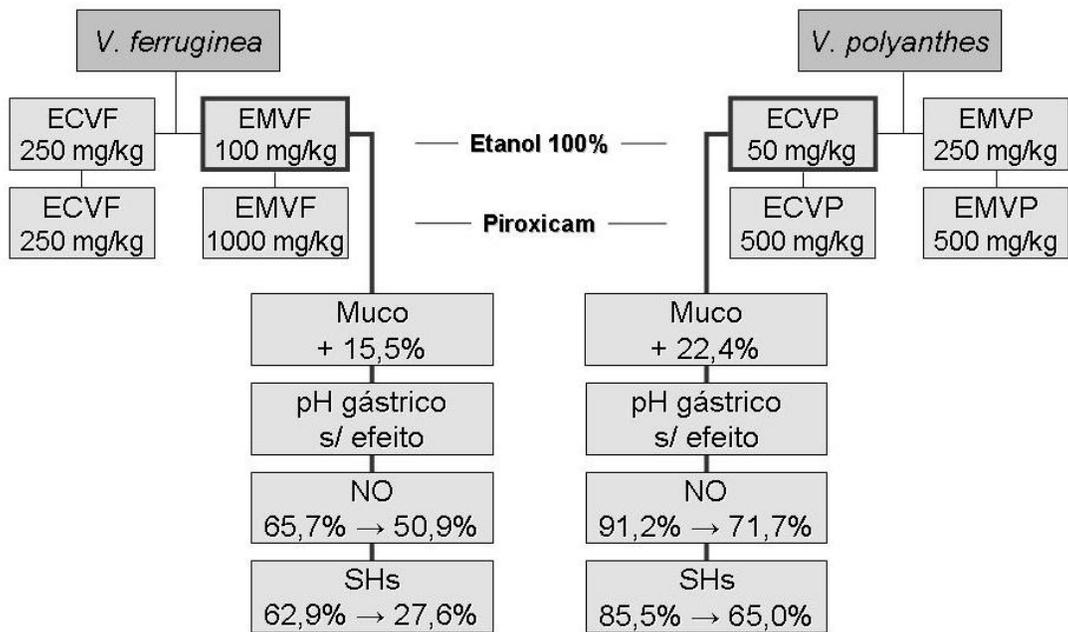
#### **EMVF obtido da *V. ferruginea***

- O EMVF comprovou sua atividade antiulcerogênica ao proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por etanol e piroxicam, modelos agudos;
- O mecanismo de ação pelo qual o EMVF protege a mucosa gástrica é atribuído a mecanismos citoprotetores, uma vez que o pH gástrico não foi alterado após a sua administração. Dentre os fatores responsáveis por esta proteção, podemos citar o aumento de muco e interação parcial com compostos sulfidríla e NO.

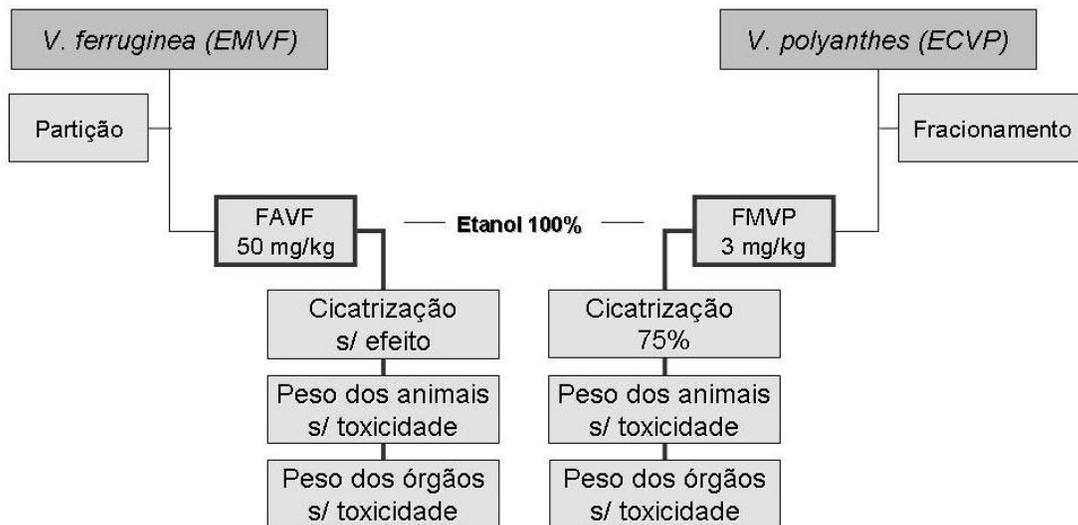
#### **FAVF obtida da *V. ferruginea***

- A FAVF comprovou sua atividade antiulcerogênica ao proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por etanol, modelo agudo;
- A FAVF não demonstrou atividade cicatrizante de lesões gástricas induzidas por ácido acético, modelo crônico.
- Não foi observada toxicidade *in vivo* após tratamento consecutivo por 14 dias com a FAVF na sua dose eficaz.
- Por ter apresentado uma menor atividade gastroprotetora, quando comparado à FAVF, os estudos com esta espécie foram interrompidos nesta etapa.

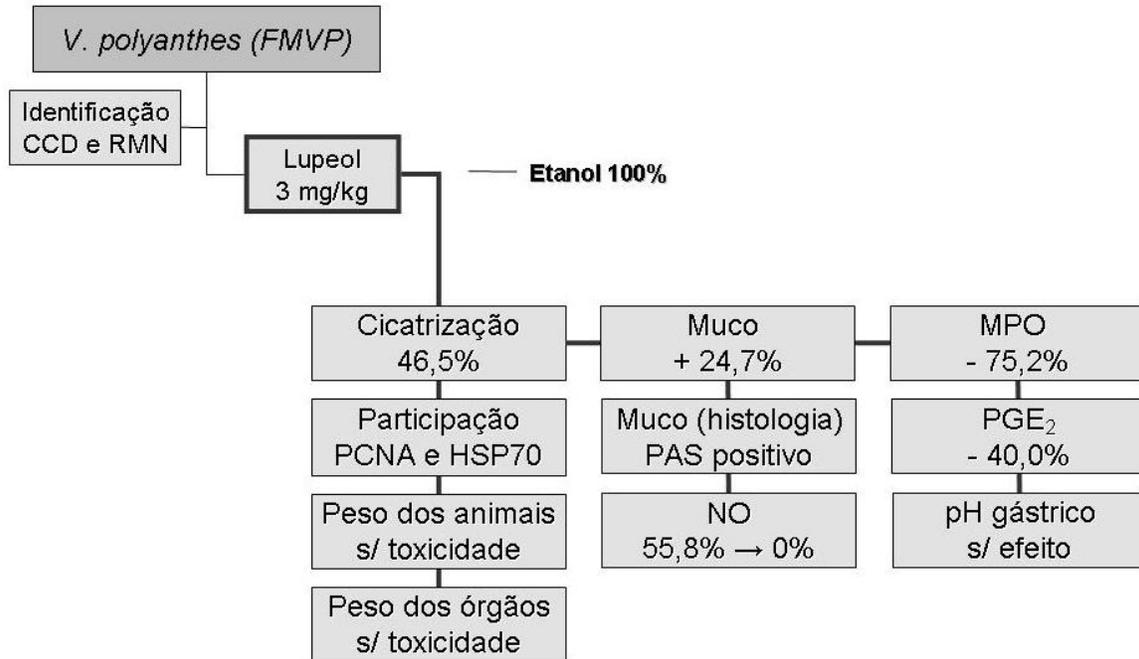
Para uma melhor visualização de todo o desenho experimental elaborado neste trabalho, nas próximas páginas são apresentadas todas as etapas resumidamente (fluxograma 5, 6 e 7).



**Fluxograma 05.** Resumo dos experimentos realizados com extratos brutos. Na primeira etapa avaliou-se a atividade antiulcerogênica em dois modelos. O extrato com melhor atividade no modelo de úlcera induzida por etanol foi selecionado para os ensaios posteriores de mecanismo de ação.



**Fluxograma 06.** Resumo dos experimentos realizados com frações. Na primeira etapa avaliou-se a atividade antiulcerogênica aguda no modelo de úlcera induzida por etanol. A fração com melhor atividade no modelo anterior foi selecionada para os ensaios posteriores de úlcera crônica e toxicidade *in vivo*.



**Fluxograma 07.** Resumo dos experimentos realizados com o lupeol. Na primeira etapa avaliou-se a atividade antiulcerogênica aguda no modelo de úlcera induzida por etanol. A dose com melhor atividade no modelo anterior foi selecionada para os ensaios posteriores de úlcera crônica, toxicidade *in vivo*, histologia, e mecanismos de ação.

A descoberta de atividade antiulcerogênica e cicatrizante no composto lupeol é inédita. Enquanto a ciência tinha seus olhos voltados para o estudo de atividade gastroprotetora de outros triterpenos pentacíclicos, com estruturas moleculares mais semelhantes à da carbenoxolona, a família dos lupanos permaneceu esquecida. O presente trabalho abre as portas para futuros estudos mais aprofundados da atividade gastroprotetora do lupeol, envolvendo mecanismos estimulatórios da produção de muco, antioxidantes, antiinflamatórios e cicatrizantes.

*A priori*, a próxima etapa deste estudo seria verificar a influência do lupeol sobre o metabolismo do cortisol e da aldosterona ou mesmo um possível efeito corticóide do próprio lupeol contra receptores específicos de corticosteróides. Um aumento dos níveis plasmáticos destes hormônios pode ser observado em pacientes usuários da carbenoxolona, uma dos primeiros fármacos antiulcerogênicos vendidos comercialmente. Este poderia ser um possível efeito colateral do uso prolongado do lupeol, uma vez que tanto ele quanto a carbenoxolona são triterpenos pentacíclicos com estrutura semelhante.

“Qualidade x Eficácia x Segurança” são os três pré-requisitos para se lançar um novo medicamento no mercado. O lupeol foi eficaz ao proteger a mucosa gástrica em doses baixas. Uma vez verificada a inocuidade do lupeol e aprofundado o estudo de seus mecanismos de ação, testes clínicos já poderiam ser realizados.

Muitos anos são necessários para o cumprimento de todas as etapas necessárias para o lançamento de um novo medicamento. O presente trabalho é o início deste caminho.

---

## VIII. Referências bibliográficas

- ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am.J.Physiol Cell Physiol**, v. 288, n. 1, p. C1-19, 2005.
- ALMEIDA, A. B. A. **Atividade antiulcerogênica e antiinflamatória instestinal da *Arctium lappa***. 2005. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas/SP, 2005.
- ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J. A.;SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice. **J.Pharm.Pharmacol.**, v. 54, n. 4, p. 583-588, 2002.
- AVILA, J. R.; DE LA LASTRA, C. A.; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D. et al. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflamm.Res.**, v. 45, n. 2, p. 83-88, 1996.
- BAKER, M. E. Licorice and enzymes other than 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: an evolutionary perspective. **Steroids**, v. 59, n. 2, p. 136-141, 1994.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- BANICK, P. D.; CHEN, Q.; XU, Y. A.;THOM, S. R. Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. **J.Cell Physiol**, v. 172, n. 1, p. 12-24, 1997.
- BARON, J. H.; BARR, J.; BATTEN, J.; SIDEBOTHAM, R.;SPENCER, J. Acid, Pepsin, and Mucus Secretion in Patients with Gastric and Duodenal-Ulcer Before and After Colloidal Bismuth Subcitrate (De-Nol). **Gut**, v. 27, n. 5, p. 486-490, 1986.
- BARROWMAN, J. A.; PFEIFFER, C. J. Carbenoxolone: a critical analysis of its clinical value in peptic ulcer. In: C. J. Pfeiffer. **Drugs and peptic ulcer**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1982. p. 123-132 ISBN 0849362105 (set).
- BATISTA, L. M.; DE ALMEIDA, A. B.; DE PIETRO, M. L.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W. et al. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biol.Pharm.Bull.**, v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.
- BAUER, H.; MARKER-HERMANN, E. [Therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs]. **Orthopade**, v. 32, n. 12, p. 1088-1094, 2003.

- BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M. et al. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine.**, v. 13, n. 8, p. 584-590, 2006.
- BECKERT, S.; CLASS, N.; FARRAHI, F.; COERPER, S. Growth hormone enhances gastric ulcer healing in rats. **Med.Sci.Monit.**, v. 10, n. 8, p. BR255-BR258, 2004.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** São Paulo/SP: EDART, Editora da Universidade de São Paulo, 1976.
- BELAICHE, J.; BURETTE, A.; DE, V. M.; LOUIS, E.; HUYBRECHTS, M.; DELTENRE, M. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. **Acta Gastroenterol.Belg.**, v. 65, n. 2, p. 65-73, 2002.
- BERBERIAN, P. A.; MYERS, W.; TYTELL, M.; CHALLA, V.; BOND, M. G. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. **Am.J.Pathol.**, v. 136, n. 1, p. 71-80, 1990.
- BERSTAD, A. E.; BERSTAD, K.; BERSTAD, A. PH-activated phospholipase A2: an important mucosal barrier breaker in peptic ulcer disease. **Scand.J.Gastroenterol.**, v. 37, n. 6, p. 738-742, 2002.
- BERSTAD, K.; BERSTAD, A. Helicobacter pylori infection in peptic ulcer disease. **Scand.J.Gastroenterol.**, v. 28, n. 7, p. 561-567, 1993.
- BJORKMAN, D. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. **Am.J.Med.**, v. 101, n. 1A, p. 25S-32S, 1996.
- BLACK, H. E. The effects of steroids upon the gastrointestinal tract. **Toxicol.Pathol.**, v. 16, n. 2, p. 213-222, 1988.
- BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A.; DURANT, C. J.; GANELLIN, C. R.; PARSONS, E. M. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub> -receptors. **Nature**, v. 236, n. 5347, p. 385-390, 1972.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; GUPTA, R. K.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Naturally-Occurring Terpene Derivatives .296. Allenic Germacranolides, Bourbonene Derived Lactones and Other Constituents from Vernonia Species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 3, p. 473-480, 1981.

- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.
- BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P. A.; DONALD-BRAVO, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. **Nature**, v. 326, n. 6112, p. 515-517, 1987.
- BRITO, A. R. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **J.Ethnopharmacol.**, v. 54, n. 2-3, p. 131-138, 1996.
- BROWN, J. F.; KEATES, A. C.; HANSON, P. J.; WHITTLE, B. J. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **Am.J.Physiol**, v. 265, n. 3 Pt 1, p. G418-G422, 1993.
- BRUTON, L. L. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers. In: J. G Hardman, L. E. Limbird. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1996. p. 663-691 ISBN 0070262667 (hardcover).
- BRZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment - Polish achievements. **J.Physiol Pharmacol.**, v. 54 Suppl 3, p. 99-126, 2003.
- BRZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; DROZDOWICZ, D. et al. Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. **Microsc.Res.Tech.**, v. 53, n. 5, p. 343-353, 2001.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 37-38, 2003.
- CHAN, F. K.; SUNG, J. J. Role of acid suppressants in prophylaxis of NSAID damage. **Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.**, v. 15, n. 3, p. 433-445, 2001.
- CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.
- CHEA, A.; HOUT, S.; LONG, C.; MARCOURT, L.; FAURE, R.; AZAS, N. et al. Antimalarial activity of sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerea*. **Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)**, v. 54, n. 10, p. 1437-1439, 2006.

- CHEN, X.; ZHAN, Z. J.; ZHANG, X. W.; DING, J.; YUE, J. M. Sesquiterpene lactones with potent cytotoxic activities from *Vernonia chinensis*. **Planta Med.**, v. 71, n. 10, p. 949-954, 2005.
- CIOFFI, G.; SANOGO, R.; DIALLO, D.; ROMUSSI, G.; DE, T. N. New compounds from an extract of *Vernonia colorata* leaves with anti-inflammatory activity. **J.Nat.Prod.**, v. 67, n. 3, p. 389-394, 2004.
- CORNE, S. J.; MORRISSEY, S. M.; WOODS, R. J. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J.Physiol**, v. 242, n. 2, p. 116P-117P, 1974.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Gastric ulceration. In: R. S. Cotran, V. Kumar, S. L. Robbins. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 773-777
- CRAIG, W. J. Health-promoting properties of common herbs. **Am.J.Clin.Nutr.**, v. 70, n. 3 Suppl, p. 491S-499S, 1999.
- CRYER, B. NSAID gastrointestinal toxicity. **Curr.Opin.Gastroenterol.**, v. 16, n. 6, p. 495-502, 2000.
- CURTIS, G. H.; MACNAUGHTON, W. K.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Can.J.Physiol Pharmacol.**, v. 73, n. 1, p. 130-134, 1995.
- D'SOUZA, R. S.; DHUME, V. G. Gastric cytoprotection. **Indian J.Physiol Pharmacol.**, v. 35, n. 2, p. 88-98, 1991.
- DA SILVEIRA, R. R.; FOGLIO, M. A.; GONTIJO, J. A. R. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 127-131, 2003.
- DAJANI, E. Z.; KLAMUT, M. J. Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update. **Expert.Opin.Investig.Drugs**, v. 9, n. 7, p. 1537-1544, 2000.
- DEMATTEIS, M.; FERNANDEZ, A. Karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae). **Cytologia**, v. 63, p. 323-328, 1998.
- DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E. B.; ROBERFROID, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 4, p. S1-S27, 1999.

- DOLL, R.; HILL, I. D. Triterpenoid liquorice compound in gastric and duodenal ulcer. **Lancet**, v. 2, p. 1166-1167, 1962.
- DOWNTON, C.; CLARK, I. Statins--the heart of the matter. **Nat.Rev.Drug Discov.**, v. 2, n. 5, p. 343-344, 2003.
- DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat.Prod.Rep.**, v. 23, n. 3, p. 394-411, 2006.
- ERASTO, P.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **J.Ethnopharmacol.**, v. 106, n. 1, p. 117-120, 2006.
- FARINA, C.; PINZA, M.; PIFFERI, G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. **Farmaco**, v. 53, n. 1, p. 22-32, 1998.
- FERNANDEZ, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 11, p. 1533-1539, 2001.
- FILARETOVA, L. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Hormonal brain-gut interaction and gastroprotection. **Auton.Neurosci.**, v. 125, n. 1-2, p. 86-93, 2006.
- FRUTUOSO, V. S.; GURJAO, M. R.; CORDEIRO, R. S.; MARTINS, M. A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Med.**, v. 60, n. 1, p. 21-25, 1994.
- GARNER, A.; FLEMSTROM, G.; HEYLINGS, J. R. Effects of antiinflammatory agents and prostaglandins on acid and bicarbonate secretions in the amphibian-isolated gastric mucosa. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 451-457, 1979.
- GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; LEBRUN, M.; DUFOUR, P.; PICHETTE, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. **Bioorg.Med.Chem.**, v. 14, n. 19, p. 6713-6725, 2006.
- GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. **Fitoterapia**, v. 69, n. 1, p. 13-19, 1998.
- \_\_\_\_\_. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **J.Ethnopharmacol.**, v. 76, n. 1, p. 77-80, 2001.

- GO, M. F. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? **Gastroenterology**, v. 113, n. 6 Suppl, p. S15-S20, 1997.
- GRAY, S. J.; RAMSEY, C.; REIFENSTEIN, R. W.; BENSON, J. A., Jr. The significance of hormonal factors in the pathogenesis of peptic ulcer. **Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 156-172, 1953.
- GUO, J. S.; CHO, C. H.; WANG, J. Y.; KOO, M. W. Expression and immunolocalization of heat shock proteins in the healing of gastric ulcers in rats. **Scand.J.Gastroenterol.**, v. 37, n. 1, p. 17-22, 2002.
- GUPTA, M. B.; NATH, R.; GUPTA, G. P.; BHARGAVA, K. P. Antiulcer activity of some plant triterpenoids. **Indian J.Med Res.**, v. 73, p. 649-652, 1981.
- GUPTA, R. S.; BHATNAGER, A. K.; JOSHI, Y. C.; SHARMA, M. C.; KHUSHALANI, V.; KACHHAWA, J. B. Induction of antifertility with lupeol acetate in male albino rats. **Pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 57-62, 2005.
- GURBUZ, I.; USTUN, O.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; AKYUREK, N. In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 241-244, 2002.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol.Aspects Med.**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.
- GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radic.Res.Comm.**, v. 19, n. 3, p. 141-158, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006. ISBN 019856869X.
- HAM, E. A.; SODERMAN, D. D.; ZANETTI, M. E.; DOUGHERTY, H. W.; MCCAULEY, E.; KUEHL, F. A., Jr. Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4 release from activated neutrophils. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A**, v. 80, n. 14, p. 4349-4353, 1983.
- HAMOS, J. E.; OBLAS, B.; PULASKI-SALO, D.; WELCH, W. J.; BOLE, D. G.; DRACHMAN, D. A. Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 41, n. 3, p. 345-350, 1991.
- HARBORNE, J. B. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In: J. B. Harborne, F. A. Tomas-Barberan. **Ecological chemistry and biochemistry of plant**

- terpenoids** Oxford [England] ; New York : Clarendon Press : Oxford University Press, 1991. p. 399-426 ISBN 0198577397 (hardback).
- HAWKEY, C. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 521-535, 2000.
- HAWKEY, C. J.; RAMPTON, D. S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? **Gastroenterology**, v. 89, n. 5, p. 1162-1188, 1985.
- HERNANDEZ-MUNOZ, R.; MONTIEL-RUIZ, C.;VAZQUEZ-MARTINEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. **Lab Invest**, v. 80, n. 8, p. 1161-1169, 2000.
- HIGHTOWER, L. E.; WHITE, T. P. Preferential synthesis of rat heat shock and glucose-regulated proteins in stressed cardiovascular cells. In: M. J. Schlesinger, M Ashburner, A. Tissiaeres. **Heat shock, from bacteria to man**. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. p. 369-377 ISBN 0879691581.
- HILLS, B. A. Gastric surfactant and the hydrophobic mucosal barrier. **Gut**, v. 39, n. 5, p. 621-624, 1996.
- HIRAIISHI, H.; TERANO, A.; OTA, S.; MUTOH, H.; SUGIMOTO, T.; HARADA, T. et al. Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. **Gastroenterology**, v. 106, n. 5, p. 1199-1207, 1994.
- HIRSCHOWITZ, B. I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K. et al. Pharmacological aspects of acid secretion. **Dig.Dis.Sci.**, v. 40, n. 2 Suppl, p. 3S-23S, 1995.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; DE ALMEIDA, A. B.; BATISTA, L. M.; MAGRI, L. et al. Natural trans-crotonin: the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Biol.Pharm.Bull.**, v. 25, n. 4, p. 452-456, 2002.
- HOGABOAM, C. M.; BISSONNETTE, E. Y.; CHIN, B. C.; BEFUS, A. D.; WALLACE, J. L. Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. **Gastroenterology**, v. 104, n. 1, p. 122-129, 1993.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.;DIAS, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

- HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 739-768, 1988.
- HUANG, W. Y.; COLTRERA, M.; SCHUBERT, M.; MORTON, T.; TRUELOVE, E. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. **Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.**, v. 78, n. 6, p. 748-754, 1994.
- JADESKI, L. C.; LALA, P. K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. **Am.J.Pathol.**, v. 155, n. 4, p. 1381-1390, 1999.
- JOHNSON, L. R.; ALPERS, D. H. **Physiology of the gastrointestinal tract**. L. R. Johnson. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994. 1283 p. ISBN 0781701325.
- JONES, S. B. Vernoniaeae – systematic review. In: V. H. Heywood, J. B. Harborne, B. L. Turner. **The biology and chemistry of the Compositae**. London: Academic Press, 1977. p. 503-521 ISBN 0123468019.
- JORDAN, N.; NEWTON, J.; PEARSON, J.; ALLEN, A. A novel method for the visualization of the in situ mucus layer in rat and man. **Clin.Sci.(Lond)**, v. 95, n. 1, p. 97-106, 1998.
- KANG, J. Y.; ELDERS, A.; MAJEED, A.; MAXWELL, J. D.; BARDHAN, K. D. Recent trends in hospital admissions and mortality rates for peptic ulcer in Scotland 1982-2002. **Aliment.Pharmacol.Ther.**, v. 24, n. 1, p. 65-79, 2006.
- KANWAR, S.; WALLACE, J. L.; BEFUS, D.; KUBES, P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. **Am.J.Physiol**, v. 266, n. 2 Pt 1, p. G222-G229, 1994.
- KARGMAN, S.; CHARLESON, S.; CARTWRIGHT, M.; FRANK, J.; RIENDEAU, D.; MANCINI, J. et al. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. **Gastroenterology**, v. 111, n. 2, p. 445-454, 1996.
- KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **J.Gastroenterol.Hepatol.**, v. 15 Suppl, p. D1-D6, 2000.
- KHAN, H. A. Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats. **J.Pharmacol.Toxicol.Methods**, v. 49, n. 2, p. 89-95, 2004.

- KINGHORN, A. D. The role of pharmacognosy in modern medicine. **Expert Opin.Pharmacother.**, v. 3, n. 2, p. 77-79, 2002.
- KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs - Stitching together naturally. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 10, p. 748-748, 2002.
- KITAJIMA, T.; OKUHIRA, M.; TANI, K.; NAKANO, T.; HIRAMATSU, A.; MIZUNO, T. et al. Cell proliferation kinetics in acetic acid-induced gastric ulcer evaluated by immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen. **J.Clin.Gastroenterol.**, v. 17 Suppl 1, p. S116-S120, 1993.
- KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K.;MURAYAMA, T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. **Eur.J.Pharmacol.**, v. 452, n. 2, p. 235-243, 2002.
- KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.;STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-1350, 1984.
- KRISTJANSSON, G.; HOGMAN, M.; VENGE, P.;HALLGREN, R. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in coeliac patients challenged with gluten and corn. **Gut**, v. 54, n. 6, p. 769-774, 2005.
- KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. **Am.J.Med.**, v. 109, n. 2, p. 150-158, 2000.
- KUIPERS, E. J.; MEUWISSEN, S. G. The efficacy and safety of long-term omeprazole treatment for gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology**, v. 118, n. 4, p. 795-798, 2000.
- KUJUBU, D. A.; FLETCHER, B. S.; VARNUM, B. C.; LIM, R. W.;HERSCHMAN, H. R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J.Biol.Chem.**, v. 266, n. 20, p. 12866-12872, 1991.
- KUNKEL, S. L.; SPENGLER, M.; MAY, M. A.; SPENGLER, R.; LARRICK, J.;REMICK, D. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. **J.Biol.Chem.**, v. 263, n. 11, p. 5380-5384, 1988.
- KUNKEL, S. L.; WIGGINS, R. C.; CHENSUE, S. W.;LARRICK, J. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v. 137, n. 1, p. 404-410, 1986.

- KURATA, J. H.; ELASHOFF, J. D.; HAILE, B. M.; HONDA, G. D. A reappraisal of time trends in ulcer disease: factors related to changes in ulcer hospitalization and mortality rates. **Am.J.Public Health**, v. 73, n. 9, p. 1066-1072, 1983.
- KVIETYS, P. R.; TWOHIG, B.; DANZELL, J.; SPECIAN, R. D. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. **Gastroenterology**, v. 98, n. 4, p. 909-920, 1990.
- KWEIFIOOKAI, G.; DEMUNK, F.; MACRIDES, T. A.; SMITH, P.; RUMBLE, B. A. Antiarthritic Mechanisms of Lupeol Triterpenes. **Drug Development Research**, v. 36, n. 1, p. 20-24, 1995.
- LAMBERTS, R.; CREUTZFELDT, W.; STRUBER, H. G.; BRUNNER, G.; SOLCIA, E. Long-term omeprazole therapy in peptic ulcer disease: gastrin, endocrine cell growth, and gastritis. **Gastroenterology**, v. 104, n. 5, p. 1356-1370, 1993.
- LEVENSTEIN, S. Stress and peptic ulcer: life beyond Helicobacter. **BMJ**, v. 316, n. 7130, p. 538-541, 1998.
- LEWIS, D. A.; HANSON, P. J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Prog.Med.Chem.**, v. 28, p. 201-231, 1991.
- LI, Y.; OHIZUMI, Y. Search for constituents with neurotrophic factor-potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. **Yakugaku Zasshi**, v. 124, n. 7, p. 417-424, 2004.
- LICHTENBERGER, L. M.; ULLOA, C.; ROMERO, J. J.; VANOUS, A. L.; ILLICH, P. A.; DIAL, E. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug and phospholipid prodrugs: combination therapy with antisecretory agents in rats. **Gastroenterology**, v. 111, n. 4, p. 990-995, 1996.
- LIMA, Z. P.; SEVERI, J. A.; PELLIZZON, C. H.; BRITO, A. R.; SOLIS, P. N.; CACERES, A. et al. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? **J.Ethnopharmacol.**, v. 106, n. 1, p. 29-37, 2006.
- LINDBERG, P.; BRANDSTROM, A.; WALLMARK, B. Omeprazole, a new antiulcer drug with a unique mechanism of action. **Acta Pharm.Suec.**, v. 24, n. 6, p. 329-332, 1987.
- LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil – Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas**. 3ª ed. São Paulo, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas**. 3ª ed. São Paulo, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. C-13 Nmr-Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- MALARA, B.; JOSKO, J.; TYRPIEN, M.; MALARA, P.; STEPLEWSKA, K. Dynamics of changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and angiogenesis in stress-induced gastric ulceration in rats. **J.Physiol Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p. 259-271, 2005.
- MARTIN, G. R.; WALLACE, J. L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Exp.Biol.Med.(Maywood.)**, v. 231, n. 2, p. 130-137, 2006.
- MARTINEZ-LARA, I.; GONZALEZ-MOLES, M. A.; RUIZ-AVILA, I.; BRAVO, M.; RAMOS, M. C.; FERNANDEZ-MARTINEZ, J. A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. **Acta Stomatol.Belg.**, v. 93, n. 1, p. 29-32, 1996.
- MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2<sup>a</sup>. Fortaleza/CE: UFC, 1997.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sci.**, v. 65, n. 2, p. L27-L32, 1999.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J.Biol.Chem.**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- MCINTOSH, J. H.; BYTH, K.; PIPER, D. W. Causes of death amongst a population of gastric ulcer patients in New South Wales, Australia. **Scand.J.Gastroenterol.**, v. 26, n. 8, p. 806-811, 1991.
- MILANI, S.; CALABRO, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microsc.Res.Tech.**, v. 53, n. 5, p. 360-371, 2001.
- MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Physiol Res.**, v. 49, n. 4, p. 441-446, 2000.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol.Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

- MONTEIRO, M. H.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; FELZENSZWALB, I.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F. J. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **J.Ethnopharmacol.**, v. 74, n. 2, p. 149-157, 2001.
- MORIKAWA, T.; LI, N.; NAGATOMO, A.; MATSUDA, H.; LI, X.; YOSHIKAWA, M. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). **J.Nat.Prod.**, v. 69, n. 2, p. 185-190, 2006.
- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. 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. **Jpn.J.Pharmacol.**, v. 57, n. 4, p. 495-505, 1991.
- MURPHY, H. M.; WIDEMAN, C. H.; BROWN, T. S. Plasma corticosterone levels and ulcer formation in rats with hippocampal lesions. **Neuroendocrinology**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 1979.
- NANJI, A. A.; TAHAN, S. R. Association between endothelial cell proliferation and pathologic changes in experimental alcoholic liver disease. **Toxicol.Appl.Pharmacol.**, v. 140, n. 1, p. 101-107, 1996.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.
- O'NEILL, G. P.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Lett.**, v. 330, n. 2, p. 156-160, 1993.
- OHTA, Y.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, I. Participation of xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in development of acute gastric mucosal lesions in rats with a single treatment of compound 48/80, a mast cell degranulator. **Dig.Dis.Sci.**, v. 44, n. 9, p. 1865-1874, 1999.
- OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models--the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biol.Pharm.Bull.**, v. 28, n. 8, p. 1321-1341, 2005.
- OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 132-139, 2003.
- PAGNO, T.; BLIND, L. Z.; BIAVATTI, M. W.; KREUGER, M. R. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 39, n. 11, p. 1483-1491, 2006.

- PAIMELA, H.; GODDARD, P. J.; SILEN, W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. **Dig.Dis.Sci.**, v. 40, n. 11, p. 2495-2496, 1995.
- PAWLIK, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. W.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T.; CZESNIKIEWICZ, M. et al. Impact of Helicobacter pylori and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on gastric ulcerogenesis in experimental animals and in humans. **Eur.J.Pharmacol.**, v. 449, n. 1-2, p. 1-15, 2002.
- PELEG, I. I.; WILCOX, C. M. The role of eicosanoids, cyclooxygenases, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal tumorigenesis and chemoprevention. **J.Clin.Gastroenterol.**, v. 34, n. 2, p. 117-125, 2002.
- PETERSEN, H.; KRISTENSEN, P.; JOHANNESSEN, T.; KLEVELAND, P. M.; DYBDAHL, J. H.; MYRVOLD, H. The natural course of peptic ulcer disease and its predictors. **Scand.J.Gastroenterol.**, v. 30, n. 1, p. 17-24, 1995.
- PEURA, D. A. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal symptoms and ulcer complications. **Am.J.Med**, v. 117 Suppl 5A, p. 63S-71S, 2004.
- PFEIFFER, S.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F.; MAYER, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **Br.J.Pharmacol.**, v. 118, n. 6, p. 1433-1440, 1996.
- PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNAS, J.; HOLM, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol**, v. 282, n. 2, p. G211-G219, 2002.
- PRELICH, G.; TAN, C. K.; KOSTURA, M.; MATHEWS, M. B.; SO, A. G.; DOWNEY, K. M. et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. **Nature**, v. 326, n. 6112, p. 517-520, 1987.
- PRINZ, C.; SACHS, G.; WALSH, J. H.; COY, D. H.; WU, S. V. The somatostatin receptor subtype on rat enterochromaffinlike cells. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1067-1074, 1994.
- RAIHA, I.; KEMPPAINEN, H.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; SOURANDER, L. Lifestyle, stress, and genes in peptic ulcer disease: a nationwide twin cohort study. **Arch.Intern.Med.**, v. 158, n. 7, p. 698-704, 1998.
- RAINSFORD, K. D. Gastric ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. **J.Pharm.Pharmacol.**, v. 39, n. 8, p. 669-672, 1987.

- RAJIC, A.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R. M.; CHANDLER, D. S.; POLYA, G. M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 206-210, 2000.
- RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.
- Rizzo, J. A., Monteiro, M. S. R., & Bitencourt, C. (1985). Utilização de plantas medicinais em Goiânia. In *Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Botânica* (pp. 691-714). Curitiba.
- ROBERT, A.; RUWART, M. Effect of prostaglandins on the digestive system. In: J. B. Lee. **Prostaglandins**. New York: Elsevier New York, 1982. p. 113-176 ISBN 0444006451.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.
- RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C.; YANEZ, T.; BECERRA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: assessment of its mechanism of action using in vitro models. **Life Sci.**, v. 78, n. 21, p. 2503-2509, 2006.
- ROKUTAN, K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. **J.Gastroenterol.Hepatol.**, v. 15 Suppl, p. D12-D19, 2000.
- ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C. L.; COHEN, M. S.; BRITIGAN, B. E. Free radicals and phagocytic cells. **FASEB J.**, v. 9, n. 2, p. 200-209, 1995.
- ROSSATO, S. C. **Utilização de plantas por populações do litoral norte do estado de São Paulo**. 1996. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ecologia Geral, Instituto de Biociência, USP, São Paulo, Brazil, 1996.
- SACHS, G.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P.; WALLMARK, B. Gastric H,K-ATPase As Therapeutic Target. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 28, p. 269-284, 1988.
- SALIM, A. S. Sulphydryl-containing agents: a new approach to the problem of refractory peptic ulceration. **Pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 301-306, 1992.

- SANDLER, R. S.; EVERHART, J. E.; DONOWITZ, M.; ADAMS, E.; CRONIN, K.; GOODMAN, C. et al. The burden of selected digestive diseases in the United States. **Gastroenterology**, v. 122, n. 5, p. 1500-1511, 2002.
- SANDWEISS, D. J. Effects of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and of cortisone on peptic ulcer. I. Clinical review. **Gastroenterology**, v. 27, n. 5, p. 604-616, 1954.
- SATO, S.; IKEDA, H.; FURUKAWA, H.; MURATA, Y.; TOMODA, M. [Effects of nutrient solution concentration on inorganic and glycyrrhizin contents of *Glycyrrhiza glabra* Linn]. **Yakugaku Zasshi**, v. 124, n. 10, p. 705-709, 2004.
- SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: L. L Brunton, J. S Lazo, K. L. Parker. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 2006. Cap. 59, ISBN 0-07-142280-3.
- SCHMASSMANN, A. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am.J.Med.**, v. 104, n. 3A, p. 43S-51S, 1998.
- SENER-MURATOGLU, G.; PASKALOGLU, K.; ARBAK, S.; HURDAG, C.; YANOGLU-DULGER, G. Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. **Dig.Dis.Sci.**, v. 46, n. 2, p. 318-330, 2001.
- SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A Simple Method for the Uniform Production of Gastric Ulceration in the Rat. **Gastroenterology**, v. 5, n. 1, p. 43-61, 1945.
- SHICHIJO, K.; IHARA, M.; MATSUU, M.; ITO, M.; OKUMURA, Y.; SEKINE, I. Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. **Dig.Dis.Sci.**, v. 48, n. 2, p. 340-348, 2003.
- SHIMIZU, N.; WATANABE, T.; ARAKAWA, T.; FUJIWARA, Y.; HIGUCHI, K.; KUROKI, T. Pentoxifylline accelerates gastric ulcer healing in rats: roles of tumor necrosis factor alpha and neutrophils during the early phase of ulcer healing. **Digestion**, v. 61, n. 3, p. 157-164, 2000.
- SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J.Nat.Prod.**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHEMKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia, da Planta ao Medicamento**. 3ª. Porto Alegre/RG: UFRGS, 2001.

- Snyckers, F. O. & Fourie, T. G. (1983). **Prophylaxis and treatment of stomach and intestinal ulcers - by admin. of oleanolic acid or its salts opt. with aspirin etc.** NORISTAN LTD. [EP93520-A1; EP93520-A; AU8313955-A; JP58201713-A; ZA8302912-A; EP93520-B; DE3366910-G; CA1216796-A; US4752606-A]. 13-4-1983.
- SOUZA BRITO, A. R. M.; NUNES, D. S. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5-6, p. 402-408, 1997.
- STUTTS, J. G. Taxonomic Revision of Vernonia Subsect - Chamaedrys (Compositae, Vernonieae). **Rhodora**, v. 90, n. 861, p. 37-99, 1988.
- SUBHADHIRASAKUL, S.; TAKAYAMA, H.; KITAJIMA, F. M.; AIMI, N. F. Triterpenoids from Thai medicinal plant, Willughbeia firma. **Natural Med**, v. 54, p. 155-157, 2000.
- SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; VARALAKSHMI, P.; SUNDARAPANDIYAN, R. Mitigating role of lupeol and lupeol linoleate on hepatic lipemic-oxidative injury and lipoprotein peroxidation in experimental hypercholesterolemia. **Mol.Cell Biochem.**, 2006.
- SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. **Prog.Lipid Res.**, v. 39, n. 4, p. 289-314, 2000.
- SUN, F. P.; SONG, Y. G.; CHENG, W.; ZHAO, T.; YAO, Y. L. Gastrin, somatostatin, G and D cells of gastric ulcer in rats. **World J.Gastroenterol.**, v. 8, n. 2, p. 375-378, 2002.
- SUNITHA, S.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. **Fitoterapia**, v. 72, n. 5, p. 516-523, 2001.
- SY, G. Y.; NONGONIERMA, R. B.; CISSE, A.; DIEYE, A. M.; WELE, A.; GADIAGA, N. F. et al. [Mechanisms of action of acetic and hexanic extracts of leaves of Vernonia colorata (Willd.) Drake (Compositae) on blood glucose regulation]. **Dakar Med.**, v. 51, n. 1, p. 42-46, 2006.
- SZABO, S.; GOLDBERG, I. Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. **Scand.J.Gastroenterol.Suppl**, v. 174, p. 1-8, 1990.

- TAKAGI, K.; OKABE, S.;SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Jpn.J.Pharmacol.**, v. 19, n. 3, p. 418-426, 1969.
- TANI, S.; OKUDA, M.; MORISHIGE, R.;TANAKA, T. Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. **Biol.Pharm.Bull.**, v. 20, n. 5, p. 482-485, 1997.
- TARIQ, M.; ELFAKI, I.; KHAN, H. A.; ARSHADUDDIN, M.; SOBKI, S.;AL MOUTAERY, M. Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 36, p. 5798-5804, 2006.
- TARNAWSKI, A. Molecular mechanisms of ulcer healing. **Drug News Perspect.**, v. 13, n. 3, p. 158-168, 2000.
- TARNAWSKI, A.; STACHURA, J.; KRAUSE, W. J.; DOUGLASS, T. G.;GERGELY, H. Quality of gastric ulcer healing: a new, emerging concept. **J.Clin.Gastroenterol.**, v. 13 Suppl 1, p. S42-S47, 1991.
- TARNAWSKI, A.; SZABO, I. L.; HUSAIN, S. S.;SOREGHAN, B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. **J.Physiol Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 337-344, 2001.
- TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig.Dis.Sci.**, v. 50 Suppl 1, p. S24-S33, 2005.
- TEXTER, E. C.; REILLY, P. A. The Efficacy and Selectivity of Pirenzepine - Review and Commentary. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 17, p. 237-246, 1982.
- TSUKIMI, Y.; NAKAI, H.; ITOH, S.; AMAGASE, K.;OKABE, S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. **J.Physiol Pharmacol.**, v. 52, n. 3, p. 391-406, 2001.
- TSUKIMI, Y.; OKABE, S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. **Biol.Pharm.Bull.**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2001.
- TYTELL, M.; HOOPER, P. L. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. **Expert.Opin.Ther.Targets.**, v. 5, n. 2, p. 267-287, 2001.
- UEKI, S.; TAKEUCHI, K.;OKABE, S. Gastric motility is an important factor in the pathogenesis of indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. **Dig.Dis.Sci.**, v. 33, n. 2, p. 209-216, 1988.

- VACCA, L. L. **Laboratory manual of histochemistry** New York : Raven Press, 1985. ISBN 0890045402 (spiral).
- VALVERDE, A. L.; CARDOSO, G. L.; PEREIRA, N. A.; SILVA, A. J.; KUSTER, R. M. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. **Phytother.Res.**, v. 15, n. 3, p. 263-264, 2001.
- VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature**, v. 367, n. 6460, p. 215-216, 1994.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat.New Biol.**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.
- VASSALLE, C.; DOMENICI, C.; LUBRANO, V.; L'ABBATE, A. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways in endothelial cells. **J.Vasc.Res.**, v. 40, n. 5, p. 491-499, 2003.
- VAZQUEZ-RAMIREZ, R.; OLGUIN-MARTINEZ, M.; KUBLI-GARFIAS, C.; HERNANDEZ-MUNOZ, R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **World J.Gastroenterol.**, v. 12, n. 27, p. 4318-4324, 2006.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas**. 2nd ed. Berlin: Springer, 1996. ISBN 3540586768 (Berlin : acid-free paper).
- WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Ann.Nutr.Metab**, v. 47, n. 3-4, p. 95-106, 2003.
- WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J.**, v. 10, n. 7, p. 731-740, 1996.
- WALLACE, J. L.; MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Exp.Biol.Med.(Maywood.)**, v. 226, n. 11, p. 1003-1015, 2001.
- WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512-520, 2000.
- WATANABE, T.; CHIBA, T. [Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly]. **Nippon Rinsho**, v. 60, n. 8, p. 1515-1520, 2002.
- WEISS, J. M. Effects of coping behavior in different warning signal conditions on stress pathology in rats. **J.Comp Physiol Psychol.**, v. 77, n. 1, p. 1-13, 1971.

- WEUSTEN, B. L.; JACOBS, J. W.;BIJLSMA, J. W. Corticosteroid pulse therapy in active rheumatoid arthritis. **Semin.Arthritis Rheum.**, v. 23, n. 3, p. 183-192, 1993.
- WHITTLE, B. J.; KAUFFMAN, G. L.;MONCADA, S. Vasoconstriction with thromboxane A2 induces ulceration of the gastric mucosa. **Nature**, v. 292, n. 5822, p. 472-474, 1981.
- WHITTLE, B. J.; LOPEZ-BELMONTE, J.;MONCADA, S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. **Br.J.Pharmacol.**, v. 99, n. 3, p. 607-611, 1990.
- WOLFE, M. M.; SACHS, G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology**, v. 118, n. 2 Suppl 1, p. S9-31, 2000.
- XIE, W. L.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R. L.;SIMMONS, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A**, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, 1991.
- YAO, X. L.; COWAN, M. J.; GLADWIN, M. T.; LAWRENCE, M. M.; ANGUS, C. W.;SHELHAMER, J. H. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity. **J.Biol.Chem.**, v. 274, n. 24, p. 17202-17208, 1999.
- YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T.; NAKAMURA, Y.; ARAI, M.; MATSUYAMA, K.; IINUMA, S. et al. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. **Dig.Dis.Sci.**, v. 40, n. 11, p. 2300-2304, 1995.
- YOUNG, R. A.; ELLIOTT, T. J. Stress proteins, infection, and immune surveillance. **Cell**, v. 59, n. 1, p. 5-8, 1989.
- YUAN, Y.; PADOL, I. T.;HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nat.Clin.Pract.Gastroenterol.Hepatol.**, v. 3, n. 2, p. 80-89, 2006.