

RENATA DE CAMARGO GOMES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DOS EXTRATOS
METANÓLICO E CLOROFÓRMICO E DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE
Vochysia tucanorum (VOCHYSIACEAE)**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, Área de Concentração: Farmacologia**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Botucatu - SP

2006

RENATA DE CAMARGO GOMES



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DOS EXTRATOS
METANÓLICO E CLOROFÓRMICO E DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE
Vochysia tucanorum (VOCHYSIACEAE)**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, Área de Concentração: Farmacologia**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Botucatu - SP

2006

DEDICATÓRIA

A Deus, pela vida.

Á minha mãe, Sônia Maria de Camargo, pela dedicação, exemplo, e empenho em me ajudar a realizar todos os meus sonhos. Por me erguer e incentivar em todos os momentos difíceis da minha vida.

Á minha Tia Célia Regina de Camargo (Quê) e minha Avó Terezinha Antunes de Camargo (in memorian) por ajudar a me criar e educar; sem a educação, carinho e estímulos delas, nada seria possível.

Ao meu pai Luis Carlos Gomes pelo incentivo educacional e emocional.

Aos meus irmãos Renan e Rafael pelo apoio e companheirismo, por me levar e trazer, muitas vezes aos finais de semana, na Unesp; por me acompanhar em experimentos, durante a noite, finais de semana, etc.

A meus primos-irmão Leandro e Sandro que sempre estiveram próximos, me apoiando.

A meus tios: Fonso, Lula e Cota e toda minha família, que sempre me deram muito carinho e incentivaram meus estudos.

A meu namorado Christian pelo apoio emocional, e por agüentar, em momentos críticos do meu trabalho, toda a descarga emocional depositada nele.

À Clélia pela orientação imprescindível. Uma pessoa que sempre soube entender minhas limitações, mas sempre estimulou o conhecimento e o meu desenvolvimento científico.

Às minhas amigas sempre companheiras e presentes, nos momentos bons e ruins da minha vida.

A todos do laboratório, em especial à Zeila, Hélio e a Mariana, que sem eles esse trabalho não teria se concretizado.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima, pela orientação, confiança e extrema compreensão durante todo este trabalho. Por ter se empenhado em me orientar, mesmo sabendo das dificuldades que iríamos enfrentar, devido ao meu trabalho no Hospital.

À Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro, do Departamento de Ciências Biológicas, UNESP de Bauru, pelo preparo dos extratos e frações e também pela caracterização fitoquímica.

À Tatiani que me indicou a professora Anne, e desta indicação surgiu todo este trabalho realizado.

A todos do laboratório: Raquel, Enxete, Melada, Paty, Catharine, Fabio, Thiago, Victor, e em especial a Zeila, Hélio pelo coleguismo, ensinamentos e auxílio no desenvolvimento dos experimentos.

À Mariana, pois sem ajuda dela aos finais de semana, não seria possível o desenvolvimento de toda parte experimental deste trabalho.

Às companheiras de pós-graduação: Érica, Aline, Deborah, Cláudia e Carol, por se preocuparem em me passar informações, me alertarem sobre prazos, congressos, e pelos momentos de descontração vividos juntos.

A todos os docentes que me auxiliaram em diversos pontos do meu trabalho, e ministraram disciplinas que puderam acrescentar conteúdo técnico e moral na minha vida. **Em especial a Profa. Mirtes**, pela sua compreensão e apoio dispendido.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia e Fisiologia, pelo auxílio no desenvolvimento do meu projeto.

Aos funcionários da pós-graduação, por toda orientação prestada.

À Direção do Hospital Estadual Bauru, por permitir mudanças em escala, pagamento de horas em finais de semana, em fim, de possibilitar o desenvolvimento do meu trabalho de mestrado.

Ao pessoal da Van, que viaja todo dia: Botucatu-Bauru e Bauru-Botucatu, e me concederam muitas caronas, sem essas caronas não conseguiria ter desenvolvido as atividades do mestrado e conciliado meu trabalho em Bauru.

Às meninas com quem morei (Má, Lau, Ana e Tati) e moro (Maira e Jú) em Bauru, por todo companheirismo e incentivo.

Aos meus eternos amigos e amigas, pessoas extremamente importantes na minha vida.

À Tia Marilza e Tio Tide pelo apoio sempre prestado.

Agradeço de coração todos aqueles que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho e que ficaram de fora dos agradecimentos.

"Ensinar não é uma função vital,
porque não tem o fim em si mesma,
a função vital é aprender..." (Aristóteles).

RESUMO

Este trabalho se propôs a avaliar farmacologicamente as partes aéreas de *Vochysia tucanorum* (Vochysiaceae), uma espécie típica do Cerrado, com potencial fitoterápico de ação gastroprotetora. A seleção desta espécie baseou-se nos estudos quimiotaxonomicos, pois esta não apresenta, até o presente, indicação popular no combate a úlceras gástricas. Os extratos orgânicos polares e apolares foram avaliados experimentalmente em modelo *in vivo* de indução de lesões gástricas por drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) e etanol acidificado. Devido a melhor solubilidade e desempenho do extrato metanólico, este extrato foi avaliado quanto a sua ação gastroprotetora frente a um indutor de lesões gástricas mais severas como o etanol absoluto em ratos. Após comprovação da atividade gastroprotetora do extrato metanólico, foram realizados modelos experimentais que comprovassem a participação do NO (óxido nítrico) e do grupamento sulfidríla no mecanismo de proteção do extrato. O extrato exerce sua ação gastroprotetora por ação sistêmica, exerce um efeito antissecretor sobre o suco gástrico, e atua sobre as modulações do NO endógeno. A partir do extrato metanólico foi obtida a fração enriquecida (fração butanólica), a qual foi avaliada para confirmação da atividade gastroprotetora. Com a realização do experimento de lesão gástrica induzida por etanol absoluto, foi comprovada a atividade gastroprotetora da fração butanólica e experimentos subseqüentes demonstraram que o mecanismo de proteção, dessa fração enriquecida, envolveu a participação expressiva do NO endógeno na ação gastroprotetora. A presença de terpenos na fração (uma classe de substâncias com conhecidas propriedades gastroprotetoras) e o isolamento dos compostos: ácido betulínico e uvaol, indicam o forte envolvimento destes constituintes na ação gastroprotetora de *Vochysia tucanorum*.

ABSTRACT

The present work aims to evaluate pharmacologically the aerial parts of *Vochysia tucanorum* (Vochysiaceae), a typical species of "Cerrado", with phytotherapeutic potential of gastroprotective action. The selection of this species is based on chemotaxonomic studies, since, to date, this has not presented a popular indication to combat gastric ulcers. Polar and apolar organic extracts were evaluated experimentally in an *in vivo* model of induction of gastric lesions by non-steroidal antiinflammatory-drugs (NSAIDs) and acidified ethanol. Due to better solubility and performance of methanolic extract, its gastroprotective action was evaluated by its response to the induction of more severe gastric lesions, specifically by absolute ethanol in rats. After demonstrating the gastroprotective action of methanolic extract, experimental models were realized that may corroborate the participation of NO (nitric oxide) and the sulfhydryl group in the protection mechanism of the extract. The extract exercises its gastroprotective action systemically, it exerts an antisecretory effect on gastric juice, and acts on modulations of endogenous NO. An enriched fraction (butanolic fraction) was obtained from methanolic extract, which was evaluated for confirmation of gastroprotective activity. Experimental induction of gastric lesion by absolute ethanol corroborated the gastroprotective activity of the butanolic fraction; and subsequent experiments demonstrate that the protection mechanism of this enriched fraction involved the expressive participation of endogenous NO in gastroprotective action. The presence of terpenes in the fraction (one class of substances with known gastroprotective properties) and the isolation of two compounds, betulinic acid and uvaol, indicate strong involvement of these constituents in gastroprotective action of *Vochysia tucanorum*.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	01
I.1. Fisiologia do estômago	01
I.2. As úlceras pépticas no homem	03
I.3. Terapêutica antiulcerogênica	05
I.4. Produtos Naturais	08
I.5. Diferentes abordagens para estudo de plantas medicinais	12
I.6. Revisão bibliográfica sobre o gênero <i>Vochysiaceae</i> e seus compostos químicos	13
II. OBJETIVO	16
III. MATERIAIS E MÉTODOS	17
III.1. Coleta do material vegetal	17
III.2. Preparação dos Extratos Vegetais e da Fração enriquecida	17
III.2.1. Preparação dos Extratos Metanólico e Clorofórmico	17
III.2.2. Preparação da fração butanólica e identificação de compostos	18
III.3. Animais	19
III.4. Ensaio farmacológicos	20
III.4.1. Toxicidade aguda e “screening” hipocrático	20
III.4.2. Determinação da motilidade intestinal	20
III.4.3. Atividade antiulcerogênica	21
a) Indução de úlceras pelo uso do Piroxicam	21
b) Indução de úlceras pelo Etanol/HCl	22
c) Úlceras gástricas induzidas por Etanol absoluto	22
d) Úlceras induzidas pela Ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico	23
e) Determinação do grupamento sulfidril na citoproteção	24
f) Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção	25
III. 4.4. Análís estatística	26
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
V. CONCLUSÃO	60
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do extrato metanólico de <i>V. tucanorum</i> (5 g/Kg) sobre os órgãos dos animais	27
Tabela 2: Efeito do extrato metanólico de <i>V. tucanorum</i> nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg sobre a motilidade intestinal	30
Tabela 3: Avaliação do efeito gastroprotetor pela administração de cimetidina e de três níveis de dose do Extrato MeOH de <i>Vochysia tucanorum</i> no modelo de indução de úlceras gástricas por DAINE (Piroxicam) em camundongos	32
Tabela 4: Avaliação do efeito gastroprotetor pela administração de cimetidina e de três níveis de dose do extrato CHCl ₃ de <i>Vochysia tucanorum</i> no modelo de indução de úlceras gástricas por DAINE (Piroxicam) em camundongos	35
Tabela 5: Avaliação do efeito gastroprotetor pela administração de lansoprazol e de três níveis de dose do extrato CHCl ₃ de <i>Vochysia tucanorum</i> no modelo de indução de úlceras gástricas por Etanol acidificado, em camundongos	36
Tabela 6: Avaliação do efeito gastroprotetor pela administração de lansoprazol e de três níveis de dose do extrato MeOH de <i>Vochysia tucanorum</i> no modelo de indução de úlceras gástricas por Etanol acidificado, em camundongos	38
Tabela 7: Efeito de diferentes doses do extrato metanólico de <i>V.tucanorum</i> sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, em ratos	40
Tabela 8: Efeito do extrato Metanólico de <i>V. tucanorum</i> no modelo de Ligadura de Píloro com administração do extrato por via Intraduodenal	42
Tabela 9: Efeito do extrato Metanólico de <i>V. tucanorum</i> no modelo de Ligadura de Píloro com administração do extrato por via oral	43
Tabela 10 : Efeito de diferentes doses da fração butanólica de <i>V.tucanorum</i> sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, em ratos	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Regulação fisiológica e farmacológica das secreções gástricas	02
Figura 2: Foto de <i>Vochysia tucanorum</i>	15
Figura 3: Evolução do peso corporal (g) de camundongos tratados com extrato metanólico de <i>V. tucanorum</i> (5 g/Kg) comparada com os tratados com veículo (salina).....	28
Figura 4: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por piroxicam - <u>Extrato metanólico de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	33
Figura 5: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por piroxicam - <u>Extrato clorofórmico de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	35
Figura 6: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por etanol acidificado - <u>Extrato clorofórmico de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	37
Figura 7: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por etanol acidificado - <u>Extrato metanólico de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	38
Figura 8: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por etanol absoluto - <u>Extrato metanólico de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	40
Figura 9: Efeito do extrato metanólico de <i>V. tucanorum</i> (250 mg/Kg) nas lesões gástricas induzidas por etanol, em ratos pré-tratados com L-NAME (inibidor da NO sintetase)	46
Figura 10: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas induzidas por etanol e resultados frente L-NAME (inibidor da NO sintetase) - <u>Extrato metanólico de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	46

Figura 11 - Efeito do extrato metanólico de <i>V. tucanorum</i> (250 mg/Kg) frente ao inibidor de sulfidril endógena (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol	49
Figura 12 : Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas induzidas por etanol e resultados frente inibidor de sulfidril endógena (NEM) - <u>Extrato metanólico de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	50
Figura 13 : Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por etanol absoluto - <u>Fração butanólica de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	52
Figura 14 : Efeito da fração butanólica de <i>V. tucanorum</i> na dose de 37,5 mg/Kg frente ao inibidor de sulfidril endógena (NEM) em modelo de úlcera induzida por etanol	54
Figura 15 : Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões de lesões gástricas induzidas por etanol e resultados frente inibidor de sulfidril endógena (NEM) - <u>Fração butanólica de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	55
Figura 16 : Efeito da fração butanólica de <i>V. tucanorum</i> na dose de 37,5 mg/Kg nas lesões gástricas induzidas por etanol, em ratos pré-tratados com L-NAME (inibidor da NO sintetase)	57
Figura 17 : Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões de lesões gástricas induzidas por etanol e resultados frente L-NAME (inibidor da NO sintetase) - <u>Fração butanólica de <i>Vochysia tucanorum</i></u>	58

LISTA DE ANEXOS

<u>Anexo 1</u> : Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental	61
<u>Anexo 2</u> : Identificação de substâncias terpenoídicas na fração butanólica	62
<u>Anexo 3</u> : Frações reunidas da cromatografia em contra-corrente por gotejamento (DCCC)	62
<u>Anexo 4</u> : T.L.C. comparativa das frações de <i>Vochysia tucanorum</i> 17 da DCCC. Identificação do ácido betulínico por comparação com o padrão	63
<u>Anexo 5</u> : T.L.C. comparativa das frações de <i>Vochysia tucanorum</i> 17 da DCCC, mostrando a presença do uvaol	64

I-INTRODUÇÃO

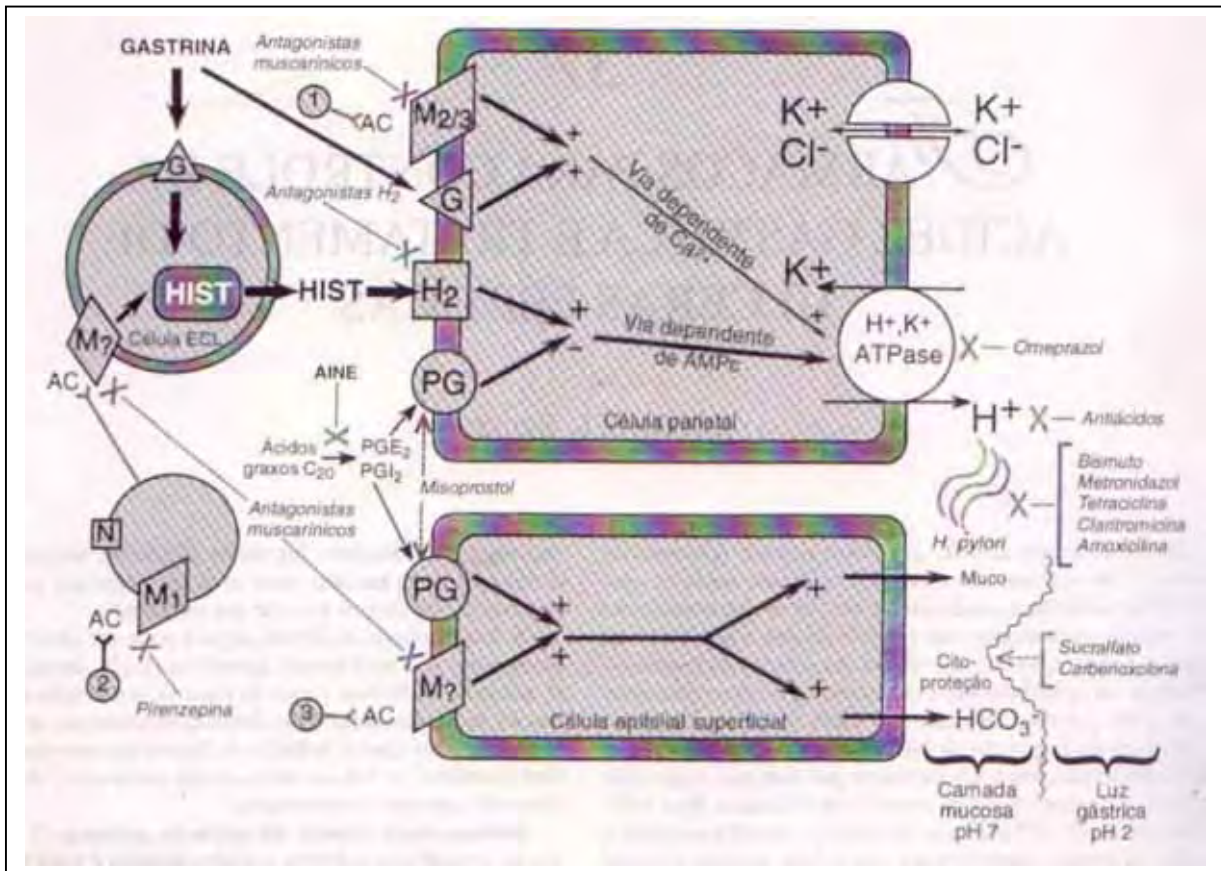
I.1. *Fisiologia do estômago*

O principal componente das secreções do estômago é o ácido clorídrico (HCl), secretado pelas células parietais (oxínticas), sob controle da gastrina (um hormônio secretado pelas células G), histamina (um mediador local, secretado pelas células enterocromofin) e acetilcolina (o neurotransmissor parassimpático vagal) (Figura 1); além disso o estômago secreta pepsina, enzima proteolítica, que é secretada na forma inativa, como pepsinogênio. O pepsinogênio é liberado dos grânulos de zimogênio nas células principais, estimulado pela atividade vagal, secretina e colecistoquinina (Guyton e Hall, 2002).

O estômago protege-se da lesão mecânica e da digestão pela secreção de duas substâncias: muco e íon bicarbonato (HCO_3^-), secretados respectivamente pelas células calciformes e epiteliais. O muco e o íon bicarbonato tem a função de fornecer uma camada lubrificada e tamponada de líquido viscoso sobre a mucosa gástrica, na qual o pH é mantido elevado e onde as enzimas proteolíticas gástricas não são ativas. O estômago também secreta o fator intrínscico, que é essencial para a absorção de vitamina B₁₂. Qualquer irritação local à mucosa estimula a produção de mediadores locais como as prostaglandinas, o que aumenta a produção de muco e íon bicarbonato, e também leva a outras alterações teciduais que promovem a cicatrização da lesão local (Davies *et al.*, 2002).

As prostaglandinas (Figura 1), inibem a atividade de adenil ciclase estimulada por histamina na célula parietal, reduzem a atividade pela via dependente de AMP cíclico evocada por histamina, reduzindo, portanto a secreção ácida (Brunton, 1996).

Figura1: Regulação fisiológica e farmacológica das secreções gástricas, Brunton, 1996, p.664.



1.2. As úlceras pépticas no homem

As úlceras gástricas têm sido intensamente estudadas nas pesquisas atuais, devido ao crescente número de pessoas acometidas por esta doença. Historicamente, a doença da úlcera péptica estava focalizada em anormalidades na secreção ácido gástrica e de pepsina, e na supressão ácida como estratégia de tratamento. Hoje, a hipersecreção gástrica associada com a Síndrome de Zollinger-Ellison, hiperplasia das células-G, um aumento na quantidade de células parietais e a ausência de equilíbrio fisiológico entre hormônios gástricos antagonistas, gastrina e somatostatina têm importante resultado na doença da úlcera péptica, entretanto a estimulação da secreção de ácido clorídrico e pepsina podem

estar relacionados com hipersensibilidade colinérgica e ação parassimpática, funcionando como co-fator em danos erosivos na mucosa gástrica (Yuan *et al.*, 2006).

Hábitos da sociedade moderna como o tabagismo, ingestão de álcool, utilização crescente de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (aspirina[®], por exemplo) para osteoartrite, artrite reumatóide e prevenção de doenças vasculares e o estresse, têm contribuído para o aumento do número de casos desta doença (Halter *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2006). Mas a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, tem cooperado para a formação de úlceras pépticas (formadas no estômago e duodeno), aumentando ainda mais as chances se o indivíduo possuir predisposição genética de desenvolver a doença (Taylor e Blaser, 1991). A *H. pylori* ataca o sistema imune e causa uma inflamação crônica, por diversos mecanismos. Existem relatos de que, *H pylori* pode danificar o sistema de defesa da mucosa através da redução da camada de muco, diminuindo a circulação sanguínea na mucosa, e interagindo com o epitélio gástrico em todos os estágios de infecção, além disso, essa bactéria pode aumentar a secreção de ácido gástrico (Yuan *et al.*, 2006).

As úlceras pépticas representam um típico exemplo de doença multifatorial, onde diferentes combinações entre hereditariedade e fatores ambientais produzem a mesma lesão morfológica (Wirth, 1995).

A etiologia das úlceras gastroduodenais é influenciada por vários fatores agressivos e defensivos, como secreção ácido-péptica pelas células parietais, barreira mucosa, secreção de muco e íon bicarbonato, circulação sanguínea, regeneração celular e agentes protetores endógenos (prostaglandinas e fatores de crescimento epidérmico) (Salas, 1990).

Mesmo sendo um fator necessário, a acidez gástrica raramente é suficiente para causar úlceras (Peterson, 1995). A maioria das úlceras pépticas tem sido associadas com a infecção gástrica pelo *H. pylori* ou com a ingestão de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) (Konturek, 2005), embora alguns estudos relatem um aumento na

proporção de úlceras não relacionadas com DAINEs e não relacionadas com *H. pylori* (Konturek, 2005). A prevalência de úlceras não relacionadas com DAINEs e não relacionadas com *H. pylori* não é clara, porque é difícil de saber se a prevalência não teve um aumento ou se não foi detectado o uso de DAINEs e/ou se diagnóstico de infecção por *H. pylori* não foi preciso ((Yuan *et al.*, 2006).

O mecanismo de lesão difere entre úlceras gástricas e duodenais. A úlcera duodenal é essencialmente uma doença relacionada com *H. pylori* e é causada principalmente por um aumento na quantidade de ácido e pepsina; já a úlcera gástrica, é mais comumente associada com a ingestão de DAINEs, embora a infecção por *H. pylori* possa estar presente. Em todas as condições, as úlceras são associadas com um desequilíbrio entre fatores protetores e agressores, sendo a inflamação a principal causa deste desequilíbrio (Yuan *et al.*, 2006).

O primeiro evento que geralmente ocorre antes da formação das úlceras é uma isquemia local, que leva a um aumento da permeabilidade da membrana, permitindo que agentes lesivos (ácido, pepsina, dentre outros) entrem em contato com a mesma, danificando-a (Peterson, 1995). A secreção de íon bicarbonato na camada de muco cria um gradiente de pH próximo a neutralidade, na superfície epitelial do estômago e duodeno, promovendo a primeira forma de proteger a mucosa contra acidez. A camada de muco contínua é também uma barreira para a pepsina, desse modo protege a mucosa subjacente da digestão proteolítica (Allen e Flemstrom, 2005).

A prevalência ao longo da vida da úlcera péptica (gástrica ou duodenal) é de aproximadamente 10%, e alguns médicos avaliam que 50% dos indivíduos saudáveis sofrem pirose diariamente. A dispepsia, em suas muitas formas, tem sido companheira da espécie humana desde o advento dos excessos alimentares e da ansiedade (Roberts e Morrow, 2001).

1.3. Terapêutica Antiulcerogênica

Durante séculos, a neutralização do ácido gástrico com antiácidos foi o único alívio para a dor das úlceras, porém a alcalose causada por absorção de NaHCO_3 , a constipação provocada pelo hidróxido de alumínio, a diarreia provocada pela administração de hidróxido de magnésio, as complicações em pacientes com hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, causadas pelo alto teor de sódio absorvido implicaram em impecilios para o uso destas drogas. Antigamente, grandes doses de bicarbonato e/ou carbonato de cálcio eram comumente administradas com leite, para o tratamento da úlcera péptica, ocasionando a “Síndrome leite-álcali”, com efeitos que consistiam em: hipercalcemia, retenção de fosfato, precipitação de sais de Ca^{2+} nos rins e insuficiência renal, portanto, esses e outros fatores levaram a busca de novas drogas para o tratamento das úlceras pépticas (Brunton, 1996; Champe *et al.*, 1998).

A estimulação de receptores muscarínicos aumenta a motilidade e a atividade secretória do trato digestivo (Champe *et al.*, 1998). Os estudos do controle fisiológico da secreção de ácido mostram que os agentes anticolinérgicos bloqueiam este processo, porém estas drogas podem provocar efeitos anticolinérgicos sobre as glândulas salivares, coração e no globo ocular (Roberts e Morrow, 2001). Durante muito tempo, a doença da úlcera péptica foi freqüentemente manuseada cirurgicamente, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade. Uma supressão farmacológica efetiva da secreção gástrica iniciou com a introdução de antagonistas do receptor H_2 de histamina na década de 70. Durante a década de 80 as cirurgias eletivas de úlceras pépticas declinaram 85%, o que pode ser atribuído pelo uso de cimetidina ou ranitidina (Yuan *et al.*, 2006). A redução da produção de ácido gástrico mostrou ser o principal efeito colateral das drogas dessa classe, porém o bloqueio não seletivo da secreção de ácido e os efeitos no S.N.C., principalmente em idosos,

(p.ex. cefaléia, tontura, sonolência, alucinações) contribuíram para a busca por fármacos mais seletivos (Champe *et al.*, 1998).

Posteriormente, os inibidores benzimidazólicos substituídos da $H^+ K^+ -ATPase$ ofereceram um meio muito eficaz de bloquear seletivamente a bomba de prótons responsável pela secreção de ácido da célula parietal (Roberts e Morrow, 2001). Estudos em animais mostraram que os fármacos inibidores da bomba protônica, aumentam a incidência de tumores carcinóides gástricos, possivelmente relacionados como os efeitos da prolongada hipocloridria (Champe *et al.*, 1998). O excesso de crescimento bacteriano no trato gastrointestinal, devido a elevação do pH gástrico, pode estar relacionado ao uso a longo prazo dos medicamentos desta classe (Brunton, 1996).

Embora o ácido gástrico tenha dominado o pensamento médico como responsável pela formação das úlceras pépticas, os meios pelos quais a mucosa gástrica normalmente se protege de danos sugeriram enfoques terapêuticos adicionais, inclusive o uso de inúmeros agentes citoprotetores (Robert e Morrow, 2001). Subsequentemente á descoberta da atividade citoprotetora das prostaglandinas, análogos estáveis das prostaglandinas foram obtidos sugerindo que poderiam ser úteis no tratamento da úlcera péptica, particularmente por se mostrarem efetivos na inibição ácido gástrica humana. Diversas triagens clínicas relataram que esses análogos são efetivos na aceleração da taxa de cicatrização das úlceras gastroduodenais não somente acompanhada de terapia com DAINEs (quando há deficiência na existência de prostaglandinas endógenas), mas também nas ulcerações DAINEs-independentes (Konturek *et al.*, 2005) Alguns efeitos colaterais limitaram o uso desses análogos de prostaglandinas: doses orais eficazes de misoprostol causam diarréia em até 30% dos pacientes. Uma reação adversa importante do misoprostol é seu efeito abortivo, portanto seu foi restringido para gestantes (Brunton, 1996).

A identificação do papel do *H. pylori* em causar a gastrite e contribuir para o processo ulcerativo no estômago e no duodeno fez surgir o enfoque terapêutico de que a eliminação desta bactéria seria uma estratégia útil para promover a cicatrização de úlceras e evitar sua recorrência (Roberts e Morrow, 2001). Numerosos estudos mostram que as úlceras pépticas resurgem com baixa frequência quando a infecção pela *H. pylori* é combatida e quando o uso de DAINEs é suprido pelo paciente (Konturek *et al.*, 2005).

Em países em desenvolvimento, as úlceras relacionadas com infecção pela *H. pylori* têm se tornado raras, devido a introdução da antibioticoterapia. Entretanto, úlceras associadas como o uso de DAINEs permanece como um dos principais problemas clínicos da atualidade, o qual não foi solucionado com a introdução de inibidores seletivos da ciclooxigenase 2 (COX-2). Diversos artigos recentes têm esclarecido a contribuição adicional da COX-2 na defesa da mucosa gástrica e na cicatrização de úlceras. Em algumas circunstâncias, COX-2 produz uma substância gastroprotetora altamente potente (15-R-lipoxina A₄), e análogos dessa substância poderiam ter valor terapêutico na prevenção de ulcerações gástricas (Wallace, 2005).

Porém, com a redução dos índices de infecções por *H. pylori*, a proporção de úlceras pépticas não relacionadas com esta bactéria ou ao uso de DAINEs tem aumentado (Chan e Leung, 2002).

O gasto financeiro anual, com doença da úlcera péptica, nos EUA, incluindo custo direto e indireto, é estimado em US\$3,4 bilhões (Yuan, 2006).

No Brasil, apesar da ausência de registros epidemiológicos dos casos de úlceras, sabe-se que existem inúmeros casos envolvendo essa doença, o que significa um problema de saúde pública relevante e torna a busca por novas substâncias com atividade antiulcerogênica essencial. Embora exista um grande arsenal de drogas com atividade antiulcerogênica no mercado, ainda não há aquela que produza 100% de remissão das

úlceras, com reduzido efeito colateral e sem o comprometimento do paciente, que geralmente faz uso crônico desses medicamentos.

Nos anos recentes, revistas têm difundido artigos que identificam novas drogas antiulcerogênicas derivadas de fontes naturais (Jamal *et al.*, 2006).

I.4. Produtos Naturais

Normalmente, os princípios ativos responsáveis pela ação farmacológica dos fitoterápicos são desconhecidos. Uma característica básica dos agentes fitoterapêuticos é o fato de que eles normalmente não possuem uma imediata e forte ação farmacológica. Por essa razão, agentes fitoterapêuticos não são usados para tratamento emergencial. Outras características dos medicamentos vegetais são seu extenso uso terapêutico e sua grande aceitação pela população. Em contraste com os medicamentos sintéticos, medicamentos de origem vegetal são freqüentemente usados para o tratamento de doenças crônicas. Combinações com substâncias ativas quimicamente definidas ou constituintes isolados não são considerados medicamentos fitoterápicos. É importante notar que, embora preparações homeopáticas podem freqüentemente conter plantas, elas também não são consideradas medicamentos vegetais (Calixto, 2000).

O problema da medicina tradicional, entre outros, é que a mesma não acompanha os avanços científicos e tecnológicos, e os métodos e técnicas de preparo dos medicamentos são tidos como segredos. O uso racional dos medicamentos tradicionais não é bem definido, pois o uso destes é freqüentemente associado á crenças, rituais, misticismo, forças intangíveis como a feitiçaria, e em muitos aspectos baseado em princípios morais e espirituais que dificultam a racionalização (Taylor *et al.*, 2001).

Comparações realizadas entre fitoterápico e a droga sintética suscitam algumas diferenças como: o princípio ativo do medicamento fitoterápico é freqüentemente desconhecido; controle de qualidade do medicamento fitoterápico é praticável, porém não é fácil; ensaios clínicos e estudos toxicológicos controlados que provem a eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos são raros; uso empírico e na medicina popular é uma característica muito importante; e a ocorrência de efeitos secundários indesejáveis é bem menor do que ocorre com drogas sintéticas, porém normalmente não é realizado um ensaio clínico criterioso com os medicamentos fitoterápicos; seu custo é inferior ao da droga sintética (Calixto, 2000).

Uma grande proporção da população dos países subdesenvolvidos usa a medicina tradicional sozinha, ou em combinação com drogas sintéticas para tratar uma grande variedade de doenças (Taylor *et al.*, 2001). Raramente há uma efetiva colaboração entre a prática tradicional e prática da medicina Ocidental, em grande parte, devido á percepção de que o uso de medicamentos tradicionais e vegetais não tem base científica (Taylor *et al.*, 2001). Com o renovado interesse dos países Ocidentais em remédios vegetais, e a necessidade urgente de desenvolver novas drogas efetivas, o uso de plantas medicinais tradicionais têm recebido, ultimamente, atenção da comunidade farmacêutica e científica (Taylor *et al.*, 2001).

Drogas derivadas de plantas têm uma importante posição em ambas, medicina tradicional e moderna, por essa razão, um esforço especial em manter a vasta diversidade de espécies de plantas, indubitavelmente ajudaria a aliviar, em longo prazo, o sofrimento humano. Tecnologias agroindustriais comprovadas deveriam ser aplicadas no cultivo e processamento de plantas medicinais e na fabricação de medicamentos a base de planta (Akerle, 1993).

É estimado que mais de 80% da população mundial utilize plantas medicinais como fonte primária de agente medicinal (Taylor *et al.*, 2001). Plantas medicinais são úteis como origem de agentes terapêuticos diretos e matéria prima para fabricação de compostos mais complexos, como modelos para novos produtos sintéticos, e como sinalizadores taxonômicos (Akerlele, 1993).

Em alguns casos particulares, como drogas antitumorais e antimicrobianas, cerca de 60% dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado e a maioria desses no último estágio dos ensaios clínicos são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas superiores (Cragg *et al.*, 1997).

As maiores companhias farmacêuticas têm demonstrado renovado interesse na investigação de plantas superiores, como fonte de novos exemplos de estruturas e também para o desenvolvimento de agentes fitoterápicos padrão, com provada eficácia, segurança e qualidade (Akerlele, 1993).

Um marco crescente no mercado fitoterapêutico mundial tem ocorrido nos últimos 15 anos. Para o mercado Europeu e dos EUA, sozinhos, isto chegou a atingir US\$7 bilhões e US\$5 bilhões por ano, respectivamente, em 1999, e assim tem atraído o interesse das maiores companhias farmacêuticas (Calixto, 2000).

Até uns poucos anos atrás, somente companhias pequenas tinham interesse no marketing de medicamentos vegetais. Atualmente, as maiores companhias multinacionais são interessadas em comercializar drogas vegetais (Calixto, 2000) .

Ao longo da história, as plantas possibilitaram o desenvolvimento de muitas drogas utilizadas até hoje na terapêutica e as mesmas continuam atuando como uma rica fonte de compostos químicos na procura de novos agentes terapêuticos. Algumas drogas essenciais derivadas de plantas são: atropina, codeína, morfina, digitoxina/ digoxina, e quinina (Phillipson, 2003).

O reino vegetal constitui uma valiosa fonte de substâncias biologicamente ativas, onde pode ser encontrada uma fonte inesgotável de constituintes químicos, que podem ser usados diretamente como fármacos ou como material de partida para síntese de novos medicamentos (Kaplan e Gottlieb, 1996).

Os compostos naturais usados na medicina moderna são derivados de somente 94 espécies de plantas. Considerando que o número de espécies de plantas superiores é estimado em aproximadamente 250.000, há um grande número de plantas para serem estudadas como uma fonte de novas drogas ou fitomedicamentos (Di Stasi, 2005).

Em vista disso, investigar a vasta biodiversidade vegetal brasileira vem a ser um passo promissor. Particularmente o Bioma Cerrado, que possui riqueza de espécies vegetais superada apenas pelas Florestas Amazônica e Atlântica (www.eco.ib.usp.br/cerrado).

1.5. Diferentes abordagens para estudo de plantas medicinais

Segundo Elisabetsky e Moraes (1988) há três diferentes abordagens para a seleção de plantas medicinais:

- Estudo Randômico, no qual não é usado nenhum critério, a investigação toma um curso arbitrário;
- Etnofarmacologia, em que a seleção das plantas é baseada nos usos terapêuticos de grupos étnicos;
- Quimiotaxonomia, onde as espécies são selecionadas de acordo com categorias químicas encontradas em plantas do mesmo gênero ou família;

A etnofarmacologia é definida como uma exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados pelo homem; e o objetivo deste estudo é a validação das preparações tradicionais através do isolamento de substâncias ativas ou de achados farmacológicos nas preparações (Taylor *et al.*, 2001).

Um problema relacionado à seleção por etnofarmacologia, é que os remédios tradicionais são raramente compreendidos em um simples extrato de planta, e em muitos casos os benefícios terapêuticos são atribuídos ao consumo de misturas de plantas em que a planta inteira ou partes dela são preparadas e consumidas em combinação ou em sequência (Taylor *et al.*, 2001).

O critério para a seleção da espécie vegetal deste estudo não se baseou em levantamentos etnofarmacológicos, nem em um estudo randômico (ao acaso), mas sim em uma abordagem quimiotaxonomica. Um estudo de quimiotaxonomia favorece a aquisição de conhecimentos de substâncias químicas, derivadas de novas fontes ou fontes inexploradas (Brito, 1996).

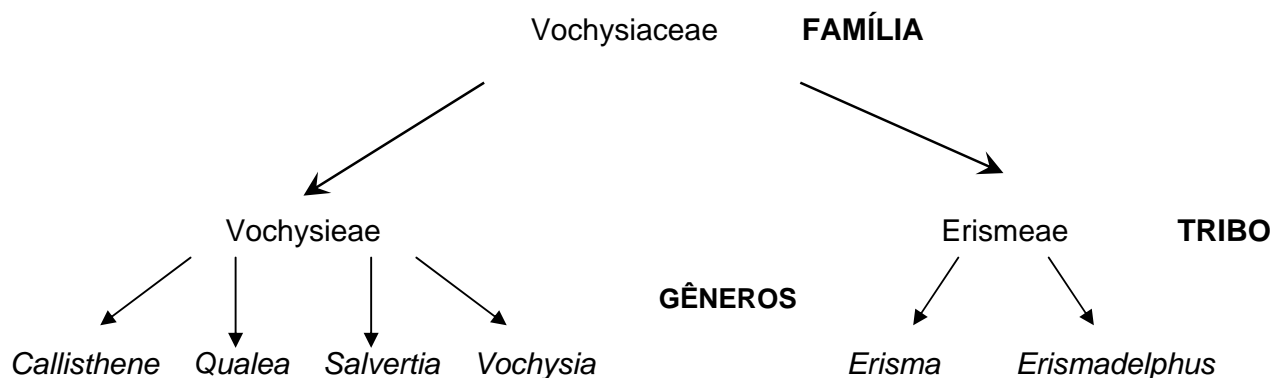
Uma estratégia importante neste tipo de abordagem é a relação de espécies do mesmo gênero, porque é comum encontrar certas substâncias chaves em mais de uma espécie do mesmo gênero (Brito, 1996). Esta informação pode oferecer uma pista interessante sobre o tipo de atividade que pode ser esperada de uma dada espécie, se compostos semelhantes estiverem presentes nela (Brito, 1996).

Como objeto de estudo deste trabalho, a seleção da planta *Vochysia tucanorum* se fez através da similaridade de metabólitos secundários da família (Vochysiaceae), que apresentam atividade antiulcerogênica.

Os princípios ativos derivados de plantas são metabólitos secundários, não são elementos nutritivos para a planta. A biossíntese dessas substâncias é realizada quando fatores agressivos acometem a planta, como por exemplo o ataque de predadores, portanto, por não participar do processo vital da planta, esses metabólitos secundários não são abundantes, a concentração de um princípio ativo superior a 1% é uma exceção (Brito, 1996).

I.6. Revisão bibliográfica sobre a família Vochysiaceae e seus compostos químicos.

As Vochysiaceae compreendem geralmente árvores tropicais compostas de duas tribos, seis gêneros e aproximadamente 200 espécies. Destas, a tribo Erismae contém dois gêneros, chamados *Erismadelphus* (3 espécies) e *Erisma* (20 espécies), enquanto a tribo Vochysieae é composta de quatro gêneros; *Callisthene* (10 espécies), *Qualea* (60 espécies), *Salvertia* (1 espécie) e *Vochysia* (105 espécies) (Mayworm *et al.*, 2000).



Vochysia, pertencente à mesma tribo do gênero *Qualea*, o qual tem sido objeto de estudo em nosso laboratório quanto as suas propriedades antiulcerogênicas (Hiruma-Lima *et al.*, 2002; Hiruma-Lima *et al.*, 2006).

Baseado em um levantamento etnofarmacológico, a espécie *Qualea grandiflora* foi avaliada frente ao uso tradicional uso como agente gastroprotetor, e mostrou prevenir e curar úlceras baseado na habilidade de estimular a síntese de muco e por seu efeito anti secretório (Hiruma-Lima *et al.*, 2006).

A espécie *Qualea multiflora* mostrou ser letal para caramujos adultos infectados pelo *Schistosoma mansoni* (De Souza *et al.*, 1984). Ácido tormêntico, um triterpeno isolado da *V. divergens* mostrou-se eficiente contra neuropatia e dor persistente devido a processo

inflamatório (Bortalanza *et al.*, 2002). *V. divergens*, utilizada popularmente para tratamento de infecções e asma, também apresentou atividade antibacteriana (Hess *et al.*, 1995). A espécie *Qualea paraensis*, usada tradicionalmente para escabiose, por índios Chacobo da Amazônia Boliviana, mostrou importante atividade antimalárica, *in vivo* (Muñoz *et al.*, 2000).

As espécies do gênero *Vochysia* são abundantes fontes de terpenos. Ácido 6 β -hidroximaslinico, ácido β -sitosterol-glucosido, ácidos uvaol, eritrodiol, ursólico e oleanólico têm sido relatados em estudos com *V. ferruginea* (Zucaro, 2000). Ácido divergioico, β -sitosterol, ácidos betulínico, sérico e 24-hidroxitormentico e o (28 \rightarrow 1) β -D-glucopiranosil foram descritos em estudos com a espécie *V. divergens* (Hess e Delle Monache, 1999). Adicionalmente, ácido vismiaefólico, um triterpeno, foi encontrado no caule de *V. vismiaefolia* (Mayworm *et al.*, 2000). Ácido 24-hidroxitormêntico se mostrou ação analgésica (Beirith *et al.*, 1999); ácido tormentico possui ação anti-inflamatória (Bortalanza *et al.*, 2002) e ácido sericico apresentou atividade antibacteriana (Hess *et al.*, 1995).

A planta em estudo, *Vochysia tucanorum*, ([Figura 2](#)) popularmente conhecida como pau tucano, não possui qualquer indicação medicinal, é uma espécie terrestre que pode atingir 6 metros de altura, com folhas verticiladas que formam grupos de quatro em cada nó e possuem textura forte coriácea e de coloração verde intensa. As flores, de um amarelo-louro, surgem nos meses de dezembro e março e posicionam-se eretas, deixando-se observar as características esporas de sua corola (Almeida, 1998).



Figura 2: *Vochysia tucanorum*
Arvores Brasileiras, Lorenzi, 1992

II. OBJETIVO

Mediante um estudo quimiotaxonômico, de substâncias químicas e atividade biológica presentes em plantas da mesma tribo *Vochysieae*, este trabalho destinou-se em avaliar farmacologicamente os extratos metanólico e clorofórmico e a fração butanólica da *Vochysia tucanorum*, como potencial fitoterápico no combate as úlceras gástricas.

III. MATERIAIS E MÉTODOS:

III.1. Coleta do material vegetal

As folhas da *Vochysia tucanorum* foram coletadas no campus da Unesp de Bauru, São Paulo, pela Profa. Dra. Anne L. Dokkedal. A identificação também foi realizada pela pesquisadora. Uma exsicata de número ALD 146 foi depositada no herbário UNBA, da Faculdade de Ciências da UNESP/Bauru.

III.2. Preparação dos Extratos Vegetais e da Fração enriquecida

III.2.1. Preparação dos Extratos Metanólico e Clorofórmico

Considerando a ausência de indicação popular da espécie que poderia mostrar em qual tipo de preparação a atividade terapêutica poderia estar presente, optou-se pelo procedimento clássico para obtenção de extratos orgânicos de material de planta seco e triturado: a extração por solventes de polaridade crescente. Tipicamente são obtidos dois extratos, utilizando-se como principais solventes: hexano, clorofórmio ou éter (para separar compostos apolares) e etanol ou metanol (para compostos mais polares) (Di Stasi, 1996). Neste trabalho optou-se pela obtenção dos extratos clorofórmico e metanólico das folhas de *Vochysia tucanorum*. Para esta obtenção, 1Kg de folhas de *V.tucanorum* foram coletadas e posto em estufa a 40°C e em seguidas trituradas em liquidificador industrial.

O pó resultante da trituração foi submetido à maceração em clorofórmio (CHCl₃) por 1 semana. O recipiente foi hermeticamente fechado. Após esse período, filtrou-se em papel de filtro e concentrou-se a solução em rotaevaporador, sob pressão reduzida. Depois deste processo obteve-se o extrato clorofórmico de *Vochysia tucanorum*. À torta resultante da maceração foi adicionado metanol (MeOH) permanecendo mais uma semana sob maceração, resultando no extrato metanólico de *Vochysia tucanorum*.

Todos os procedimentos fitoquímicos foram realizados no Departamento de Ciências Biológicas da Unesp, campus Bauru.

O rendimento final aproximado obtido a partir da extração de 1Kg das folhas da espécie vegetal *V. tucanorum* foram:

- CHCl_3 (clorofórmico) = 27,8g (2,78%)
- MeOH (metanólico) = 36,6g (3,66%)

III.2.2. Preparação da fração butanólica e identificação de compostos

As folhas secas ao ar livre foram exaustivamente extraídas em temperatura controlada, com CHCl_3 e com MeOH. Os solventes foram evaporados à vácuo para gerar CHCl_3 (27,8g) e MeOH (36,6g) de extratos.

21g do extrato metanólico foram submetidas à partição; para tanto, o extrato foi dissolvido em água e colocado em funil de separação, onde se adicionou BuOH na proporção de 1;1 (V:V). após a formação das duas fases a fração butanólica foi coletada e concentrada. Como resultado, foram obtidos 6g de fração butanólica.

A camada delgada demonstrada no Anexo2 mostra a presença de substâncias terpenoídicas na fração butanólica, pela coloração azul/roxo após revelação com anisaldeído, e também mostra a presença de outras substâncias, quando comparada com a parte aquosa. Solvente utilizado: CHCl_3 :MeOH:H₂O (20:7:3, fase orgânica).

2g da fração butanólica do extrato metanólico foram submetidos a DCCC (droplet counter current chromatography/ cromatografia em contra-corrente por gotejamento). O solvente utilizado foi CHCl_3 :MeOH:H₂O (43:37:20). A fase aquosa foi utilizada como fase estacionária e a fase orgânica, como móvel. Foram coletadas 75 frações, que foram submetidas a TLC comparativa. As amostras semelhantes foram reunidas e recromatografadas.

A repetição da cromatografia da fração 17, indicou a presença de ácido betulínico e uvaol, os quais foram caracterizados por 1D e 2D experimento NMR e comparados com a literatura (Mahato and Kundu, 1994).

O rendimento aproximado obtido a partir de 2 g de fração *V. tucanorum* foram:

- ácido betulínico (em mistura) = 15 mg (0,75%)
- uvaol (em mistura) = 440 mg (22%)

Os princípios ativos derivados de plantas são metabólitos secundários, não são um elemento nutritivo para a planta. A biossíntese dessas substâncias é realizada quando fatores agressivos acometem a planta, como predadores, etc., portanto por não participar do processo vital da planta, esses metabólitos secundários não são abundantes, a concentração de um princípio ativo superior a 1% é uma exceção (Brito, 1996).

III.3. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-40g) e ratos Wistar albinos machos (150 a 200g), para os experimentos de lesões gástricas. Eles foram provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas, controlados. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais previamente aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu (protocolos n° 018/03, 019/03, 020/03, 021/03 e 022/03).

III.4. Ensaio farmacológicos

III.4.1. Toxicidade aguda e “screening” hipocrático (Brito, 1994)

Foram utilizados camundongos machos Swiss, divididos em 2 grupos: um grupo tratado com o veículo (salina) e os demais tratados com a dose 5000 mg/kg do extrato metanólico de *Vochysia tucanorum*. Os tratamentos foram realizados oralmente, após prévio jejum de 12 horas, e os parâmetros comportamentais (anexo 1), descritos por Brito (1994), foram avaliados aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a realização dos tratamentos, bem como o número de mortes. O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente por 14 dias após o início dos experimentos. No décimo quarto dia, os animais foram sacrificados e os seguintes órgãos foram retirados: coração, fígado, pulmão, baço e rins. Os órgãos dos animais foram pesados para a determinação analítica e comparativa dos mesmos em relação aos animais submetidos ao tratamento com salina indicando ou não efeito tóxico agudo deste extrato vegetal.

III.4.2. Determinação da motilidade intestinal

Seguindo o método descrito por Baggio *et al.*, 2003, camundongos Swiss macho, em jejum de 6h e divididos em 5 grupos, receberam seus respectivos tratamentos orais: salina, atropina 5 mg/kg e extrato metanólico de *V. tucanorum* nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg. Foram testadas as três doses do extrato para verificar a ação dose-dependente. Após trinta minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% p.o. num volume de 10 mL/kg (P.O.), para depois de meia hora serem sacrificados. O passo seguinte foi a retirada de todo intestino delgado juntamente com o estômago, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado, para a obtenção da relação distância percorrida e comprimento total do intestino.

III.4.3. Atividade antiulcerogênica

Cada modelo experimental, que avalia a propriedade antiulcerogênica, apresenta os seus respectivos grupos controle positivo (Cimetidina, Lansoprazol ou Carbenoxolona) e negativo (salina ou Tween 80 a 8%) dependendo da especificidade de cada modelo e da solubilidade dos extratos nos veículos, respectivamente. Os animais, antes do tratamento, foram mantidos em gaiola especial, sem maravalha e com água *ad libitum*. Em todos os experimentos de indução de úlcera, as lesões ulcerativas foram controladas e classificadas de acordo com a severidade (Szelenyi e Thiemer, 1978) em lesões nível 1 (pontos hemorrágicos < 1mm), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas > 3mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesões ulcerativas (I.L.U.), obtido através da equação:

$$\text{I.L.U.} = (\sum \text{lesões nível 1}) + (2 \times \sum \text{lesões nível 2}) + (3 \times \sum \text{lesões nível 3})$$

a) Indução de úlceras pelo uso do Piroxicam - O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Puscas *et al.*, (1997), com modificações. Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando cerca de 30 g, submetidos a jejum por um período de 36 horas. Primeiramente os tratamentos foram administrados: Tween 80 a 8% ou salina 0,9% (controle negativo), cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) e extratos CHCl₃ ou MeOH de *V. tucanorum* (250, 500 e 1000 mg/Kg). Após 30 minutos, o agente indutor da úlcera (piroxicam) foi administrado na dose de 30 mg/Kg, por via subcutânea. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 4 horas após o estímulo lesivo (piroxicam). Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da maior curvatura para a determinação do pH do suco gástrico e prensados em placa de vidro para contagem e classificação das lesões gástricas (I.L.U.).

b) Indução de úlceras pelo Etanol/HCl - Este método foi baseado nas modificações realizadas por Mizui e Doteuchi (1983). Após 24 horas de jejum, os grupos experimentais foram tratados com os extratos metanólico e clorofórmico, 50 minutos antes da indução de lesão gástrica por HCl/etanol (camundongos Swiss). Grupos de animais receberam lansoprazol 30 mg/Kg (controle positivo), Tween 80 a 8% ou salina (controle negativo) e os extratos CHCl₃ e MeOH de *V. tucanorum* (250, 500 e 1000 mg/Kg). Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose volume final de 10 mL/Kg e os agentes lesivos foram administrados em volume de 0,2 mL da solução de 0,3M HCl/etanol 60%, em camundongos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 1 hora após a administração do agente lesivo. Os estômagos foram retirados, o pH do suco gástrico determinado e os estômagos foram abertos ao longo da grande curvatura e subsequentemente foram prensados em placas de vidro, escaneados e realizado o procedimento de contagem das lesões gástricas (I.L.U.).

c) Úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto - O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Morimoto *et al.*, 1991, com modificações. Foram utilizados para tal experimento ratos Wistar albinos machos (150 a 200g).

Devido escassez de extrato metanólico, o experimento foi realizado somente com as doses de 250 e 500 mg/Kg. Uma vez que o extrato metanólico de *V. tucanorum* apresentou atividade gastroprotetora, foi realizado um fracionamento e a fração butanólica testada no modelo de indução de úlceras por etanol absoluto, para verificar a presença ou ausência de ação gastroprotetora nessa fração. Considerando que de 5g de extrato metanólico de *V. tucanorum* foram obtidos 2 g de fração butanólica (40%) e a menor dose do extrato foi 250 mg/Kg, a dose correspondente da fração a ser usada seria 100 mg/Kg. Considerando que os dados de

rendimento do extrato e da fração são aproximados, como dose de partida da fração a dose de 150 mg/Kg e duas doses inferiores a essa: 75 mg/Kg e 37,5 mg/Kg foram selecionadas.

5g de extrato metanólico - - - - - 100%

2g de fração (derivada do extrato) - - - - - x = 40%

250 mg/Kg (dose empregada do extrato) - - - - - 100%

y = - - - - - 40%

y= 100mgKg, que é a dose de fração a ser empregada nos ensaios

Os animais foram tratados, após 24 h de jejum, com o extrato metanólico nas doses de 500 mg/Kg e 250 mg/Kg e com a fração butanólica nas doses de 150 mg/Kg, 75 mg/Kg e 37,5 mg/Kg e com 100 mg/Kg de carbenoxolona (usado como controle positivo, embora o misoprostol fosse a droga mais indicada; porém sua obtenção é muito restrita) e salina (controle negativo), uma hora antes da indução de 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 para contagem e classificação das lesões, como descrito acima. Este e os testes seguintes foram realizados somente com o extrato metanólico, pois o mesmo apresentou melhores resultados e a solubilidade do extrato polar foi extremamente maior que o extrato clorofórmico.

d) Úlceras induzidas pela Ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico - Foi adotado o modelo descrito por Shay, (1945) com modificações, onde os parâmetros do suco gástrico foram avaliados pelo efeito do extrato metanólico administrado oral ou intraduodenalmente no intuito de avaliar o efeito local e sistêmico do extrato. Após 24 horas de jejum os camundongos, sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura do piloro. A administração do extrato metanólico de V.

tucanorum na dose de 250 mg/Kg ou cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) ou salina 0,9%(controle negativo), todos em dose volume final de 10 mL/Kg, foi realizada logo após a amarradura, por via intraduodenal ou 30 min. antes para os tratamentos por via oral. A dose única do extrato (250 mg/Kg) foi utilizada com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, por ser considerada a menor dose efetiva em indução de proteção.

As incisões foram suturadas e 4 horas após a cirurgia os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e a incisão reaberta. Logo em seguida foi realizada uma ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) e o estômago retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida, determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01N em bureta digital modelo EM-burete, utilizando fenolftaleína como indicador ácido-base. A concentração total de ácido foi expressa em mEq/ml/4h e o pH determinado por fitas de pH. Quando possível, as lesões gástricas foram avaliadas segundo o cálculo do I.L.U., descrito anteriormente.

e) Determinação do grupamento sulfidril na citoproteção (Matsuda *et al.*, 1999).

Ratos Wistar machos submetidos ao jejum de 24 horas foram aleatoriamente separados em 6 grupos, onde houve a administração de uma injeção intraperitoneal de NEM (N-etilmaleimida), 10 mg/Kg, em 3 grupos, enquanto os 3 restantes receberam salina pela mesma via. A droga NEM inibe a síntese de sulfidril endógena, e cada animal dos grupos correspondentes recebeu um volume de 10 mL/kg. Após um período de 30 minutos foram administrados os tratamentos pela via oral (salina, carbenoxolona 100 mg/kg e extrato metanólico 250 mg/Kg e 37,5 mg/Kg de fração butanólica de *V. tucanorum*). A dose de 37,5 mg/Kg da fração butanólica foi utilizada por ser a menor dose efetiva em indução de proteção, segundo resultado obtido no experimento de indução de lesões ulcerogênicas por etanol

absoluto. Depois de 60 minutos, os animais receberam (p.o.) um volume de 1mL de etanol absoluto, como agente ulcerogênico, sendo sacrificados após 1 hora de sua administração. Os estômagos foram retirados e abertos pela grande curva, para então suas lesões serem medidas e o I.L.U. calculado.

f) Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção (Arrieta *et al.*, 2003).

Ratos Wistar machos submetidos a jejum por 24 horas, foram divididos em 6 grupos, onde 3 receberam injeção intraperitoneal de L-NAME (N-nitro-L-arginina metil ester), inibidor da NO-sintase, enquanto os outros 3 grupos receberam salina pela mesma via. Após 30 minutos, os grupos sofreram administração oral dos respectivos tratamentos (salina, carbenoxolona 100 mg/Kg e extrato metanólico 250 mg/Kg e fração butanólica na dose de 37,5 mg/Kg). Após 60 minutos, os animais foram tratados pela via oral com solução irritante de etanol absoluto. Os animais foram sacrificados após 1 hora e os estômagos removidos e abertos na grande curvatura de maneira a permitir a contagem e avaliação das lesões para se calcular o índice de lesão ulcerativa.

III. 4.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão (d.p.) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelos testes de Dunnett, em experimentos com mais de dois grupos de tratamento em que a comparação foi realizado com relação aos seus respectivos grupos controle negativos. O teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre os grupos de tratamento, para a seleção da melhor dose e nos modelos que testaram a participação do NO e grupamento sulfidril na atividade antiulcerogênica. A análise estatística dos resultados considerou como nível de significância mínima de $p < 0,05$.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A toxicidade aguda é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância-teste, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde, resultantes de uma exposição de curta duração pela via escolhida. Este estudo serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre toxicidade aguda subcrônica, crônica e com doses repetidas, além de fornecer informações iniciais sobre o modo de ação tóxico da substância-teste (Brito, 1994).

A toxicidade aguda do extrato metanólico de *V. tucanorum* foi avaliada frente à natureza dos efeitos e o caráter reversível ou não das respostas. Para tal análise foi estabelecido um período de observação de 14 dias após a aplicação aguda do extrato.

A administração do extrato MeOH de *V. tucanorum* na dose de 5000 mg/Kg não provocou alterações nos parâmetros comportamentais analisados quando comparados aos obtidos com o grupo tratado com o veículo. O monitoramento diário dos pesos corporais dos animais não indicou variação significativa em relação aos animais tratados com o veículo (Figura 3). Durante o período de observação ocorreu a morte de um animal tratado com o extrato, porém esse animal foi autopsiado, e após observação dos órgãos, não foi constatada nenhuma alteração macroscópica que pudesse indicar a causa da morte do animal.

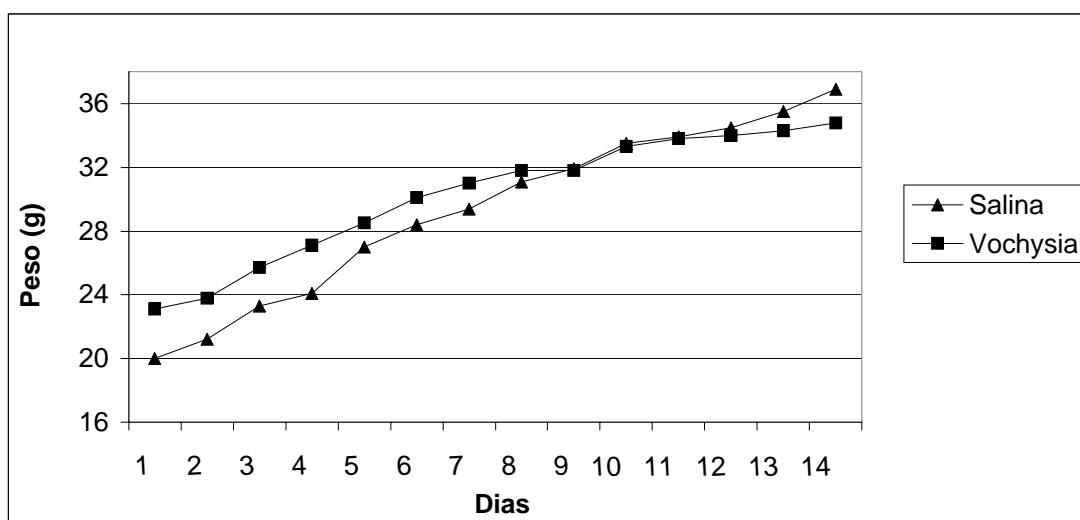
Tabela 1: Efeito do extrato metanólico de *V. tucanorum* (5 g/Kg) sobre os órgãos dos animais.

Tratamentos	N	Coração	Pulmão	Fígado	Rins	Baço	Mortalidade
VEICULO	10	12,24±0,61	15,35±1,00	49,13±3,72	22,81±0,70	12,24±1,03	0
<i>V. tucanorum</i>	10	12,74±0,83	15,41±1,13	48,15±3,05	22,12±1,69	12,92±1,45	1

Dados da razão dos órgão e peso corpóreo expressos em média (arcoseno) ± desvio padrão da média.

Outro parâmetro analisado foi o peso relativo dos órgãos vitais, obtidos da razão entre o peso do órgão e peso total do animal que foi transformada em arcoseno para fins de adequação estatística. Após a realização do teste *t* de Student, verificou-se a não existência de diferença significativa ($p > 0.05$) entre o grupo de animais tratados com veículo e o grupo tratado com extrato (Tabela 1).

Figura 3: Evolução do peso corporal (g) de camundongos tratados com extrato metanólico de *V. tucanorum* (5 g/Kg) comparada com os tratados com veículo (salina).



Varição de peso (g) do animais monitorados (n=10) durante 14 dias. Expressam as médias de peso para cada dia. $p > 0.05$ (teste *t* de Student).

A extrapolação dos resultados para seres humanos de estudos de efeitos tóxicos produzidos pela administração aguda de uma substância em roedores é internacionalmente aceita, embora não seja considerada como um valor absoluto e tampouco dispense a realização de ensaios de tolerância em humanos (Brito, 1994). Para assegurar que a planta possa ser utilizada como fitoterápico outros testes devem ser realizados tais como: toxicidade subaguda e crônica.

A dose letal mediana (DL_{50}) é um valor estatisticamente derivado da administração de uma dose única de uma substância que pode provocar a morte de 50% dos animais da experiência (Brito, 1994).

Para a determinação da dose letal mediana (DL_{50}) devem ser utilizadas cinco doses (Brito, 1994), e como a dose de 5000 mg/Kg causou apenas a morte de um animal, cinco doses inferiores a 5000 mg/Kg poderiam ser usadas, nos modelos experimentais.

Como a concentração do princípio ativo em plantas, raramente excede 1%, nos modelos que avaliam a atividade gastroprotetora de uma planta, deve ser utilizada uma dose inicial de 1000 mg/Kg, por via oral, devido esta ser a posologia usualmente empregada na terapêutica anti-úlceras. Dose de 1000 mg/Kg de extrato bruto pressupõe a presença do princípio ativo na concentração de 10% , como é empregada a cimetidina (100 mg/Kg), de 2% para uma dose similar a do omeprazol (20 mg/Kg), e de 0,1% para uma dose como a do misoprostol (1 mg/Kg) (Brito, 1996).

Com base neste pressuposto, optou-se por utilizar ao menos 3 níveis de dose, nos modelos experimentais, utilizando como dose máxima 1000 mg/Kg, uma dose 5 vezes menor à aquela caracterizada no ensaio de toxicidade aguda (5000 mg/Kg).

A motilidade intestinal está relacionada com a velocidade de esvaziamento gástrico. Este modelo foi realizado para eliminar a possibilidade de interferências inespecíficas do extrato sobre a ação gastroprotetora, como por exemplo, a presença de atividade diarréica, que diminuiria a absorção do extrato e conseqüentemente a atividade.

No experimento de determinação do extrato metanólico de *V. tucanorum* sobre a motilidade, não foi observada alteração dos padrões normais em todas as doses testadas: 250, 500 e 1000 mg/Kg, o que indica a não participação desse tipo de mecanismo inespecífico na atividade do extrato, como é demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Efeito do extrato metanólico de *V. tucanorum* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg sobre a motilidade intestinal.

Tratamento P.O.	Dose mg/Kg	N	<u>percurso do carvão</u> tamanho do Intestino
VEÍCULO	-----	5	65,73 ± 5,70
ATROPINA	5	5	46,33 ± 8,15 *
<i>V. tucanorum</i>	250	5	60,32 ± 6,10
<i>V. tucanorum</i>	500	5	59,62 ± 6,60
<i>V. tucanorum</i>	1000	5	73,14 ± 13,90

Dados da proporção do percurso do carvão no intestino delgado em relação ao tamanho do intestino, expressos em média (arcoseno) ± desvio padrão da média.

A ação das DAINes decorre da inibição de síntese de prostaglandinas, efetuada mediante a inativação das cicloxigenases constitutiva (COX-1), responsável pelos efeitos fisiológicos das PG em sítios gástricos e renais, e induzível (COX-2). A inibição da cicloxigenase 1 é, pelo menos em parte, responsável por alguns dos efeitos adversos das DAINes, como as toxicidades renal e gastrintestinal (Roberts e Morrow, 2001; Seager e Hawkey, 2001). Diversos artigos recentes têm esclarecido a contribuição adicional da COX-2 na defesa da mucosa gástrica e na cicatrização de úlceras. Em algumas circunstâncias, COX-2 produz uma substância gastroprotetora altamente potente (15-R-lipoxina A₄) (Wallace, 2005). A cura de úlceras requer angiogênese no tecido de granulação na base da mesma, junto com a replicação das células epiteliais nas margens da úlcera e subsequentemente o reestabelecimento da arquitetura glandular. A proliferação de células epiteliais e endoteliais é possível devido aos fatores de crescimento. As drogas inibidoras da COX, seletivas e não seletivas, podem interferir negativamente na cura de úlceras gástricas, em partes, devido a habilidade dessas drogas em reduzir a expressão de fatores de crescimento, inibindo a angiogênese na região da úlcera (Wallace, 2005).

As prostaglandinas I₂ e E₂ inibem a enzima adenililciclase, que inibida deixa de ativar a proteína-quinase, que conseqüentemente deixa de estimular a bomba de prótons responsável pela liberação de ácido gástrico. Com a administração de DAINES, a síntese de prostaglandinas fica alterada e, portanto a secreção de ácido aumentada, além da alteração na estimulação de muco, da secreção de bicarbonato e na circulação sanguínea da mucosa gástrica (Champe *et al.*, 1998).

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos com o extrato metanólico da *Vochysia tucanorum* que protegeu significativamente a mucosa gástrica dos camundongos frente à indução de lesões por DAINE (piroxicam). Nas três doses testadas (250, 500 e 1000 mg/Kg) foi observada proteção significante ($p < 0,01$), se comparado aos animais tratados com veículo (salina). O extrato MeOH da *V.tucanorum* nas doses de 500 e 1000 mg/Kg, neste modelo, apresentou proteção superior a cimetidina (55% de proteção), com valores de 56% e 75% de proteção, respectivamente (Figura 4). Esse resultado pode ser justificado considerando que a dose administrada de extrato foi até 10 vezes maior (1000 mg/Kg) do que a dose administrada de cimetidina (substância pura). No modelo de indução de úlceras gástricas por piroxicam, o extrato MeOH mostrou aumento significante de pH ($p < 0,01$) se comparado com o veículo (salina), sendo que o controle positivo (cimetidina) não mostrou alteração de pH significante. Esse fato pode ser justificado pelo fato da cimetidina inibir a secreção de ácido gástrico induzida por histamina ou gastrina, entretanto inibir parcialmente a secreção provocada por acetilcolina, além disso, a cimetidina não tem ação na síntese de prostaglandinas, as quais são responsáveis pela estimulação de muco e secreção de bicarbonato, que causa um tamponamento no ambiente gástrico, evitando a alteração do pH; já o extrato pode ter mostrado um aumento de pH significante por influenciar mais fatores, como por exemplo, síntese de prostaglandinas (aumento na secreção de bicarbonato), inibição da secreção ácida, ação antioxidante, dentre outros fatores (Champe *et al.*, 1998).

Tabela 3: Avaliação do efeito gastroprotetor pela administração de cimetidina e de três níveis de dose do Extrato MeOH de *Vochysia tucanorum* no modelo de indução de úlceras gástricas por DAINE (Piroxicam) em camundongos.

TRATAMENTO (P.O.)	DOSE (mg/Kg)	N	I.L.U.	pH	%PROTEÇÃO
VEÍCULO	-----	5	71,60 ± 8,56	2,20 ± 0,45	0
CIMETIDINA	100	5	32,40 ± 5,18**	3,00 ± 1,23	55
<i>V. tucanorum</i>	250	5	37,40 ± 9,53**	3,80 ± 0,45 **	48
<i>V. tucanorum</i>	500	5	31,40 ± 9,10**	4,80 ± 0,45 **	56
<i>V. tucanorum</i>	1000	5	18,00 ± 3,80**	4,60 ± 0,55 **	75

Os dados são expressos pela média ± d.p. seguido pela ANOVA e do teste Dunnett, ** p<0,01.

Figura 4: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por piroxicam.

Extrato metanólico de *Vochysia tucanorum*

SALINA = controle negativo

CIMET. = cimetidina = controle positivo

V 250 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose 250 mg/Kg

V 500 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose 500 mg/Kg

V 1000 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose 1000 mg/Kg



Na Tabela 4 são apresentados os dados obtidos através da avaliação do extrato clorofórmico da *V. tucanorum*, frente ao modelo de indução de úlceras por DAINÉ (piroxicam). Todos os tratamentos (cimetidina e o extrato clorofórmico da *V. tucanorum* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg) apresentaram significativa proteção em relação aos animais tratados com o veículo (tween 80 a 8%). O extrato clorofórmico da *V. tucanorum* nas doses de 500 e 1000 mg/Kg apresentou proteção superior á da droga usada como controle positivo (cimetidina), apresentando uma proteção frente as lesões ulcerogênicas de 62 e 63% respectivamente, se comparada coma proteção de 48% da cimetidina, devido a hipótese citada anteriormente (Figura 5).

No modelo de indução de úlceras por DAINÉs, portanto, os extratos metanólico e clorofórmico de *V. tucanorum* mostraram significativa proteção gástrica. O aumento da proteção gástrica, causada pelo extrato metanólico foi dose-dependente, visto que aumentando a dose dos extratos ocorre um aumento da proteção gástrica, já o extrato clorofórmico não mostrou essa mesma relação. Este modelo avaliou a capacidade do extrato em evitar as lesões ulcerogênicas causadas por DAINÉs, devido a um possível aumento na síntese de prostaglandinas (diminuídas com o uso dessas drogas), que promove maior expressão dos fatores de crescimento, impede a formação e/ou atuação de EROs, inibe a secreção gástrica induzida por histamina, gastrina ou acetilcolina.

Tabela 4: Avaliação do efeito gastroprotetor pela administração de cimetidina e de três níveis de dose do extrato CHCl₃ de *Vochysia tucanorum* no modelo de indução de úlceras gástricas por DAINE (Piroxicam) em camundongos.

TRATAMENTO (P.O.)	DOSE (mg/Kg)	N	I.L.U.	pH	%PROTEÇÃO
VEÍCULO	-----	8	84,13 ± 31,82	2,12 ± 0,83	0
CIMETIDINA	100	8	44,00 ± 16,20**	3,12 ± 1,73	48
<i>V. tucanorum</i>	250	8	45,88 ± 10,16**	3,00 ± 0,76	46
<i>V. tucanorum</i>	500	8	32,37 ± 15,16**	3,25 ± 0,71	62
<i>V. tucanorum</i>	1000	8	31,62 ± 7,11**	3,50 ± 1,20	63

Os dados são expressos pela média ± d.p. seguido pela ANOVA e do teste Dunnet, ** p<0,01.

Figura 5: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por piroxicam.

Extrato clorofórmico de *Vochysia tucanorum*

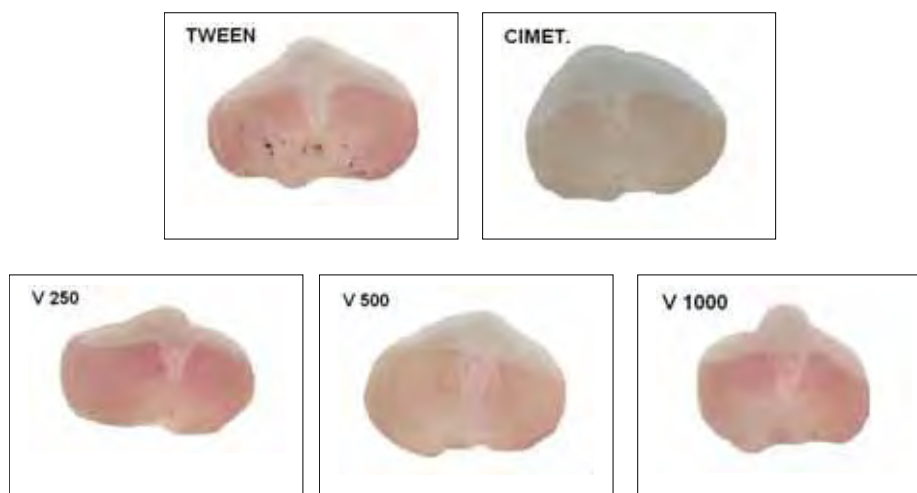
TWEEN (80 a 8%) = controle negativo

CIMET. = cimetidina = controle positivo

V 250 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 250 mg/Kg

V 500 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 500 mg/Kg

V 1000 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 1000 mg/Kg



Segundo Mizui e Doteuchi (1983), a administração de uma solução irritante de etanol acidificado em camundongos, produz lesões necrotizantes na mucosa gástrica, principalmente devido a debilidade da mucosa protetora e da exacerbação da secreção ácida gástrica e de pepsina (pepsinogênio é convertido a pepsina em meio ácido). Foram testadas as atividades antiulcerogênicas dos extratos metanólico e clorofórmico de *V. tucanorum*. Apesar do extrato clorofórmico de *V. tucanorum* ter apresentado efeito gastroprotetor nos modelos avaliados até o presente, a baixa solubilidade do extrato apolar dificultou imensamente a preparação de formulações homogêneas, que possibilitassem a execução dos experimentos e a confiabilidade dos dados experimentais. Neste modelo de indução de úlcera por esse agente irritante (etanol acidificado), somente o extrato MeOH de *V. tucanorum* promoveu significativa proteção frente as lesões (Figura 6). A proteção do extrato clorofórmico foi insignificante, com valores de 13%, 15% e 16% respectivamente para as dose de 250, 500 e 1000 mg/Kg, se comparado com o veículo, como é demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Avaliação do efeito gastroprotetor pela administração de lansoprazol e de três níveis de dose do extrato CHCl₃ de *Vochysia tucanorum* no modelo de indução de úlceras gástricas por etanol acidificado, em camundongos.

TRATAMENTO (P.O.)	DOSE (mg/Kg)	N	I.L.U.	pH	% PROTEÇÃO
VEÍCULO	-----	5	89,60 ± 13,54	4,20 ± 1,09	0
LANSOPRAZOL	30	5	48,20 ± 17,14**	5,20 ± 0,84	46
<i>V. tucanorum</i>	250	5	77,40 ± 10,01	4,00 ± ,71	13
<i>V. tucanorum</i>	500	5	76,40 ± 30,08	4,60 ± 1,14	15
<i>V. tucanorum</i>	1000	5	74,80 ± 17,73	4,00 ± 0,71	16

Os dados são expressos pela média ± d.p. seguido pela ANOVA e do teste Dunnett, *

*p<0,01.

Figura 6: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por etanol acidificado.

Extrato clorofórmico de *Vochysia tucanorum*

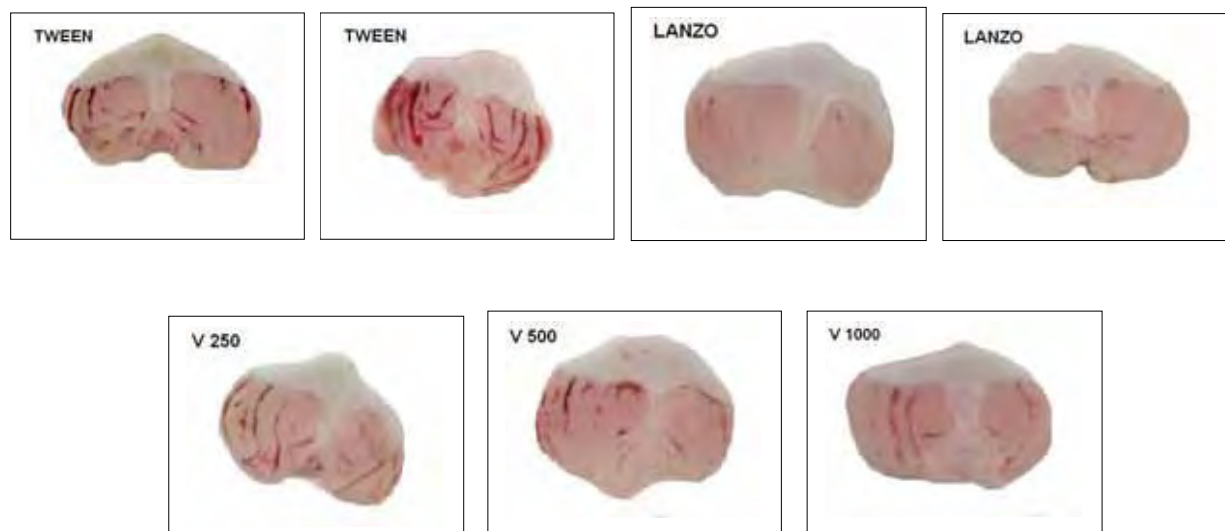
TWEEN (80 a 8%) = controle negativo

LANZO = lansoprazol = controle positivo

V 250 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 250 mg/Kg

V 500 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 500 mg/Kg

V 1000 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 1000 mg/Kg



Neste modelo, o extrato MeOH apresentou proteção significativa ($p < 0,01$) em todas as doses testadas (250, 500 e 1000 mg/Kg) de 53%, 49% e 47% respectivamente, se comparado com o veículo (Figura 7). O extrato metanólico não mostrou ter ação dose-dependente visto que a maior proteção foi obtida com a menor dose administrada, do extrato, como demonstrado na Tabela 6. A falta de efeito dose-dependente pode ser devido a uma composição complexa do extrato. Isto é possível devido à presença de alguns compostos no extrato, que podem antagonizar o efeito de outros compostos (Khenouf *et al.*, 2003).

Tabela 6: Avaliação do efeito gastroprotetor pela administração de lansoprazol e de três níveis de dose do extrato MeOH de *Vochysia tucanorum* no modelo de indução de úlceras gástricas por etanol acidificado, em camundongos.

TRATAMENTO (P.O.)	DOSE (mg/Kg)	N	I.L.U.	pH	% PROTEÇÃO
VEÍCULO	-----	6	95,50 ± 26,69	3,00 ± 0,63	0
LANSOPRAZOL	30	6	33,17 ± 11,65**	5,83 ± 0,98**	65
<i>V. tucanorum</i>	250	6	45,33 ± 12,91**	3,33 ± 1,51	53
<i>V. tucanorum</i>	500	6	49,00 ± 13,43**	3,33 ± 1,03	49
<i>V. tucanorum</i>	1000	6	50,33 ± 18,60**	3,17 ± 0,98	47

Os dados são expressos pela média ± d.p. seguido pela ANOVA e do teste Dunnet, ** p<0,01.

Figura 7: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por etanol acidificado.

Extrato metanólico de *Vochysia tucanorum*

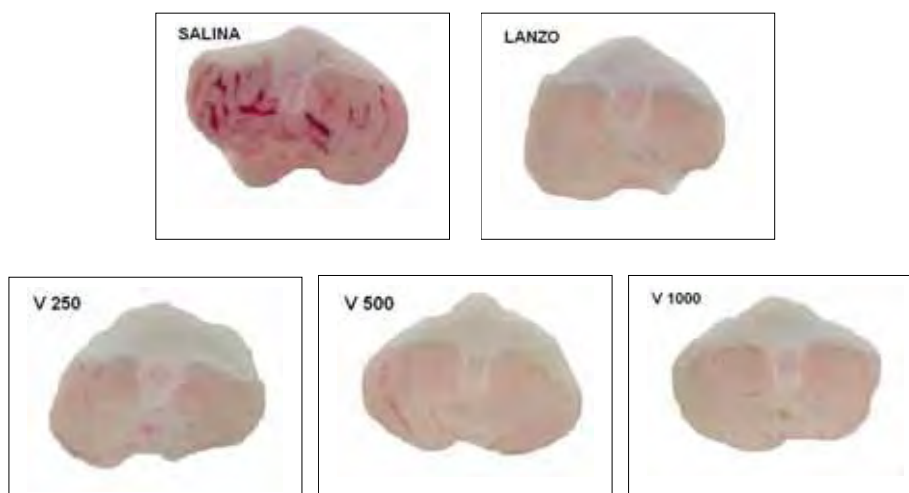
SALINA = controle negativo

LANZO = lansoprazol = controle positivo

V 250 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 250 mg/Kg

V 500 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 500 mg/Kg

V 1000 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 1000 mg/Kg



Este modelo empregou uma solução de etanol 60% associado ao ácido clorídrico 0,3M como agente indutor de lesões ulcerogênicas, em camundongos; e tem como objetivo verificar o efeito gastroprotetor do extrato metanólico frente a esses dois agentes lesivos.

A administração oral de etanol causa edema, necrose na mucosa, podendo romper a parede dos vasos sanguíneos, o que resulta nas hemorragias que foram observadas nesse modelo (Mincis *et. al.*, 1995). A formação de lesões na mucosa gástrica por agentes necrosantes tais como Etanol envolve diversos mecanismos, que reduzem o fluxo sanguíneo gástrico, contribuindo para o desenvolvimento de hemorragia e de necrose ao dissolverem constituintes do muco estomacal, passando também a estimular a secreção de pepsina, íons H⁺ e histamina, além de diminuir os níveis de proteína, DNA e RNA, ocasionando um comprometimento do tecido (Szabo, 1978).

Danos na mucosa podem ser facilmente produzidos pela geração de espécies reativas de oxigênio, endógenas ou exógenas. O processo de peroxidação lipídica é mediado pela interação de radicais hidroxila com a membrana das células, produzindo, subsequentemente, radicais livres derivados de lipídios. Esses radicais são extremamente reativos e causam danos oxidativos. O Etanol aumenta o ânion superóxido, a produção de radical hidroxila e a peroxidação lipídica na mucosa gástrica (Repetto e Llesuy, 2002).

No modelo descrito por Morimoto *et al.*, 1991, de indução de lesões ulcerativas causadas por etanol absoluto, em ratos, o extrato MeOH de *V. tucanorum* apresentou proteção gástrica, nas doses de 250 e 500 mg/Kg, com 45% e 65% de proteção respectivamente, em relação ao veículo, e proteção superior a apresentada pelo controle positivo (carbenoxolona), que apresentou 38% de proteção. Esses resultados são demonstrados na Tabela 7 e Figura 8. Foi testado somente o extrato metanólico, devido a baixa solubilidade do extrato clorofórmico e por o mesmo mostrar resultado inferior ao obtido com o extrato metanólico, como foi evidenciado no modelo de indução de úlceras por etanol

acidificado. Devido á escassez de extrato, somente as doses de 250 e 500 mg/Kg de *V. tucanorum* foram testadas.

Tabela 7: Efeito de diferentes doses do extrato metanólico de *V.tucanorum* sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, em ratos.

TRATAMENTO (P.O.)	DOSE (mg/Kg)	N	I.L.U.	pH	% PROTEÇÃO
VEÍCULO	-----	6	119,33 ± 36,35	4,50 ± 2,17	0
CARBENOXOLONA	100	6	74,00 ± 16,47**	7,00 ± 0,00*	38
<i>V. tucanorum</i>	250	6	65,50 ± 19,17**	3,83 ± 1,32	45
<i>V. tucanorum</i>	500	6	41,33 ± 17,72**	4,33 ± 1,51	65

Os dados são expressos pela média ± d.p. seguido pela ANOVA e do teste Dunnet,* p< 0, 5 e ** p<0,01.

Figura 8: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por etanol absoluto.

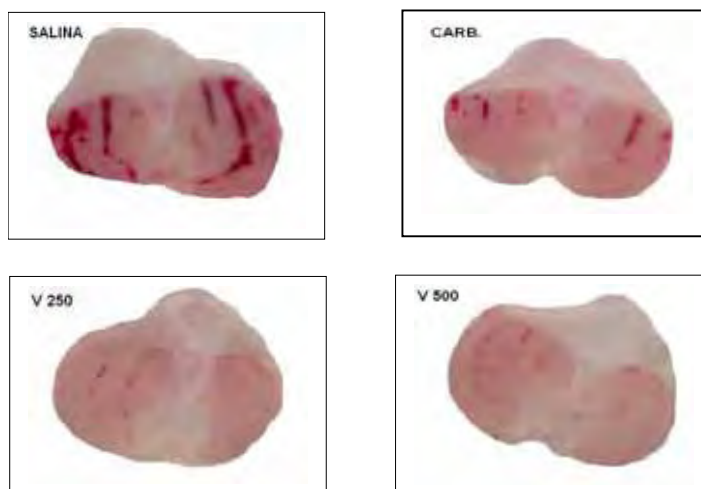
Extrato metanólico de *Vochysia tucanorum*

SALINA = controle negativo

CARB. = carbenoxolona = controle positivo

V 250 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose 250 mg/Kg

V 500 = Extrato de *Vochysia tucanorum* na dose 500 mg/Kg



Com base nos resultados obtidos até o momento, em que o efeito gastroprotetor do extrato metanólico de *V. tucanorum* foi evidenciado em praticamente todos os modelos experimentais avaliados até o presente, foi selecionada de uma única dose representativa do extrato para a investigação dos prováveis mecanismos de ação envolvidos na ação gastroprotetora do extrato. A seleção da menor dose efetiva foi baseada em análise estatística (teste de Tukey) quando se realizou uma análise comparativa entre os diferentes grupos que apresentaram efeito gastroprotetor nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/Kg. Através desta análise, foi selecionada a dose de 250 mg/Kg para a avaliação do mecanismo de ação gastroprotetora do extrato metanólico de *V. tucanorum*.

Ao proceder a ligadura do piloro em camundongos, as ulcerações são formadas em decorrência da hipersecreção gástrica, porém o entendimento do mecanismo desencadeador ainda é obscuro. Acredita-se que a secreção ácida seja liberada por reflexo vago-vagal em decorrência da distensão gástrica provocada pelo aumento do volume gástrico devido a obstrução piloro. Isso estimula a secreção de hormônio gastrina, cuja função no trato gástrico é estimular as células parietais a secretar HCl (Baggio *et al.*, 2003).

A secreção de ácido acumulada e o papel da pepsina são bem documentados na indução de úlceras gástricas induzidas pela ligadura do piloro. O estudo realizado por Rastogi *et al.*, (1998), indica alterações nos níveis de antioxidantes na presença de úlceras induzidas por ligadura do piloro. O jejum associado à predisposição dos animais para úlceras leva a uma redução dos níveis de antioxidantes no tecido gástrico, e essa redução causa uma elevação da acidez e da atividade péptica no suco gástrico (Rastogi *et al.*, 1998). Alterações na secreção ácido-gástrica têm potencial ulcerogênico, mas somente essas alterações são consideradas insuficientes para causar ulcerações, sugerindo o envolvimento de outros

fatores, como é o caso da presença dos radicais livres, diminuição da secreção de muco, dentre outros fatores (Rastogi *et al.*, 1998).

Neste modelo experimental, o pré-tratamento com o extrato MeOH de *V. tucanorum*, pela via intra-duodenal, logo após a ligadura do piloro, promoveu uma diminuição da concentração de íons H⁺ e uma diminuição do I.L.U. ($4,62 \pm 2,97$), com 49% de proteção, se comparado com os animais tratados com veículo ($9,00 \pm 5,01$), entretanto não ocorreram alterações no volume e no pH gástrico, como é demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8: Efeito do extrato Metanólico de *V. tucanorum* no modelo de Ligadura de Piloro com administração do extrato por via Intraduodenal.

TRATAMENTO (P.O.)	DOSE (mg/Kg)	N	[H ⁺] mEq/ml/4h	I.L.U.	pH	VOL.GÁSTRICO (g)
VEÍCULO	- - - - -	8	$9,49 \pm 1,79$	$9,00 \pm 5,01$	$2,87 \pm 0,35$	$1,20 \pm 0,41$
CIMETIDINA	100	8	$5,62 \pm 2,18^{**}$	$3,37 \pm 2,33^*$	$5,0 \pm 1,77^{**}$	$1,00 \pm 0,44$
<i>V. tucanorum</i>	250	8	$6,44 \pm 3,04^*$	$4,62 \pm 2,97^*$	$3,63 \pm 1,41$	$1,39 \pm 0,41$

Os dados são expressos pela média \pm d.p. seguido pela ANOVA e do teste Dunnett,* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Neste mesmo modelo, porém com administração do extrato metanólico pela via oral (30 minutos antes da ligadura do piloro) não produziu nenhum resultado significativo em relação a proteção frente a lesões ulcerogênicas e alterações nos parâmetros do suco gástrico (pH, volume e concentração de H⁺), comparado com o veículo, como é demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9: Efeito do extrato Metanólico de *V. tucanorum* no modelo de Ligadura de Píloro com administração do extrato por via oral.

TRATAMENTO (P.O.)	DOSE (mg/Kg)	N	[H ⁺] mEq/ml/4h	I.L.U.	pH	VOL.GÁSTRICO (g)
VEÍCULO	- - - -	8	9,13 ± 1,74	16,50 ± 7,35	2,62 ± 0,74	0,85 ± 0,23
CIMETIDINA	100	8	4,80 ± 2,98**	7,44 ± 6,02*	4,67 ± 1,94*	0,86 ± 0,28
<i>V. tucanorum</i>	250	8	7,71 ± 2,92	9,56 ± 5,57	3,11 ± 1,27	0,93 ± 0,38

Os dados são expressos pela média ± d.p. seguido pela ANOVA e do teste Dunnett,* p< 0,05 e ** p<0,01.

Comparando os efeitos do tratamento oral e intra-duodenal, pode-se concluir que o extrato metanólico de *V. tucanorum* exerce ação sistêmica e provavelmente seu mecanismo está relacionado com a atividade antissecretória, já observada no modelo de indução de úlceras por piroxicam, pela diminuição da concentração hidrogeniônica do suco gástrico, e o mecanismo gastroprotetor pode estar envolvido com o impedimento da formação e/ou atuação de radicais livres.

A constatação da atividade antiulcerogênica do extrato MeOH no controle das lesões gástricas nos modelos anteriormente descritos, levou a realização de experimentos que possibilitassem identificar possíveis mecanismos de ação. Foram executados experimentos que visavam verificar o envolvimento de grupamentos Sulfrídilas e de Óxido Nítrico na gastroproteção.

É sabido que as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), especialmente o ânion superóxido (O₂⁻) e o radical hidroxila (OH[·]), têm um importante papel na patogenia nas lesões gástricas experimentais agudas induzidas por etanol, ligadura do píloro e por drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) (Rastogi *et al.*, 1998; Valcheva-Kuzmanova *et al.*, 2005). Os EROs induzem peroxidação lipídica o que acredita-se ser uma importante causa

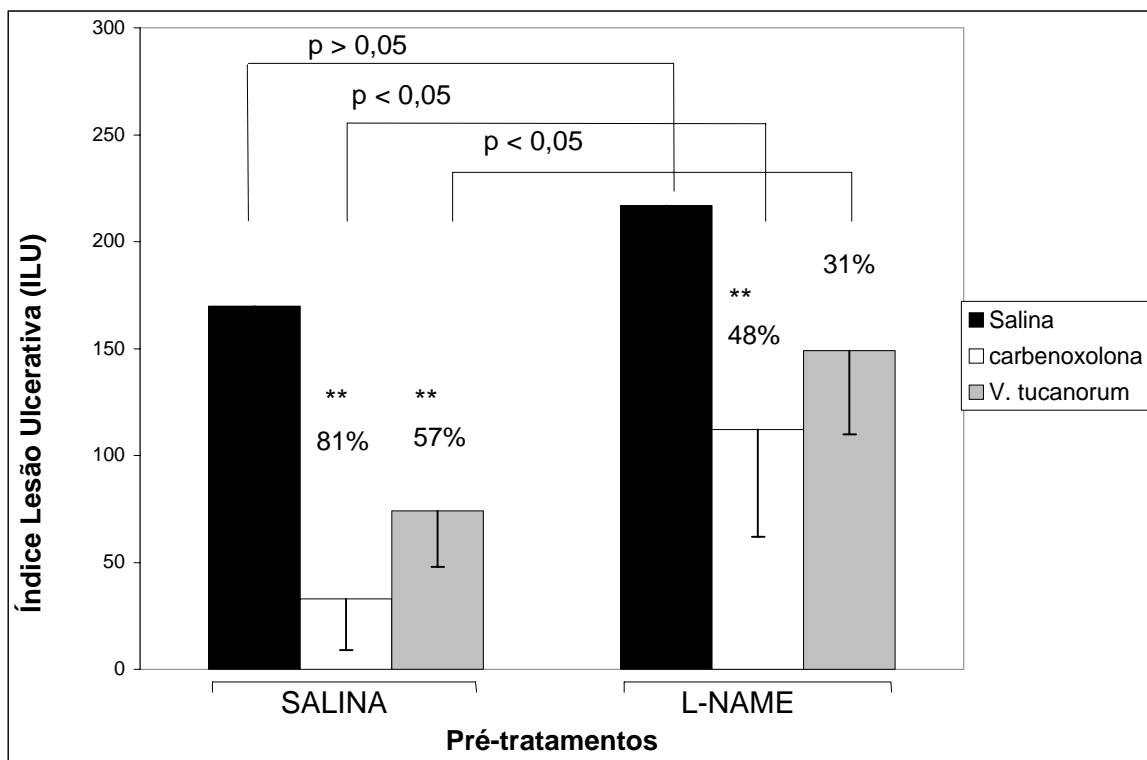
da destruição e dos danos nas membranas celulares (Valcheva-Kuzmanova *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Khattab *et al.*, 2001, demonstrou a importância do NO (óxido nítrico) na proteção de úlceras gástricas induzidas por DAINEs, através do pré-tratamento com precursor de NO, L-arginina. Além do papel do NO na manutenção da circulação sanguínea, ele protege os danos causados por DAINEs, através da promoção da síntese de prostaglandinas (Matsuda *et al.*, 1999; Khattab *et al.*, 2001).

O Óxido Nítrico (NO) está envolvido no mecanismo de manutenção da integridade do epitélio gástrico. De acordo com Cho, (2001), o NO, no trato intestinal, pode exercer efeito protetor e deletério (promover peroxidação lipídica, quando combinado com espécie reativa de oxigênio), isso depende do tipo de Oxido Nítrico Sintetase (NOS) envolvida. NOS Constitutiva (cNOS) é responsável pela produção de NO no contexto fisiológico, já a NOS induzível (iNOS) produz NO em circunstâncias patofisiológicas (Cho, 2001). NO está envolvido com a regulação da circulação sanguínea gástrica (promove a diferenciação das células endotéliais nos tubos vasculares) e estimulação direta da secreção gástrica de muco pela estimulação da guanilato ciclase nas células epiteliais (Cho, 2001). Um bloqueio na produção de NO resulta em um enfraquecimento da resposta vascular e subsequente fluxo alcalino no lúmen (Cho, 2001). No experimento em que foi avaliado o papel de NO no mecanismo de proteção do extrato, foi utilizado inibidor de NO, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), que acentuou as lesões na mucosa gástrica induzida pelo etanol (Aly, 1995).

Quando foi realizado pré-tratamento com veículo e tratamento com o extrato metanólico, ocorreu uma proteção expressiva ($p < 0,01$) de 57% de proteção, comparados aos animais tratados com veículo, fato este já comprovado na [Tabela 7](#) e [Figura 8](#). Entretanto, quando os animais foram submetidos ao pré-tratamento com L-NAME, inibidor de NO sintetase, as lesões gástricas intensificaram e não se observou mais o efeito gastroprotetor anteriormente observado nos animais pré-tratados com o extrato, quando comparado ao grupo tratado com veículo

(Figura 10). Segundo a análise estatística realizada entre os diferentes grupos que foram submetidos ao mesmo tratamento com o extrato, existe um aumento significativo das lesões gástricas induzidas pelo etanol nos animais em que a ação do NO foi suprimida pelo L-NAME, quando comparados aos animais pré-tratados com o veículo (Figura 9). Através deste modelo experimental podemos concluir, portanto, que existe forte participação do NO na ação gastroprotetora do extrato metanólico de *V. tucanorum*. Quando a síntese de NO é inibida, ocorre diminuição da perfusão sanguínea gástrica, diminuição da angiogênese nas margens da úlcera, diminuição na secreção de muco, aumento na secreção ácido-gástrica, além do aumento da peroxidação lipídica causada por atuação de EROs. Todos esses fatores podem estar envolvidos com a ação do extrato, que mostrou resultado gastroprotetor na indução de úlceras por etanol, e mostrou que este efeito foi abolido com o pré-tratamento com inibidor da NO-sintetase (L-NAME) (Cho,2001).

Figura 9: Efeito do extrato metanólico de *V. tucanorum* (250 mg/Kg) nas lesões gástricas induzidas por etanol, em ratos pré-tratados com L-NAME (inibidor da NO sintetase).



Resultados foram expressos em Média \pm d.p.. O teste de Dunnett mostra a diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle. O teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre os grupos de pré-tratamento: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Figura 10: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas induzidas por etanol e resultados frente L-NAME (inibidor da NO sintetase).

Extrato metanólico de *Vochysia tucanorum*

SAL / SAL = pré-tratado com salina e tratado com salina

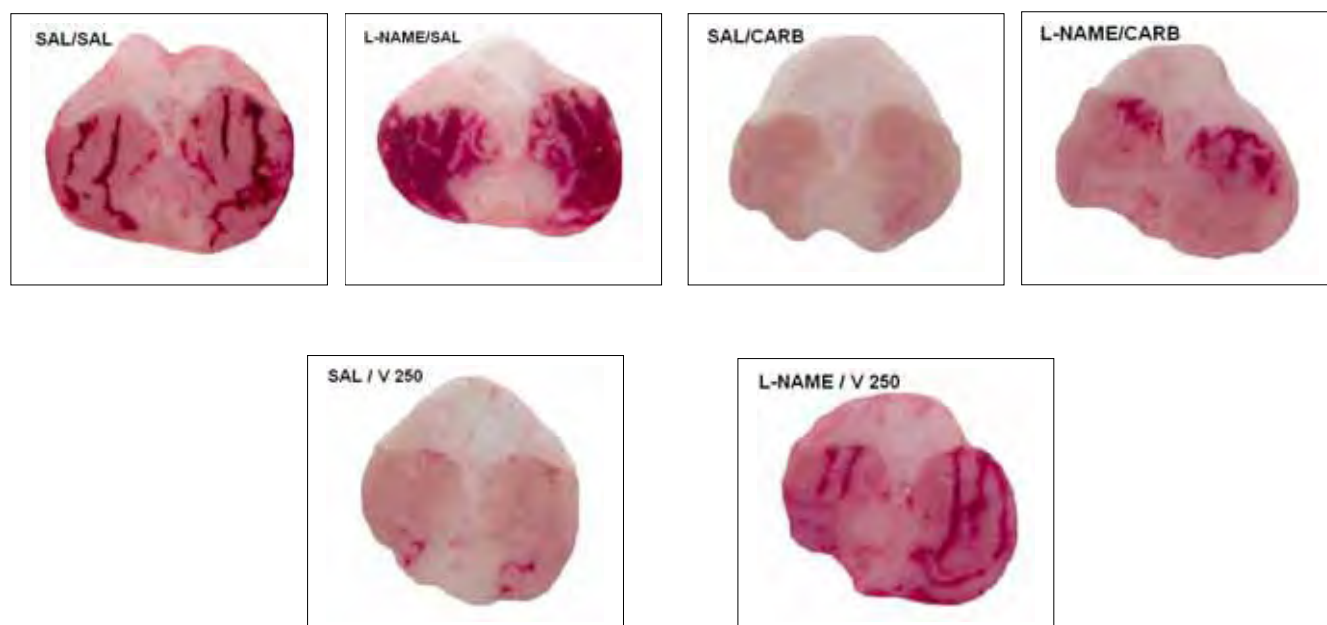
L-NAME / SAL = pré-tratado com L-NAME e tratado com salina

SAL / CARB. = pré-tratado com salina e tratado com carbenoxolona

L-NAME / CARB. = pré-tratado com L-NAME e tratado com carbenoxolona

SAL / V 250 = pré-tratado com salina e tratado com extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 250 mg/Kg.

L-NAME / V 250 = pré-tratado com L-NAME e tratado com extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 250 mg/Kg.



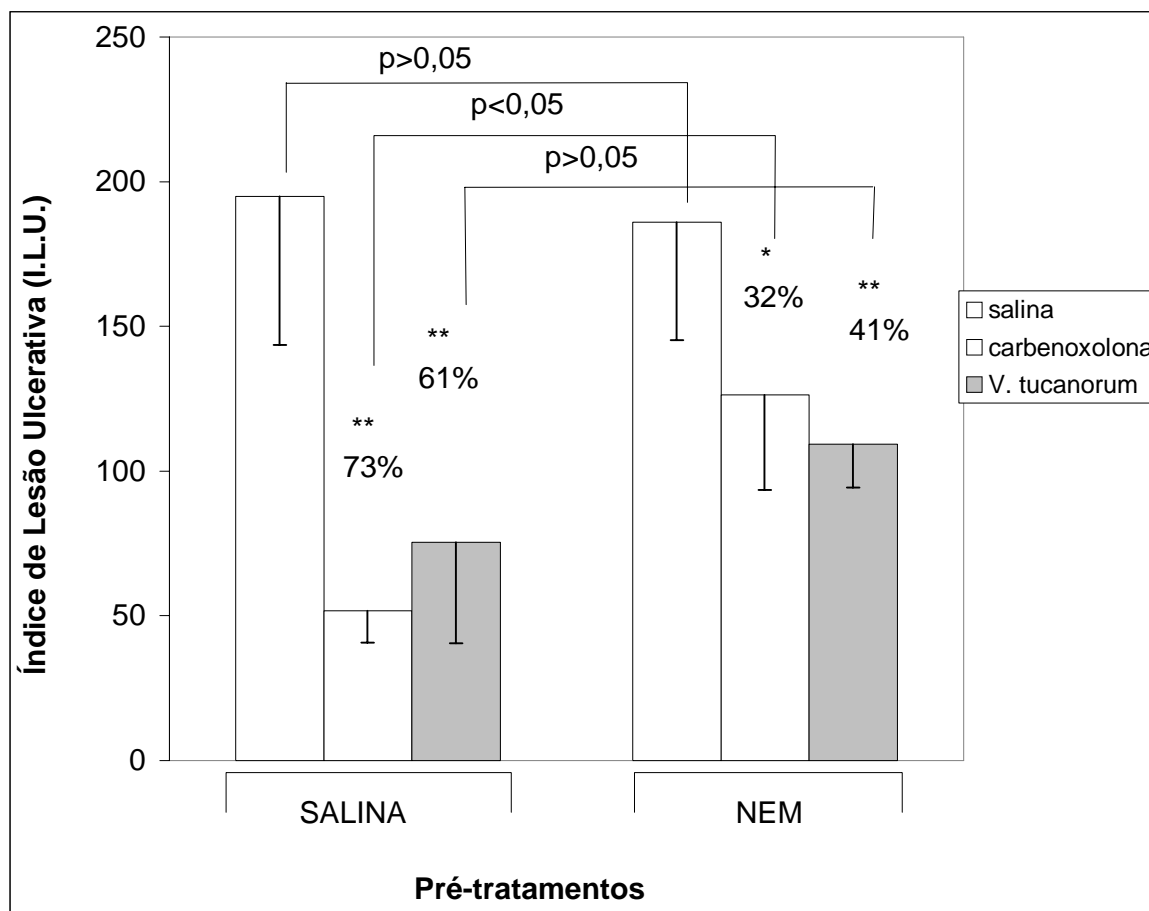
Os compostos sulfidrílicos (SH) participam da proteção da mucosa pela ligação a radicais-livres (antioxidante) e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco de maneira a impedir a sua dissociação (Avila *et al.*, 1996). Apesar de se conhecer o envolvimento dos compostos sulfidrílicos na proteção da mucosa em experimentos de indução de úlcera por etanol, os mecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos (Hiraishi *et al.*, 1999)

Os efeitos gastroprotetores dos compostos SH incluem também processos redutores e de proteção celular frente ao estresse oxidativo induzido por diversos agentes e circunstâncias, como ocorre com as exposições tóxicas como o próprio etanol na mucosa gástrica (Takeuchi *et al.*, 1988; Konturek *et al.*, 1990).

A administração intraperitoneal da droga NEM (bloqueador da formação do grupo sulfidrílica) antes dos tratamentos orais com salina, carbenoxolona e extrato provocou aumento das lesões gástricas induzidas por etanol: $186,00 \pm 40,66$; $126,40 \pm 32,86$; $109,33 \pm 14,87$, respectivamente, em comparação aos grupos pré-tratados com salina pela mesma via: $195,00 \pm 51,39$; $51,80 \pm 11,03$; $75,50 \pm 34,98$, respectivamente, porém esse aumento foi significativo somente para a carbenoxolona ($p < 0,05$). É possível verificar essa diferenciação de modo estatístico pelas barras transversais traçadas na [Figura 11](#), de maneira a comparar os pré-tratamentos com NEM e salina. Em ambos os tratamentos com o extrato é possível observar uma significativa proteção gástrica ($p < 0,01$) ao promover 61 % de redução das lesões gástricas no pré-tratamento com salina e de 41% nos animais pré-tratados com NEM, em relação aos seus respectivos grupos controles, porém ao avaliar os animais pré-tratados com salina e tratados com o extrato em comparação aos animais pré-tratados com NEM e tratados com o extrato, é possível constatar que não houve um aumento significativo ($p > 0,05$) na formação das lesões gástricas quando o bloqueador da formação do grupamento sulfidrílica foi

administrado, como é demonstrado na Figura 11. Estes resultados indicam, portanto, que o efeito gastroprotetor do extrato metanólico de *V. tucanorum* não tem participação dos grupamentos sulfidrilas no mecanismo de proteção frente a lesões gástricas.

Figura 11 - Efeito do extrato metanólico de *V. tucanorum* (250 mg/Kg) frente ao inibidor de sulfidril endógena (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol.



Resultados foram expressos em Média \pm d.p.. O teste de Dunnett mostra a diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle. O teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre os dois grupos de pré-tratamento: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Figura 12: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas induzidas por etanol e resultados frente inibidor de sulfidril endógena (NEM).

Extrato metanólico de *Vochysia tucanorum*

SAL / SAL = pré-tratado com salina e tratado com salina

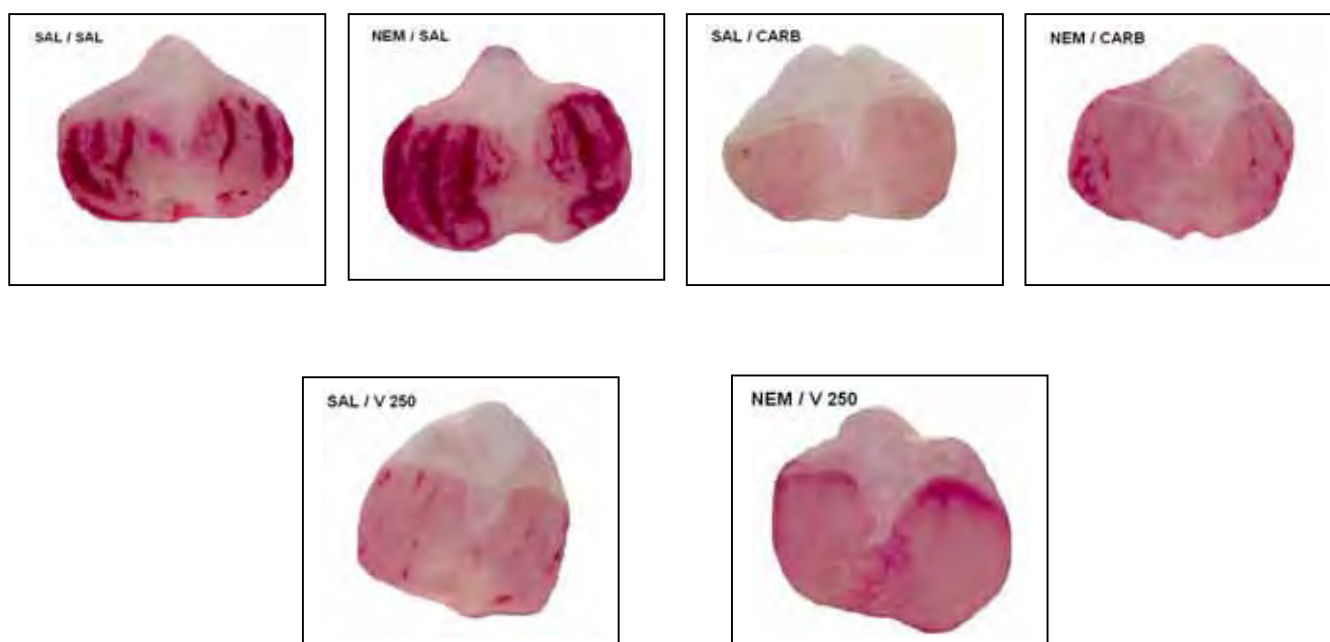
NEM / SAL = pré-tratado com NEM e tratado com salina

SAL / CARB. = pré-tratado com salina e tratado com carbenoxolona

NEM / CARB. = pré -tratado com NEM e tratado com carbenoxolona

SAL / V 250 = pré-tratado com salina e tratado com extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 250 mg/Kg.

NEM / V 250 = pré-tratado com NEM e tratado com extrato de *Vochysia tucanorum* na dose de 250 mg/Kg.



No intuito de tentar caracterizar a partição da fração do extrato metanólico de *V. tucanorum* que concentre os constituintes ativos responsáveis pela ação gastroprotetora da planta, a fração butanólica foi testada.

No modelo descrito por Morimoto *et al.*, 1991, de indução de lesões ulcerativas causadas por etanol absoluto, a fração butanólica apresentou proteção gástrica, nas doses de 150, 75 e 37,5 mg/Kg, com 61%, 69 e 65% de proteção respectivamente, em relação ao veículo, como é demonstrado na Tabela 10 e Figura 13. Não foram observadas diferenças estatísticas (teste de Tukey) entre os grupos tratados com as diferentes doses da fração, portanto, foi selecionada uma dose fixa de 37,5 mg/Kg, para realização dos demais modelos, visto tratar-se da dose mais efetiva. Considerando que a carbenoxolona é uma substância isolada e que na dose de 100 mg/Kg exerceu 96% de proteção frente as lesões gástricas induzidas por etanol, pode-se afirmar que a fração butanólica de *V. tucanorum* (37,5 mg/Kg) possui ação gastroprotetora mais potente do que a carbenoxolona (100 mg/Kg) em menor dose.

Tabela 10: Efeito de diferentes doses da fração butanólica de *V.tucanorum* sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, em ratos.

Tratamento P.O.	Dose mg/Kg	N	I.L.U.	pH	% proteção
Salina	-----	5	251,10 ± 50,60	4,90 ± 1,15	0
Carbenoxolona	100	5	10,60 ± 4,67**	4,00 ± 2,11	96
<i>V. tucanorum</i>	37,5	5	88,80 ± 57,56**	5,20 ± 1,81	65
<i>V. tucanorum</i>	75	5	78,20 ± 51,36**	6,00 ± 1,89	69
<i>V. tucanorum</i>	150	5	98,80 ± 36,04**	5,60 ± 1,38	61

Os dados são expressos pela média ± d.p. seguido pela ANOVA e do teste Dunnet, ** p<0,01.

Figura 13: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões gástricas por etanol absoluto.

Fração butanólica de *Vochysia tucanorum*

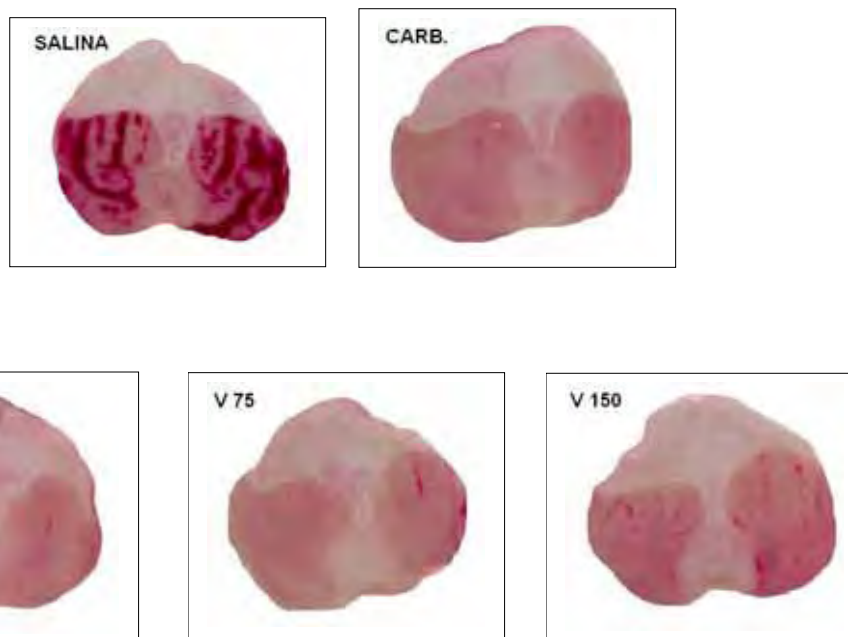
SALINA = controle negativo

CARB. = carbenoxolona = controle positivo

V 37,5 = fração butanólica de *Vochysia tucanorum* na dose de 37,5 mg/Kg

V 75 = fração butanólica de *Vochysia tucanorum* na dose de 75 mg/Kg

V 150 = fração butanólica de *Vochysia tucanorum* na dose de 150 mg/Kg

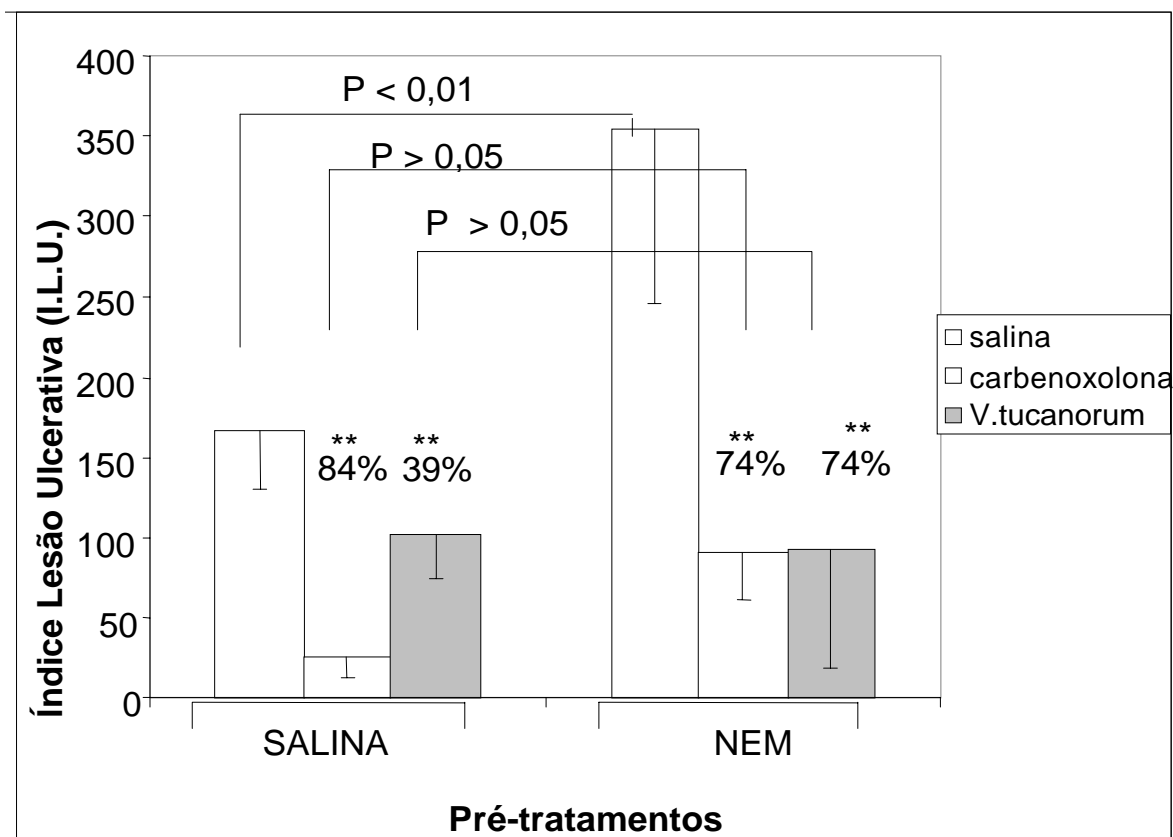


Os compostos sulfidrílicos participam da proteção da mucosa gástrica e os danos na mesma, induzidos por etanol, têm se mostrado associados com a diminuição da sulfidrilas endógenas, e o pré-tratamento com bloqueadores de sulfidrilas reverte a gastroproteção das substâncias que contêm sulfidrilas (Szabo, 1978). O modelo foi realizado para verificar se existe participação do grupamento sulfidrilas no mecanismo de gastroproteção da fração enriquecida, da planta.

A administração da droga NEM (bloqueador da formação do grupo sulfidrilas) antes do tratamento oral com a fração, não provocou aumento das lesões gástricas induzidas por etanol. A administração I.P. da droga NEM, antes do tratamento com a fração, gerou um I.L.U. de: $93,22 \pm 74,70$, e o pré-tratamento com salina pela mesma via, gerou um I.L.U. de $101,81 \pm 27,73$. É possível verificar essa diferenciação de modo estatístico pelas barras transversais traçadas na [Figura 14](#) e [Figura 15](#) de maneira a comparar os pré-tratamentos com NEM e salina. Porém, em ambos os tratamentos com as frações é possível observar uma significativa proteção gástrica ($p < 0.01$) ao promover 39% de redução das lesões gástricas no pré-tratamento com salina e de 74% nos animais pré-tratados com NEM, em relação aos seus respectivos grupos controles.

Estes resultados indicam, portanto, que o efeito gastroprotetor da fração butanólica da *V. tucanorum* tem insignificante participação dos grupamentos sulfidrilas no mecanismo de proteção frente a lesões gástricas, como já havia sido demonstrado na execução do mesmo modelo experimental com o extrato metanólico.

Figura 14: Efeito da fração butanólica de *V. tucanorum* na dose de 37,5 mg/Kg frente ao inibidor de sulfidril endógena (NEM) em modelo de úlcera induzida por etanol



Resultados foram expressos em Média \pm dp. O teste de Dunnett mostra diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle. O teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre os grupos de pré-tratamento: ** $p < 0,01$.

Figura 15: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões de lesões gástricas induzidas por etanol e resultados frente inibidor de sulfidril endógena (NEM).

Fração butanólica de *Vochysia tucanorum*

SAL / SAL = pré-tratado com salina e tratado com salina

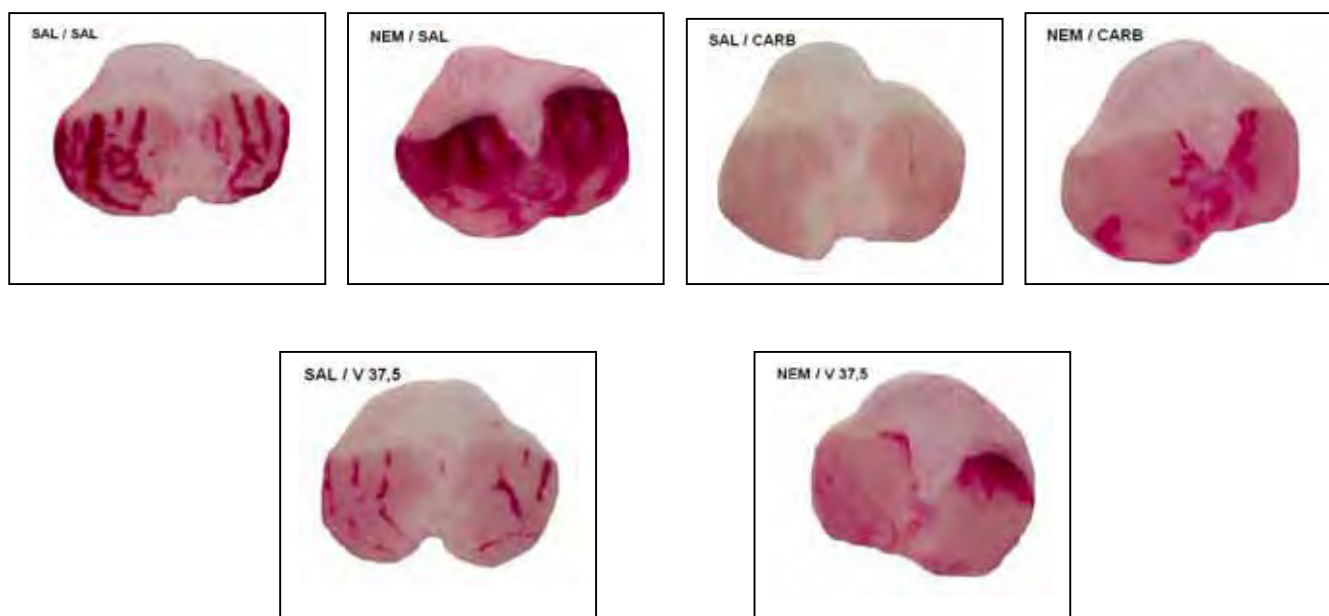
NEM / SAL = pré-tratado com NEM e tratado com salina

SAL / CARB. = pré-tratado com salina e tratado com carbenoxolona

NEM / CARB. = pré-tratado com NEM e tratado com carbenoxolona

SAL / V 37,5 = pré-tratado com salina e tratado com fração butanólica de *Vochysia tucanorum* na dose de 37,5 mg/Kg.

NEM / V 37,5 = pré-tratado com NEM e tratado com fração butanólica de *Vochysia tucanorum* na dose de 37,5 mg/Kg.

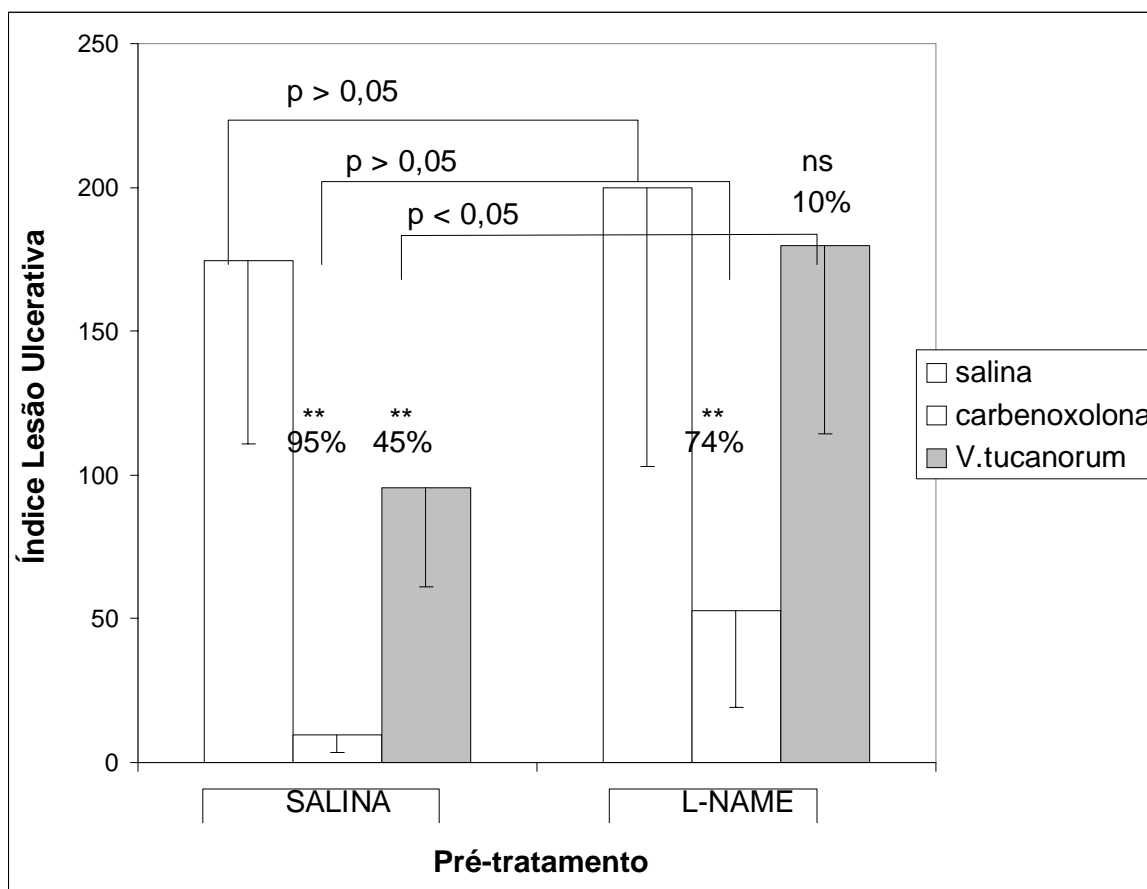


O óxido nítrico participa dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica, por regular a circulação sanguínea e a secreção de muco da mesma. (Arrieta *et al.*, 2003).

Considerando que o extrato de *V. tucanorum* apresentou fortes evidências da participação dos NO na gastroproteção, avaliou-se se a fração metanólica manteria esta ação.

A administração prévia de L-NAME acentuou as lesões na mucosa gástrica induzida pelo etanol. Quando foi realizado pré-tratamento com veículo e tratamento com a fração, ocorreu uma proteção expressiva ($p < 0,01$) de 45%, comparados aos animais tratados com veículo. Entretanto, quando os animais foram submetidos ao pré-tratamento com L-NAME, as lesões gástricas intensificam e não ocorreu proteção frente a indução de lesões ulcerogênicas induzidas por etanol, no grupo tratado com a fração, comparando com o grupo tratado com veículo. Segundo a análise estatística adotada (teste de Tukey) a diferença entre os grupos tratados com a fração e pré-tratados com veículo e pré-tratados com L-NAME, é significativa ($p < 0,05$), como é demonstrado na [Figura 16](#) e [Figura 17](#). Através deste modelo é possível concluir que a fração butanólica agrupou os constituintes gastroprotetores do extrato metanólico e que a atuação do NO na gastroproteção foi preservada no fracionamento do extrato metanólico de *V. tucanorum*.

Figura 16: Efeito da fração butanólica de *V. tucanorum* na dose de 37,5 mg/Kg nas lesões gástricas induzidas por etanol, em ratos pré-tratados com L-NAME (inibidor da NO sintetase).



Resultados foram expressos em Média \pm dp. O teste de Dunnett mostra diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle. O teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre os grupos de pré-tratamento: ** $p < 0,01$.

Figura 17: Imagem dos estômagos do experimento de indução de lesões de lesões gástricas induzidas por etanol e resultados frente L-NAME (inibidor da NO sintetase).

Fração butanólica de *Vochysia tucanorum*

SAL / SAL = pré-tratado com salina e tratado com salina

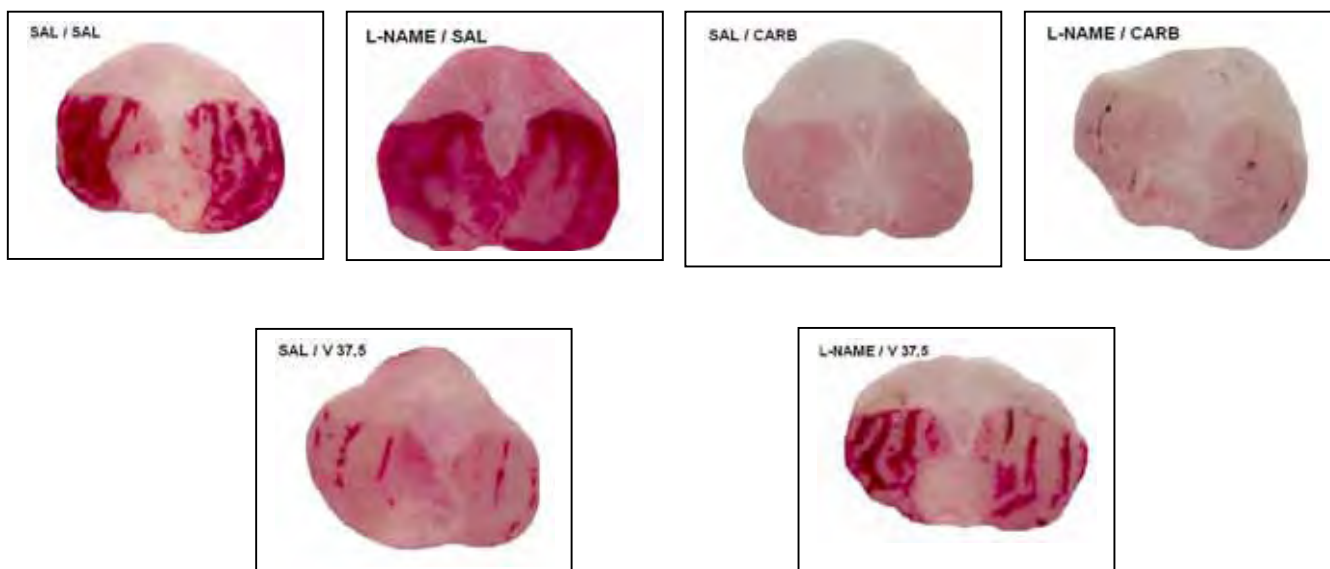
L-NAME / SAL = pré-tratado com L-NAME e tratado com salina

SAL / CARB. = pré-tratado com salina e tratado com carbenoxolona

L-NAME / CARB. = pré-tratado com L-NAME e tratado com carbenoxolona

SAL / V 37,5 = pré-tratado com salina e tratado com fração butanólica de *Vochysia tucanorum* na dose de 37,5 mg/Kg.

L-NAME / V 37,5 = pré-tratado com L-NAME e tratado com fração butanólica de *Vochysia tucanorum* na dose de 37,5 mg/Kg.



Diversos triterpenos, incluindo a carbenoxolona, possuem conhecida e consagrada atividade antiulcerogênica (Lewis, 1991; Arrieta *et al.*, 2003).

O extrato metanólico bruto e a fração enriquecida de triterpenos da *Amphipterygium adstringens* apresentaram efeito gastroprotetor; o ácido 3-epi-oleanólico, isolado desta fração, mostrou na mesma dose empregada de carbenoxolona (30 mg/Kg), semelhante efeito gastroprotetor (Arrieta *et al.*, 2003).

Farina *et al.*, 1998, descreveram em seu trabalho a síntese e a atividade antiulcerogênica de novos derivados dos ácidos glicirretico, oleanólico e ursólico (triterpenos pentacíclicos). Duas substâncias derivadas do uvaol, mostraram atividade antiulcerogênica até 25 vezes superior á atividade da carbenoxolona e nenhum desses dois compostos afetou a diurese, enquanto a carbenoxolona causou uma significativa redução na excreção de sódio como efeito colateral (Farina *et al.*, 1998).

A presença de 22% de uvaol e 0,75% de ácido betulínico na fração butanólica de *V. tucanorum* certamente contribuíram para a ação gastroprotetora da *V. tucanorum* considerando que ambos os constituintes já possuem atividade antiulcerogênica descrita na literatura.

VI. CONCLUSÃO

Frente aos resultados apresentados, pode-se concluir que o extrato metanólico e a fração butanólica de *V. tucanorum* apresentaram importante atividade gastroprotetora em diferentes modelos experimentais de indução de lesões gástricas, confirmando a relação quimiotaxonomica utilizada para a seleção da planta. Devido problemas na solubilização do extrato clorofórmico de *V. tucanorum*, o mesmo não apresentou resultados satisfatórios em ensaios iniciais que comprovassem a gastroproteção.

O extrato metanólico não apresentou efeito tóxico agudo.

O extrato metanólico apresentou ação sistêmica e a ação gastroprotetora é dependente do NO endógeno. O mecanismo de gastroproteção do extrato metanólico pode estar relacionado com atividade antioxidante, devido os resultados obtidos nos modelos experimentais que adotaram como agente idutor etanol absoluto, ligadura do piloro e no modelo que testou a participação do NO na gastroproteção.

Ensaio posteriores, realizados com a fração butanólica da *Vochysia tucanorum*, obtida do extrato metanólico desta planta, confirmaram a ação gastroprotetora já exercida pelo extrato. O mecanismo de proteção, da fração butanólica, mostrou ter participação expressiva do NO endógeno, e insignificante participação do grupamento sulfidril na gastroproteção da planta.

A presença dos ácidos betulínico e uvaol na fração butanólica de *V. tucanorum* podem ser os responsáveis pela atividade antiulcerogênica da espécie.

Anexo 1

Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental

Droga Via de administração

Dosemg/Kg; Volume da injeçãoml; Concentração da droga

Hora da injeção h min; Data .../.../.....

Animal; Sexo; Peso g; Tempo de jejum

Sintomas	Normal	Tempo e data					
Aparência geral	4						
Frênito vocal	0						
Irritabilidade	0						
Reposta ao toque	4						
Aperto da cauda	4						
Contorção	0						
Trem posterior	0						
Endireitamento	4						
Tônus muscular	4						
Força de agarrar	4						
Ataxia	0						
Reflexo auricular	4						
Reflexo corneal	4						
Tremores	0						
Convulsões	0						
Estimulações	4						
Straub	0						
Hipnose	0						
Anestesia	0						
Lacrimação	0						
Ptose	0						
Micção	4						
Piloereção	0						
Defecação	4						
Hipotermia	0						
Respiração	4						
Cianose	0						
Morte							

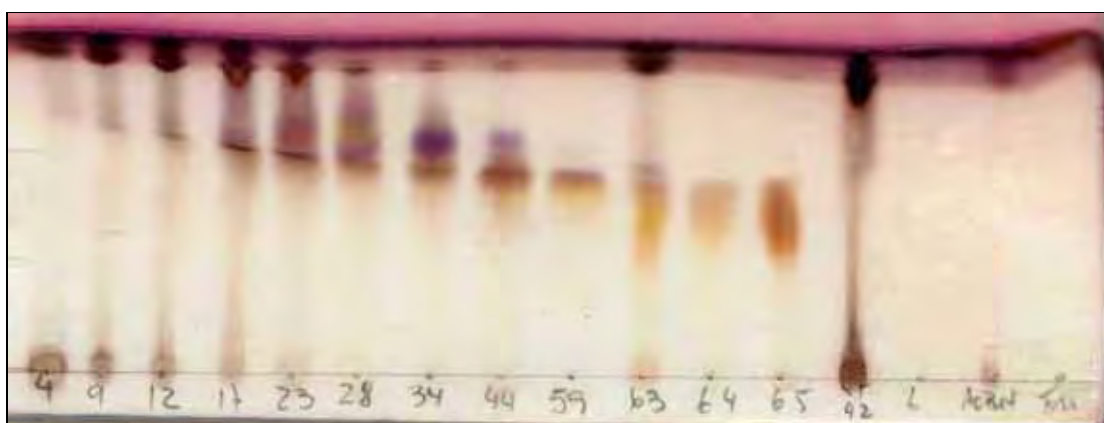
Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4

Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

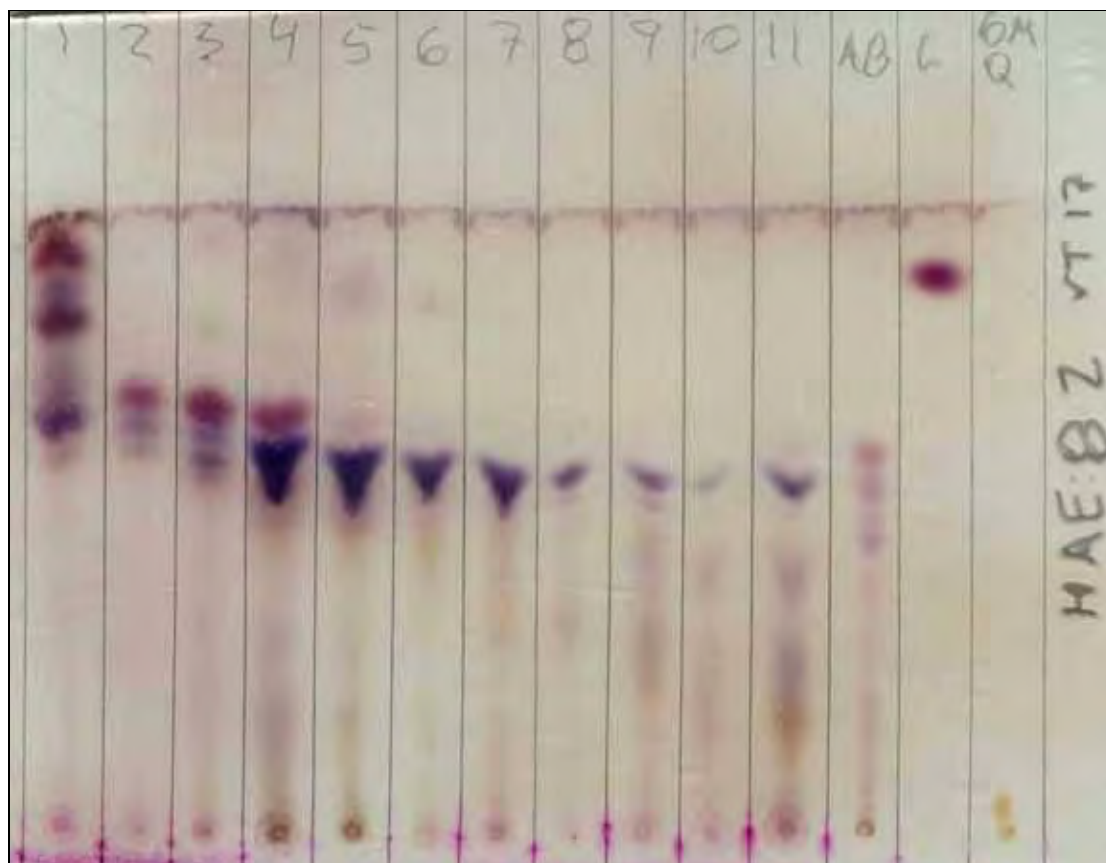
Anexo 2: Identificação de substâncias terpenoídicas na fração butanólica



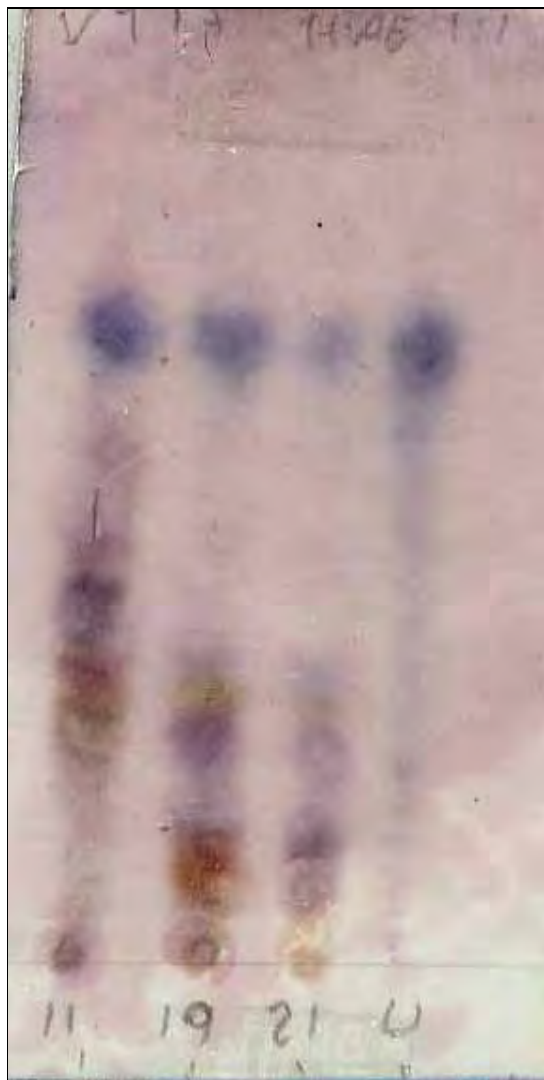
Anexo 3: frações reunidas do DCCC (solvente, FO)



Anexo 4: TLC COMPARATIVA DAS FRAÇÕES DE VT 17 DO DCCC, ONDE SE VÊ POR COMPARAÇÃO COM O PADRÃO A PRESENÇA DO ÁCIDO BETULÍNICO (MANCHAS ROSAS EM CIMA).



Anexo 5: TLC COMPARATIVA DAS FRAÇÕES DE VT 17 DO DCCC, MOSTRANDO A PRESENÇA DO UVAOL (MANCHA ROXA NO ALTO)



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akerele, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum*.14(4): 390-5, 1993.
- Allen, A.; Flemstrom, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288: 1-19, 2005.
- Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F.. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Embrapa, Planaltina, 40-42, 1998.
- Aly, A.T.M.M. The role of nitric oxide and sulfhydryls in gastric mucosal protection induced by sodium cromoglycate in rats. *J Pharm. Pharmacol.* 47: 739-743, 1995.
- Arrieta, J.; Benitez, J.; Flores, E.; Castilho, C.; Navarrete, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringens*; roles of prostaglandins, sulphidryls, nitric oxide and capsaicin neurons. *Planta Medica.* 69: 905-909, 2003.
- Avila, J.R.; Lastra, A.D.L.; Martín, M.J.; Motilva, V.; Luque, I.; Delgado, D.; Esteban, J.; Herrerias, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.*45: 83-88, 1996.
- Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Rieck, L.; Marques, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis ildica* DC in rats. *Pharmacological Research.* 47: 93-98, 2003.
- Beirith, A.; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B.; Hess, S.C.; Messana, I.; Ferrari, F.; Yunes, R.A. Study of antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated of the stem bark of *Ocotea suaveolens*. *Planta Medica.* 65: 50-55, 1999.
- Bortalanza, L. B.; Ferreira, J.; Hess, S.C.; Delle Monache F.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Anti-allodynic action of the tormentonic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.*. 453: 203-208, 2002.

- Brito, A.R.M.S. Manual De Ensaio Toxicológicos In Vivo. Ed. UnicampCampinas (Brazil), p.11-15, 1994.
- Brito, A. R. M. S. How do study the pharmacology of medicianl plants in underdeveloped countries. J. Ethnopharmacology. 54: 131-138, 1996.
- Brunton, L.L.; Fármacos para o controle da acidez gástrica e tratamento de úlceras pépticas. *In*: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG editores. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9 ed. New York: McGraw-Hill, p. 663-674, 1996.
- Calixto, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz. J. Med.and Biol. Res. 33: (2) 179-189, 2000.
- Chan, F.K.L. Peptic-ulcer disease. Lancet. 360: 933-941, 2002
- Champe, P.C.; Harvey, R.A.; Mycek, M.J. Farmacologia Ilustrada. 2 ed. Porto Alegre: Ed. Artes Médicas, 1998.
- Cho, C.H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. Journal of Physiology. 95: 253-256, 2001.
- Cragg, G.M.; Newman, D. J. Snader KM. Natural products in drug discovery and development. Journal of Natural Products. 60: 52-60, 1997.
- Davies, A.; Blakeley, A. G. H.; Kidd, C. Fisiologia humana – Porto Alegre: Ed. Artmed, p. 821-827, 2002.
- De Souza, C.P.; De Azevedo, M.L.; Lopes, J.L.; Sarti, S.J.; Dos Santos Filho, D.; Lopes, J.N.; Vichnewski, W.; Nasi, A.M.; Leitão Filho, H.F. Chemoprophylaxis of schistosomiasis: molluscacidal activity of natural products-assays with adult snails and oviposition. An. Acad. Bras. Cienc. 56: 333-8, 1984.
- Di Stasi, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência.São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista,p.131-136, 1996.

- Di Stasi, L. C. An integrated approach to identification and consevation of medicinal plants in the tropical forest - a Brazilian experience. *Plant Genetic Resources*. 3: 199-205, 2005.
- Elisabetsky, E.; Moraes, J. A. R. *Etnopharmacology: a technological development strategy*. First International Congress of Ethnobiology. 2:111-118, 1988.
- Farina, C.; Pinza, M.; Pifferi, G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *IL Farmaco*. 53:22-32, 1998.
- Guyton, A.C.; Hall, J. E. *Tratado de fisiologia médica*, 10^o edição – Ed. Guanabara Koogan, p. 670-676, 2002
- Halter, F.; Schmassmann, A.; Peskar, B. M. Review: Cyclooxygenase 2 – implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut*. 49: 443-453, 2001.
- Hess, S.C.; Brum, R.L.; Honda, N.K.; Cruz, A.B.; Moretto, E.; Cruz, R.B.; Messana, I.; Ferrari, F.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 47: 97-100, 1995.
- Hess, S. C. and Delle Monache, F. Divergioic acid, a triterpene from *Vochysia divergens*. *J. Braz. Chem. Soc*, v.10, n. 2, p. 104-106, 1999.
- Hiraishi, H.; Shimada, T.; Ivey, K. J.; Terano, A. Role of Antioxidant Defenses Against Ethanol-Induced Damage in Cultured Rat Gastric Epithelial Cells¹. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 289:103–109, 1999.
- Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.; Andrade, F.D.; Vilegas, W. *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae):evaluation of the gastroprotective activity of a Brazilian Cerrado medicinal plant. *Revista de Fitoterapia, Barcelona*. 2(1): 292-292, 2002.
- Hiruma-Lima, C. A.; Santos, L. C.; Kushima, H.; Pellizzon, C. H.; Silveira, G. G.; Vasconcelos, P. C.; Vilegas, W.; Brito, A. R. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. *J. Ethnopharmacol*. 104: 207-214, 2006.

- Jamal, A.; Javed, K.; Aslam, M.; Jafri, M. A. Gastroprotective effect of cardamom, *Elettaria cardamomum* Maton. fruits in rats. *J. Ethnopharmacol.* 103:149-153, 2006.
- Kaplan, M. A. C.; Gottlieb, O. R. Busca racional de princípios ativos em plantas. 5(1): 26-29, 1996.
- Khattab, M. M.; Gad, M. Z.; Abdallah, D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion, *Pharmacological Research*, 43: 463-467, 2001.
- Khennouf, S.; Benabdallah H.; Gharzouli, K. Effect of Tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* Leaves on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1469-1473, 2003.
- Konturek, P.K.; Brzowski T.; Konturek S. J.; Dembinski, A. Role of epidermal growth factor, prostaglandin and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. *Gastroenterol.* 99: 1607-1615, 1990.
- Konturek, S. J.; Konturek, P.C.; Brzozowski, T. Prostaglandins and ulcer healing. Review articles. *Journal of physiology and pharmacology*, 56: 5-31, 2005.
- Lewis, D.; Hanson, P. J. Anti-ulcer drugs of plant origin. *Progress in Medicinal Chemistry.* 28: 201-31, 1991.
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras. Ed. Plantarum. Odessa.S.P. p. 351, 1992.
- Mahato, S.B.; Kundu, A. P. ¹³CNMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochem.* (37): 1517-1575, 1994.
- 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 Sciences, Pharmacol. Letters.* 65: 27-32, 1999.

- Mayworm, M. A.S.; Buckeridge, M.S.; Salatino, A. Monomer composition of polysaccharides of seed cell walls and the taxonomy of the Vochysiaceae. *Phytochemistry*. 55: 581-587, 2000.
- Mincis, M.; Chebili, J. M. F.; Khouri, S. T.; Mincis, R. Etanol e o trato gastrointestinal. *Arg gastroenterol*. 32: 131-139, 1995.
- Mizui, T.; Douteuchi, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Jap. J. Pharmacol*. 33: 934-945, 1983.
- 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. *Japan. J. of Pharmacology*. 57: 495-505, 1991.
- Peterson, W. L. The role of acid in upper gastrointestinal haemorrhage due to ulcer and stress-related mucosal damage. *Aliment Pharmacol Ther*. 9 (1): 43-46, 1995.
- Phillipson, J. D. 50 Years of Medicinal Plant Research – Every Progress in Methodology is a Progress in Science. *Planta Med* 69: 491-495, 2003.
- Puscas, I.; Puscas, C.; Pasca, R. A comparative study os safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung* 47: 568-572, 1997.
- Rastogi, L.; Patnaik, G. K.; Dikshit, M. Free radical and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacological Research*. 38: 125-132, 1998.
- Roberts, II L. J.; Morrow, J.D. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. *In*: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG editores. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10 ed. New York: McGraw-Hill, p. 687-731, 2001.

- Salas, C. Fundamentos fisiopatológicos para el tratamiento de la úlcera péptica. Gen. Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología. 44(2): 180-190, 1990.
- Seager, J.M.; Hawkey, C.J. Indigestion and non-steroidal anti-inflammatory drugs. BMJ. 323: 1236-39, 2001.
- Shay, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. Gastroenterol., 5: 43-61, 1945.
- Suzuki, K.; Araki, H.; Komoike, Y.; Takeuchi, K. Permissive role of neutrophils in pathogenesis indomethacin-induced gastric lesions in rats. Med. Sci. Monit. 6(5): 908-914, 2000.
- Szelenyi, I.; Thiemer, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. Arch. Toxicol. 41: 99, 1978.
- Szabo, S. Duodenal ulcer disease. Animal model: cysteamine-induced acute and chronic duodenal ulcer in the rat. Is J Pathol.93(1): 273-276, 1978.
- Takeuchi, K.; Megumu, O.; Hiromichi M.; Okabe, S. Role of suphydryls in mucosa injury caused by ethanol. Relation to microvascular permeability, gastric motility a cytoprotection. J Pharmacol. Exp. Ther. 48: 836-839, 1988.
- Taylor, D. N.; Blaser, M. J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Epidemiol. Rev. 13: 42-59, 1991.
- Taylor, J. L. S.; Rabe, T.; McGraw, L. J.; Jager, A. K.; Staden, J. Towards the scientific validation of tradicional medicinal plants. Plant Growth Regulation, 34: 23-27, 2001.
- Valcheva-Kuzmanova, S.; Marazova, K.; Krasnaliev, I.; Galunska, B.; Borisova, P.; Belcheva, A. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. Experimental and Toxicologic Pathology, 41: 1-8, 2005.
- Wallace, J. L. Recent advances in gastric ulcer therapeutics. Current Opinion in Pharmacology. 5: 573-577, 2005.

Wirth, H. P. Gastroduodenal ulcer disease: update on pathogenesis. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 84(19): 570-580, 1995.

Yuan, Y.; Padol, I. T.; Hunt, R. H. Peptic ulcer disease today. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology.* 3: 80-89, 2006.

Zucaro, Y.L. 6 β -Hydroxymaslinic Acid, a Triterpene from *Vochysia ferruginea*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 11, n. 3, p. 241-244, 2000.