UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Farmacologia e fitoquímica dos extratos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera

Leandro Santoro Hernandes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Titular Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2010

Leandro Santoro Hernandes

Farmacologia e fitoquímica dos extratos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Elfriede Marianne Bacchi
orientadora/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico este trabalho a minha família,
amigos e todos que colaboraram
para sua realização.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Elfriede Marianne Bacchi, por todos os ensinamentos, atenção, paciência, dedicação, amizade e contribuição na minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Doutores Edna Tomiko Myiake Kato, Dominique Hermine Fischer e Paulo Chanel Deodato de Freitas por todo apoio prestado, pela atenção e amizade.

Aos Professores Doutores Wilson Miguel Salvagnini, Silvia Berlanga de Moraes Barros, Nádia Araci Bou Chacra, Kiyoshi Iriya, Thomas Prates Ong, Maria Lúcia Zaidan Dagli, Massayoshi Yoshida, Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno, Ivana Barbosa Suffredini e Lígia Ferreira Gomes por toda a ajuda, tempo e atenção dedicados à realização deste trabalho. Agradeço a todos os seus alunos que também colaboraram.

Um agradecimento especial à ajuda da Doutora Ingrit Elida Collantes Díaz, sem a qual esse trabalho não seria possível.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacognosia; Carol, Fabiana, Josseara, Larissa, Elisângela, Marise, Carlos, Marc, Peky, Tiago, Brunno, Felipe, Anna, Brunna, Alberto, Jocimar, Flávia, Débora, André Wasicky, pela ajuda e por compartilhar momentos bons e difíceis.

A todos os funcionários do laboratório e da secretaria do Departamento de Farmácia, em especial ao Roberto de Jesus Honório por toda ajuda e serviços prestados.

Aos meus pais, avós e toda minha família. Por simplesmente auxiliarem em tudo o que foi possível e impossível.

Aos amigos que moraram comigo nos últimos anos; André, Mit, Giga, Felipe, Cláudia, Diogo e mesmo os que não gostariam de ser citados.

Agradeço também aos que não moraram; Ju, Ricardo, Fla e Gabi pela amizade e bons momentos.

A todo o pessoal do time de vôlei da Farma, pelos bons momentos e por distrair e renovar meus pensamentos.

Aos bixos de 2010, em especial ao Bruno, Caio, João, Kenji e Leo, pelas conversas, companhia e atenção. Sem vocês seria muito mais difícil terminar esse trabalho.

Sou igualmente agradecido a todos que colaboraram de alguma forma para a realização desse trabalho. Perdoem-me se não citei algum nome.

Farmacologia e fitoquímica dos extratos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera

RESUMO

Este trabalho aborda a espécie *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae), conhecida popularmente como pariparoba. Nos últimos anos foram atribuídas diversas atividades a essa espécie, entre elas uma potente atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e ainda inibição *in vitro* do crescimento de *Helicobacter pylori*. Tais estudos tornam interessante a investigação da atividade antiúlcera e dos principais grupos de compostos que possam ser relacionados à esta ação, sendo estes os principais objetivos do trabalho. Para cumprir os objetivos propostos, foram utilizados diferentes modelos de ulceração gástrica em animais. Em modelo de indução por etanol acidificado, extratos brutos de folhas e raízes não inibiram significativamente a formação de lesões, porém frações do extrato de raízes conseguiram desempenho semelhante ao do lansoprazol. Em modelo de ligadura do piloro e indução por indometacina o extrato bruto de raízes (EB) não mostrou diferença em relação ao controle negativo. Em modelo de indução por ácido acético, o EB reduziu o tamanho, a presença de necrose e infiltrado inflamatório nas lesões. Com os resultados obtidos, é proposto que sua atividade esteja relacionada à capacidade antioxidante já relatada na literatura. Através de análise e separação por CLAE, foram identificadas três moléculas na fração mais ativa em relação à ação antiúlcera. Duas delas (piperumbellactamas A e B) já haviam sido descritas nessa espécie, porém nas partes aéreas. A terceira (caldensina) havia sido isolada de *Piper caldense*, e não foram encontrados na literatura relatos de sua ocorrência em *P. umbellata*. Para melhorar a solubilidade do extrato em água, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas, que associou as substâncias mais apolares com sua matriz polimérica. Ao mesmo tempo, formou partículas de tamanho e índice de polidispersão adequados, indicando a viabilidade da formulação.

PALAVRAS-CHAVE: *Pothomorphe umbellata*. Antiúlcera. Úlcera gástrica. CLAE. Nanocápsulas.

Antiulcer directed phamacology and phytochemistry of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. extracts

ABSTRACT

This work is based on a research of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) extracts, popularly known as pariparoba. Through the past years, many activities have been attributed to this species, including strong antioxidant activity, anti-inflammatory effect and *in vitro* growth inhibition of *Helicobacter pylori.* On that account, the investigation of the antiulcer activity and the research for related chemical compounds was proposed, trying to establish a relationship between these compounds and the activity.

To accomplish the proposal, some distinct ulcer models (in rats) were used. The crude extracts from leaves and roots had no significant effect over mucosal damage when tested in acidified ethanol model. By contrast, some fractions from the roots extract showed similar performance when compared to lansoprazole. Also, the crude extract from roots (CE) was not different from water when tested in pylorus ligation and indomethacin induction models. When tested in acetic acid model, the CE significantly reduced the lesion area, the presence of necrosis and inflammatory infiltrate. With these results, a correlation between the antioxidant (previously reported) and antiulcer activities is suggested.

The chemical analysis was performed through high-performance liquid chromatography (HPLC) and three molecules were identified in the fraction which showed the stronger antiulcer activity. Two of them (piperumbellactam A and B) had been described in branches of this species. The third (caldensin) had been isolated from *Piper caldense*, and no record was found about its occurence in *P. umbellata*. In order to increase CE water solubility, a nanoparticles suspension was prepared. This formulation was able to associate the hydrophobic components to its polymeric matrix. At the same time, it exhibited adequate particle size and polydispersity index, indicating a viability of the formulation.

KEYWORDS: *Pothomorphe umbellata*. Antiulcer. Gastric ulcer. HPLC. Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Folhas e fragmentos de raízes de *P. umbellata*.....20

Figura 1.2. Regulação fisiológica da secreção gástrica.....34

Figura 1.3. Esquema da fisiopatologia da úlcera péptica.....35

Figura 1.4. Mecanismos e fatores envolvidos na lesão da mucosa gástrica induzida por anti-inflamatórios não esteroidais.....41

Figura 4.1. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com extrato de folhas de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado.....56

Figura 4.2. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com extrato de folhas de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado.....56

Figura 4.3. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado.....57

Figura 4.4. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado.....58

Figura 4.5. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com frações do extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado.....59

Figura 4.6. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com frações do extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado.....59

Figura 4.7. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por indometacina.....60

Figura 4.8. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por indometacina.....61

Figura 4.9. Gráficos representativos do Volume de Secreção Gástrica (VSG, em mL), pH da Secreção Gástrica e Acidez Total (AT, $[H^+]$ em $mol.L^{-1}$) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de ligadura do piloro.....62

Figura 4.10. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético.....63

Figura 4.11. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético.....64

Figura 4.12. Fotos das lâminas histológicas do grupo controle negativo do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético.....65

Figura 4.13. Fotos das lâminas histológicas do grupo 400mg/kg do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético.....66

Figura 4.14. Cromatograma da fração acetato de etila (1 mg/mL) obtida a partir do extrato de raízes de *P. umbellata*.....68

Figura 4.15. Cromatograma da fração 65-2 (1 mg/mL) obtida a partir do extrato de raízes de *P. umbellata*.....69

Figura 4.16. Espectros UV-Vis para os picos que apresentaram melhor separação no cromatograma da fração 65-2 do extrato de raízes de *P. umbellata*.....70

Figura 4.17. Cromatograma da fração 65-2 (50 mg/mL) obtida a partir do extrato de raízes de *P. umbellata*.....71

Figura 4.18. Estrutura da molécula presente na fração 2 do EB de *P. umbellata* e cromatograma correspondente.....72

Figura 4.19. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata*.....75

Figura 4.20. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellat*a.....75

Figura 4.21. Espectro de RMN DEPT (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata*.....76

Figura 4.22. Espectro de RMN COSY (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata*.....77

Figura 4.23. Espectro de RMN HSQC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata.*.....78

Figura 4.24. Espectro de RMN HMBC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata.*.....79

Figura 4.25. Estrutura da molécula presente na fração 6 do EB de *P. umbellata* e cromatograma correspondente.....80

Figura 4.26. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*.....83

Figura 4.27. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*.....83

Figura 4.28. Espectro de RMN DEPT (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata*.....84

Figura 4.29. Espectro de RMN COSY (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata*.....85

Figura 4.30. Espectro de RMN HSQC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata*.....86

Figura 4.31. Espectro de RMN HMBC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*.....87

Figura 4.32. Ampliação de regiões do espectro de RMN HMBC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata*.....88

Figura 4.33. Estrutura da molécula presente na fração 9 do EB de *P. umbellata* e cromatograma correspondente.....89

Figura 4.34. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 9 do EB de *P. umbellata*.....91

Figura 4.35. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 9 do EB de *P. umbellata*.....91

Figura 4.36. Espectro de RMN COSY (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 9 do EB de *P. umbellata*.....92

Figura 4.37. Gráfico referente a 3 medições da distribuição do diâmetro de partícula das nanocápsulas (unimodal) do extrato liofilizado de raízes *de P. umbellata*, utilizando método de espalhamento de luz dinâmica.....93

Figura 4.38. Cromatogramas referentes ao ultrafiltrado da suspensão de nanocápsulas do extrato liofilizado das raízes de *P. umbellat*a.....94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Resumo de moléculas isoladas de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. 21

Tabela 1.2. Resumo de atividades relatadas para *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. 30

Tabela 1.3. Exemplos de fármacos utilizados no tratamento de úlcera péptica, suas respectivas estruturas e classificação segundo mecanismo de ação. . 36

Tabela 1.4. Fatores envolvidos na lesão da mucosa gástrica induzida por etanol. 39

Tabela 1.5. Resumo de aristolactamas isoladas em espécies da família Piperaceae..... 43

Tabela 3.1. Composição das fases orgânica e aquosa para preparo de suspensão de nanocápsulas contendo extrato bruto de raízes de pariparoba. 52

Tabela 4.1. Rendimento dos diferentes extratos de *Pothomorphe umbellata* preparados..... 54

Tabela 4.2. Rendimento (em relação à massa de extrato bruto liofilizado empregada) das frações preparadas a partir do extrato de raízes de *Pothomorphe umbellata*..... 54

Tabela 4.3. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com extrato de folhas de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado 55

Tabela 4.4. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado 57

Tabela 4.5. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com frações do extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado..... 58

Tabela 4.6. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por indometacina..... 60

Tabela 4.7. Volume de Secreção Gástrica (VSG, em mL), pH da Secreção Gástrica e Acidez Total (AT, $[H^+]$ em $mol.L^{-1}$) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de ligadura do piloro..... 61

Tabela 4.8. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético 63

Tabela 4.9. Avaliação por escore da presença de necrose e infiltrado inflamatório no fundo da lesão ulcerativa (porção superficial, desprovida de mucosa) nas lâminas dos estômagos do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético 64

Tabela 4.10. Rendimentos das frações obtidas por cromatografia em coluna a partir da fração acetato de etila, em relação à massa de droga vegetal..... 67

Tabela 4.11. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (300 e 75 MHz) da fração 2 do EB de *P. umbellata*, em comparação aos obtidos por Tabopda (2008). 73

Tabela 4.12. Dados de RMN DEPT, COSY, HSQC e HMBC (300 e 75 MHz, DMSO-d_6) da fração 2 do EB de *P. umbellata* 74

Tabela 4.13. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (300 e 75 MHz) da fração 6 do EB de *P. umbellata*, em comparação aos obtidos por Tabopda (2008). 81

Tabela 4.14. Dados de RMN DEPT, COSY, HSQC e HMBC (300 e 75 MHz, DMSO-d_6) da fração 6 do EB de *P. umbellata* 82

Tabela 4.15. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (300 e 75 MHz) da fração 9 do EB de *P. umbellata*, em comparação aos obtidos por Rao (1990).....90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV: ultravioleta

4-NC: 4-nerolidilcatecol

CIM: concentração inibitória mínima

PLA_2: fosfolipase A_2

DPPH: radical difenilpicril-hidrazila

CL: quimiluminescência

MDA: malondialdeído

DL_{50}: dose letal para 50% dos animais

EGF: fator de crescimento epidermal (ou epidérmico, ou epitelial)

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

TGI: trato gastrintestinal

GSH: glutationa (forma reduzida)

ET-1: endotelina-1

EB / CE: extrato bruto liofilizado de raízes

ANOVA: análise de variância

PDA: arranjo de fotodiodos

TFA: ácido trifluoroacético

CLAE / HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

ACN: acetonitrila

MeOH: metanol

ATL: área total de lesão

ARL: área relativa de lesão

VSG: volume de secreção gástrica

AT: acidez total

UV-Vis: ultravioleta-visível

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

COSY: Correlation Spectroscopy

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence

s - singleto; d - dubleto; dd - duplo dubleto; td - triplo dubleto; m - multipleto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 19

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
   1.1. Pothomorphe umbellata (L.) Miq. 20
   1.2. Noções sobre fisiologia da secreção gástrica 33
   1.3. Úlceras pépticas 33
   1.4. Estratégias de tratamento 36
   1.5. Modelos para avaliação de atividade antiúlcera em animais 38
      1.5.1. Modelo de indução por etanol acidificado 38
      1.5.2. Modelo de indução por indometacina 40
      1.5.3. Modelo de ligadura do piloro 41
      1.5.4. Modelo de indução por ácido acético 42
   1.6. Aristolactamas na família Piperaceae 42

2. OBJETIVOS 46

3. MATERIAL E MÉTODOS 47
   3.1. Obtenção do material vegetal 47
   3.2. Preparo do extrato bruto liofilizado e frações 47
   3.3. Avaliação da atividade antiúlcera 48
      3.3.1. Animais 48
      3.3.2. Modelo de indução por etanol acidificado 48
      3.3.3. Modelo de indução por indometacina 49
      3.3.4. Modelo de ligadura do piloro 49
      3.3.5. Modelo de indução por ácido acético 50
      3.3.6. Forma de análise dos resultados 50
   3.4. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência 50
      3.4.1. Identificação das frações 52
   3.5. Preparação das nanocápsulas com extrato bruto liofilizado 52
   3.6. Caracterização física das suspensões de nanocápsulas com extrato bruto liofilizado 53
      3.6.1. Distribuição do tamanho de partícula 53

3.6.2. Determinação da taxa de associação do extrato bruto liofilizado às nanocápsulas, empregando cromatografia líquida de alta eficiência 53

4. RESULTADOS 54
4.1. Preparo do extrato bruto e frações 54
4.2. Avaliação da atividade antiúlcera 54
4.2.1. Modelo de indução por etanol acidificado 55
4.2.2. Modelo de indução por indometacina 60
4.2.3. Modelo de ligadura do piloro 61
4.2.4. Modelo de indução por ácido acético 62
4.3. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência 67
4.3.1. Identificação das frações 71
4.4. Caracterização física das suspensões de nanocápsulas com extrato bruto liofilizado das raízes de *P. umbellata* 93
4.4.1. Distribuição do tamanho de partícula 93
4.4.2. Determinação da taxa de associação às nanocápsulas do extrato bruto liofilizado das raízes de *P. umbellata*, empregando cromatografia líquida de alta eficiência 93

5. DISCUSSÃO 95

6. CONCLUSÃO 100

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101

INTRODUÇÃO

O uso popular de produtos naturais, principalmente os derivados de plantas medicinais, está entre as mais atrativas fontes de novos medicamentos, e têm mostrado resultados promissores no tratamento de úlcera gástrica. Estudos relacionados a prováveis mecanismos de ação sugerem que uma investigação fitoquímica detalhada, com identificação de frações, seguida de isolamento de princípios ativos pode resultar no desenvolvimento de moléculas promissoras (VYAWAHARE, 2009).

De acordo com Sung (2009), a incidência anual de úlcera péptica no mundo varia de 0,10 a 0,19%, e a prevalência, de 0,12 a 1,5%. Em 13 de setembro de 2009, segundo o *United States Census Bureau*, a população mundial era de aproximadamente 6,784 bilhões de pessoas. Isso significa que anualmente são diagnosticados entre 7 a 13 milhões novos casos de úlcera péptica, e que podem existir mais de 100 milhões de pessoas no mundo com essa enfermidade.

Diversos compostos de origem vegetal (flavonóides, saponinas, taninos, gomas e mucilagens) demonstram atividade antiúlcera quando experimentados em animais, porém poucos estudos clínicos foram realizados. Nessas classes de compostos citadas, observam-se substâncias de importância terapêutica particular que podem apresentar tanto atividade anti-inflamatória quanto antiúlcera, uma vantagem em relação aos anti-inflamatórios tradicionais que, em sua maioria, são ulcerogênicos (BORRELLI, 2000).

Nesse contexto surgiu a idéia de realizar o estudo da atividade antiúlcera de *P. umbellata*, já que a espécie tem o uso para essa finalidade relatado pela população (BALBACH, 1971). Através de trabalhos científicos, várias atividades relacionadas à ação antiúlcera foram atribuídas à pariparoba (seu nome popular), como a atividade antioxidante (AGBOR, 2007; BARROS,1996; DESMARCHELIER, 1997; TABOPDA, 2008), anti-inflamatória (PERAZZO,2005) e inibição *in vitro* do crescimento de *Helicobacter pylori* (ISOBE, 2002). Além disso, outros usos populares (que serão relatados adiante) tiveram também comprovação científica, o que torna mais curiosa a ausência de pesquisas sobre a atividade antiúlcera na literatura.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Pothomorphe umbellata (L.) Miq.

A pariparoba é conhecida popularmente também por capeba, caapeba, caapeba-do-norte, caá-peuá, catajé e malvarisco (DI STASI, 2002). Pertence à família Piperaceae e apresenta como sinônimos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.: *Piper umbellatum* L., *Lepianthes umbellata* (L.) Raf., *Heckeria umbellata* (L.) Kunth, *Lepianthes umbellata* (L.) Raf. ex Ramamoorthy, *Peperomia umbellata* (L.) Kunth (IPNI, 2009; TROPICOS.ORG, 2009).

Esta espécie vegetal tem a seguinte descrição macroscópica: possui porte arbustivo, quando adulta costuma medir de 1 a 1,5 m por 2,5 a 3,5 cm de diâmetro na base. O caule é anguloso e nodoso. As folhas têm pecíolo de inserção marginal, terminados em bainha alargada que envolve a região do nó; flores aclamídeas, hermafroditas reunidas em umbelas de espigas providas de dois estames e de gineceu séssil; raízes fasciculadas subcilíndricas providas de regiões de aspecto tuberculóide infladas e tortuosas (MORAES, 1983; 1986; PECKOLT, 1941; SILVA, 1926), conforme mostrado na Figura 1.1.

Figura 1.1. Folhas e fragmentos de raízes de *P. umbellata*.

Resumidamente, sua descrição microscópica consiste em: caule provido de dois círculos de feixes vasculares; presença de anel esclerenquimático no caule unindo a parte mais interna dos feixes vasculares que compõem o círculo mais externo; colênquima do tipo angular formando anel descontínuo; presença de canal mucilaginoso no caule; folhas com mesófilo heterogêneo e assimétrico providas de hipoderme relacionadas com ambas epidermes; tricomas tectores providos de cutícula estriada; presença de rafídeos e glândulas produtoras de

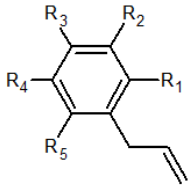
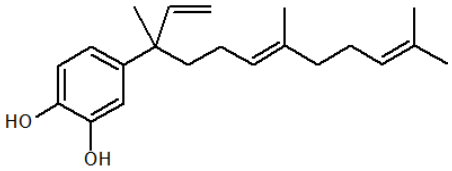
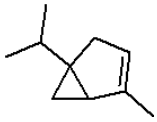
óleo-resina e de em todos os órgãos vegetativos e reprodutivos (MORAES, 1983). Raiz com súber pouco espesso, cilindro lenhoso dividido em feixes lenhosos cuneiformes, separados por raios medulares, que contém também glândulas óleo-resinosas (SILVA, 1926).

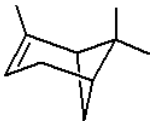
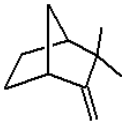
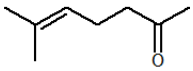
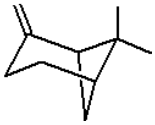
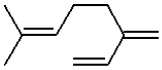
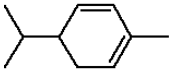
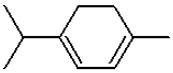
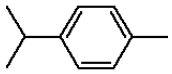
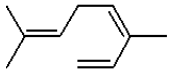
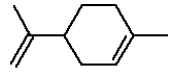
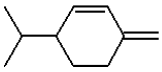
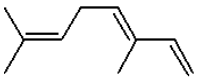
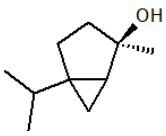
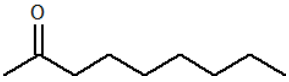
Do ponto de vista fitoquímico, a pariparoba foi mais estudada. Seu óleo essencial teve um maior detalhamento da composição química (BERNHARD, 1978; BRASIL E SILVA, 1972; MARTINS, 1998). Entre os outros grupos de compostos, foram isolados alguns alcalóides, flavonóides e esteróides (BALDOQUI, 2009; ISOBE, 2002; TABOPDA, 2008), além do 4-nerolidilcatecol (KIJJOA, 1980), abundante metabólito secundário na espécie. As estruturas dos compostos isolados estão representadas na Tabela 1.1.

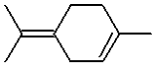
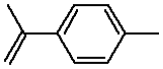
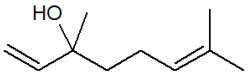
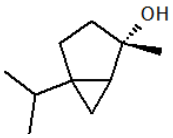
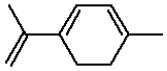
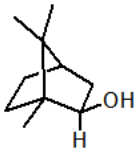
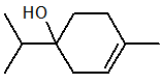
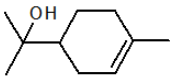
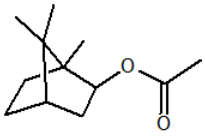
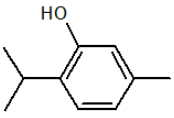
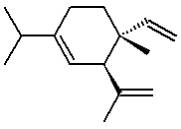
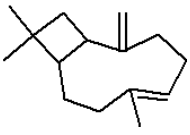
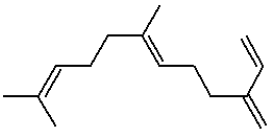
A espécie é utilizada na medicina popular como analgésico, antimalárico, sedativo, diurético (HAMMER, 1993), para dores de barriga (CORRÊA, 1974; MENSAH, 2008), úlceras (BALBACH, 1971) e afecções do aparelho digestório, sob as formas de infusão de folhas e tintura de raízes secas; as folhas de pariparoba são também comestíveis (MARTINS, 1995). Essa espécie teve inclusão de sua monografia na primeira edição da Farmacopéia Brasileira em 1926 (SILVA, 1926).

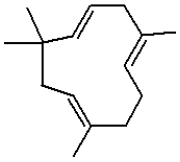
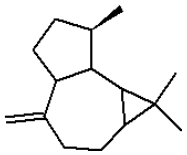
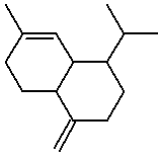
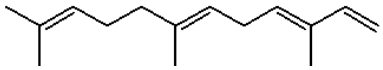
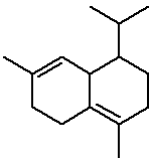
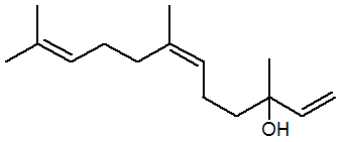
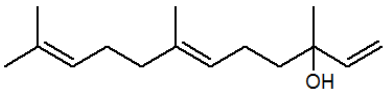
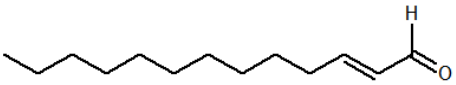
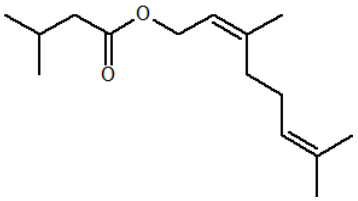
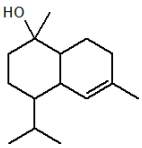
Tabela 1.1. Resumo de moléculas identificadas em *P. umbellata*.

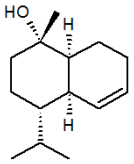
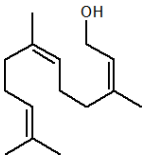
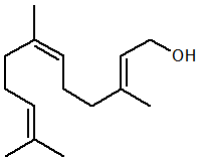
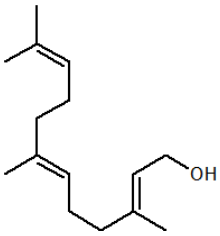
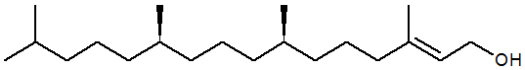
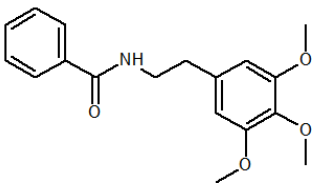
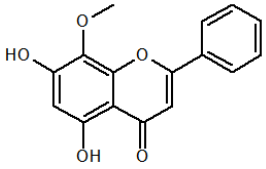
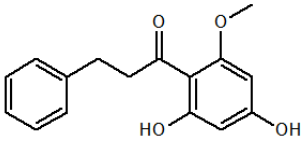
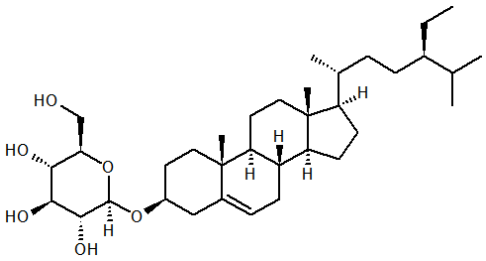
* Moléculas que foram também isoladas.

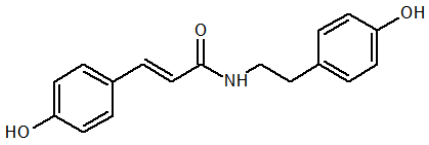
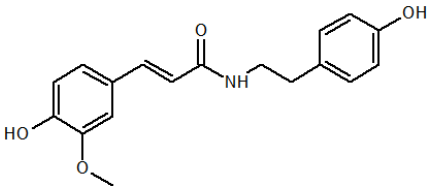
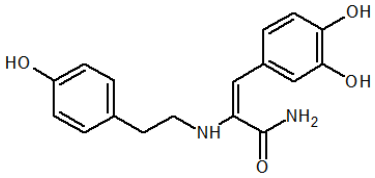
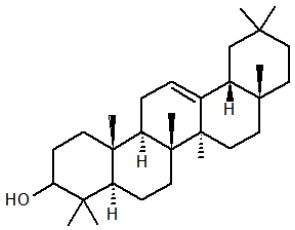
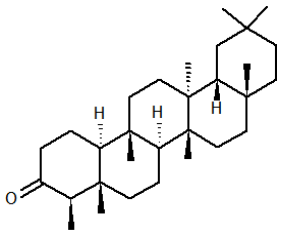
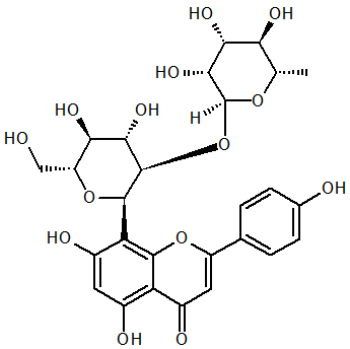
Nome	Estrutura	Referência
apiol *	$R_1 = OCH_3$ $R_2 + R_3 = -OCH_2O-$ R_4 OCH_3, $R_5 = H$ 	BRASIL E SILVA, 1972
dilapiol *	$R_1 = H$ $R_2 + R_3 = -OCH_2O-$, $R_4 = OCH_3$, $R_5 = OCH_3$	BERNHARD, 1978
4-nerolidilcatecol *		KIJJOA, 1980
α-tujeno		MARTINS, 1998

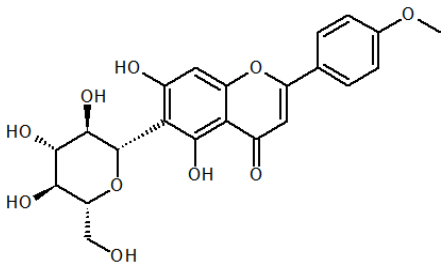
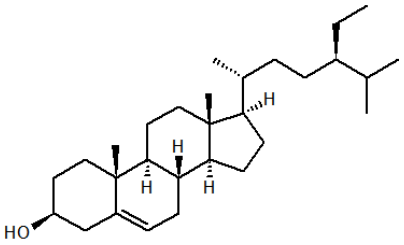
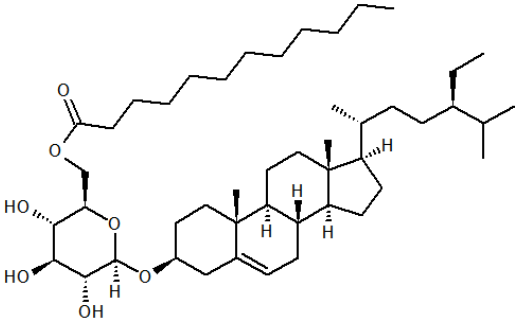
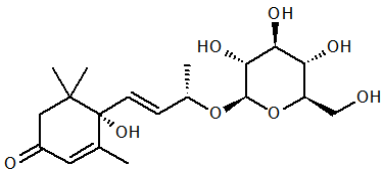
Nome	Estrutura	Referência
α-pineno		MARTINS, 1998
canfeno		
6-metil-5-hepten-2-ona		
β-pineno		
mirceno		
α-felandreno		
α-terpineno		
p-cimeno		
(*Z*)-β-ocimeno		
limoneno		
β-felandreno		
(*E*)-*β*-ocimeno		
hidrato de trans-sabineno		
2-nonanona		

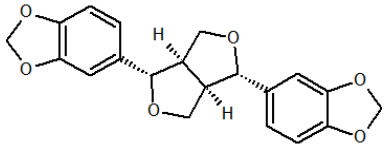
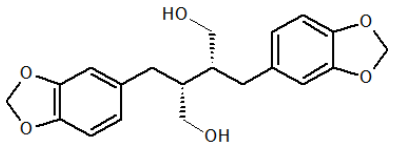
Nome	Estrutura	Referência
terpinoleno		MARTINS, 1998
p-cimeneno		
linalol		
hidrato de *cis*-sabineno		
1,3,8-*p*-mentatrieno		
borneol		
terpinen-4-ol		
α-terpineol		
acetato de bornila		
timol		
δ-elemeno		
β-cariofileno		
E-*β*-farneseno		

Nome	Estrutura	Referência
α-humuleno		MARTINS, 1998
allo-aromadendreno		
γ-muuroleno		
(*E*,*E*)-*α*-farneseno		
δ-cadineno		
(*Z*)-nerolidol		
(*E*)-nerolidol		
(*E*)-2-tridecenal		
isovalerato de nerila		
T-cadinol		

Nome	Estrutura	Referência
T-muurolol		MARTINS, 1998
2*Z*,6*Z*-farnesol		
2*E*,6*Z*-farnesol		
2*E*,6*E*-farnesol		
fitol		
N-benzoilmescalina *		ISOBE, 2002
wogonina *		
uvangoletina *		
β-sitosterol glicosídeo *		

Nome	Estrutura	Referência
piperumbellactama A *	$R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = H$	TABOPDA, 2008
piperumbellactama B *	$R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$	
piperumbellactama C *	$R_1 = R_2 = OH$, $R_3 = CH_3$	
piperumbellactama D *	$R_1 + R_2 = -OCH_2O-$, $R_3 = CH_3$	
N-hidroxi-aristolactma II *	$R_1 + R_2 = -OCH_2O-$, $R_3 = H$	
N-p-cumaroil-tiramina *		
N-trans-feruloil-tiramina *		
E-3-(3,4-diidroxifenil)-*N*-2-[4-hidroxifeniletil]-2-propenamida *		
β-amirina *		
friedelina *		
apigenina 8-C-neoesperidosídeo *		

Nome	Estrutura	Referência
acacetina 6-C- *β*-D-glucopiranosídeo *		TABOPDA, 2008
β-sitosterol *		
β-sitosterol 3-O-*β*-D-[6'-dodecanoil]-glicopiranosídeo *		
rel-(6*S*, 9*S*)-roseosídeo *		BALDOQUI, 2009
vitexina 2"-O-β-D-glicopiranosídeo *	R_1 = C-Gli-O-Gli, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH	
apigenina-8-C-β-D-glicopiranosídeo *	R_1 = C-Gli, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH	
orientina 8-C-β-D-glicopiranosídeo *	R_1 = C-Gli, R_2 = OH, R_3 = OH, R_4 = OH	
5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavona *	R_1 = H, R_2 = OCH3, R_3 = OCH3, R_4 = OH	
velutina *	R_1 = H, R_2 = OCH3, R_3 = OCH3, R_4 = OCH3	

Nome	Estrutura	Referência
sesamina *		BALDOQUI, 2009
diidrocubebina *		

Tomando como base a medicina popular, vários trabalhos científicos foram realizados para comprovar as ações relatadas. A Tabela 1.2 resume esses estudos encontrados na literatura (indexados sob a sinonímia científica dessa espécie).

Entre os artigos encontrados, podemos destacar que diversas atividades relacionadas à proteção contra o fotoenvelhecimento foram descritas. Uma formulação tópica contendo 0,1% do extrato de raízes promoveu proteção contra danos causados por radiação UV em pele de ratos (ROPKE, 2005). Outra formulação, contendo o mesmo extrato e padronizada a 0,1% de 4-nerolidilcatecol, (4-NC) previniu a perda de alfa-tocoferol pela pele após irradiação por UV (ROPKE, 2003).

Outro extrato de raízes, padronizado com 7,09% de 4-NC apresentou atividade inibitória sobre metaloproteinases de matriz da pele de ratos, exibindo possível utilidade na prevenção e tratamento do câncer de pele (ROPKE, 2006). O mesmo extrato também inibiu metaloproteinases de matriz em córneas de ratos, mostrando eficácia e a possível utilidade como um tratamento alternativo para lesões de córnea ao modular a atividade dessas enzimas (BARROS, 2007). Em um estudo mais recente, foi reforçada a possível atividade citotóxica em melanomas pelo 4-NC, através da observação de indução de apoptose nessas células (BROHEM, 2009).

O extrato bruto das partes aéreas apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória; esta última foi comparada à indometacina em indução por carragenana. O extrato obteve eficácia semelhante, porém em uma dose mais alta que a do fármaco controle (PERAZZO, 2005).

Em um estudo foram isoladas quatro substâncias das partes aéreas de pariparoba: um alcalóide, uma flavona, uma di-hidrochalcona e um esteróide. As estruturas foram investigadas revelando respectivamente: *N*-benzoilmescalina, wogonina, uvangoletina e β-sitosterol glicosídeo. Entre esses compostos, o majoritário (*N*-benzoilmescalina) apresentou significativa atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Helicobacter pylori* (ISOBE, 2002).

Além da potencial atividade anti-inflamatória e antimicrobiana contra *H. pylori*, extratos das raízes de *P. umbellata* demonstraram ausência de toxicidade em testes de toxicidade aguda, subcrônica e avaliação da mutagenicidade por teste de micronúcleo (BARROS, 2005; VALADARES, 2007) o que torna ainda mais interessante a busca por uma nova alternativa à terapia antiúlcera, utilizando extratos de *P. umbellata*.

Tabela 1.2. Resumo de atividades relatadas para *P. umbellata*.

Atividade	Extrato / Parte utilizada	Método	Resultado	Referência
Analgésica	Extrato etanólico e frações / Folhas	*In vivo*, modelo de contorções abdominais	Positivo	PERAZZO, 2005
Antibacteriana	*N*-benzoilmescalina / Partes aéreas	*In vitro* contra *H. pylori*	Positivo	ISOBE, 2002
	Metanólico / Folhas	Difusão em ágar; CIM; várias espécies	Baixa atividade	BOUZADA, 2009
Antifúngica	Diferentes extratos e frações, 4-NC, piperumbelactama D, *N*-hidroxi-aristolactma II / Caules	Diluição em tubo de ágar	Positivo	TABOPDA, 2008
	Metanólico / Folhas	Difusão em ágar; CIM	Positivo	BRAGA, 2007
Anti-inflamatória	Extrato etanólico e frações / Folhas	*In vivo*, edema por carragenana e indução de tecido granulomatoso	Positivo	PERAZZO, 2005
Antiofídica	4-NC / Caules	*In vivo* e *in vitro*, inibição de PLA_2 de diferentes venenos	Positivo	NÚÑEZ, 2005
Antioxidante	piperumbelactama B e C, *N*-*p*-cumaroil-tiramina / Caules	DPPH	Positivo	TABOPDA, 2008
	Metanólico / Folhas	Diversos	Positivo	AGBOR, 2007

Atividade	Extrato / Parte utilizada	Método	Resultado	Referência
Antioxidante	Metanólico, 4-NC / --	Luminol / CL	Positivo	DESMARCHELIER, 1997 *
	Extrato etanol 50%, 4-NC / Raízes	MDA / CL	Positivo	BARROS, 1996 *
Antiparasitária	Metanólico / Folhas	*In vitro* contra *Leishmania amazonensis*	Positivo	BRAGA, 2007
	Extrato metanólico / Folhas	*In vitro* contra *Plasmodium falciparum*	Positivo	ADAMI, 1995. *apud* ANDRADE-NETO, 2007
	Extrato etanólico / Folhas	*In vivo* contra *P. berghei*	Positivo	AMORIM, 1988
	Extrato etanol 90% / Folhas	*In vitro* contra *P. falciparum*	Baixa atividade	ANTIDEHOU, 2004
		In vitro contra *Trypanosoma brucei*	Positivo	
Antitumoral	4-NC / Raízes	Culturas de células	Positivo	BROHEM, 2009
	Extrato diclorometano e frações / Folhas	Culturas de células	Positivo	SACOMAN, 2008
Proteção contra Fotoenvelhecimento	Extrato etanol 50%, 4-NC / Raízes	*In vivo*, inibição de metaloproteinases	Positivo	ROPKE, 2006
	Extrato etanol 50% / Raízes	*In vivo, irradiação com UVB, dano crônico*	Positivo	ROPKE, 2005
	Extrato etanol 50% / Raízes	*In vivo, irradiação com UVB, avaliação de vitamina E*	Positivo	ROPKE, 2003

Atividade	Extrato / Parte utilizada	Método	Resultado	Referência
Sedativa	Extrato aquoso / --	*In vivo*, observação	Positivo	BIOKA, 1990 *
Toxicidade	Metanólico / Folhas	*In vitro* contra *A. salina*	Negativo	BOUZADA, 2009
	Etanol 75% e 4-NC / Raízes	Teste de micronúcleo	Negativo	VALADARES, 2007
	Folhas / Extrato etanólico e frações	*In vivo*, aguda e DL_{50}	Negativo DL_{50} = 2,0 g/kg	PERAZZO, 2005
	Extrato etanol 50%, / Raízes	*In vivo*, aguda e subcrônica	Negativo	BARROS, 2005
	--	*In vitro*, Salmonella/Microssoma	Negativo	FELZENSZWALB, 1987 *

***** Acesso apenas ao resumo.

1.2. Noções sobre fisiologia da secreção gástrica

O estômago secreta de 1 a 2 L de suco gástrico por dia, e entre os principais componentes presentes podemos destacar o ácido clorídrico (produzido pelas células parietais) e o pepsinogênio (produzido pelas células principais) que em pH ácido é convertido em pepsina. Há também o muco, que junto com o bicarbonato (secretados pelas células superficiais) formam uma barreira protetora para as células da mucosa gástrica contra a ação digestiva do suco gástrico.

Os principais agentes que estimulam a secreção ácida incluem a gastrina (endócrina, secretada pelas células G), a acetilcolina (provém principalmente do controle pelo nervo vago, estimula as células parietais e células que contém histamina) e a histamina (hormônio local). A inibição da secreção é feita pela somatostatina (endócrina quando secretada por células D do antro e parácrina quando secretada por células D do corpo do estômago), por fatores de crescimento epidérmico (EGF) e por prostaglandinas E_2 e I_2; estas últimas também estimulam as células superficiais a produzir muco e bicarbonato (AIRES, 2008). Um esquema desta regulação pode ser visto na Figura 1.2.

1.3. Úlceras pépticas

São lesões crônicas, geralmente aparecem isoladas e com menos de 4 cm de diâmetro, e embora possam ocorrer em qualquer porção do trato gastrintestinal, a grande maioria se localiza no duodeno e estômago. As úlceras são caracterizadas histologicamente como uma descontinuidade na mucosa que se estende através da camada muscular da mucosa até dentro da submucosa, ou mais profundamente. Diferenciam-se das gastrites, que são de forma genérica, inflamações na mucosa gástrica, podendo ser acompanhadas por hemorragias e erosão da mucosa (destruição dos tecidos que não chega a atingir a camada muscular).

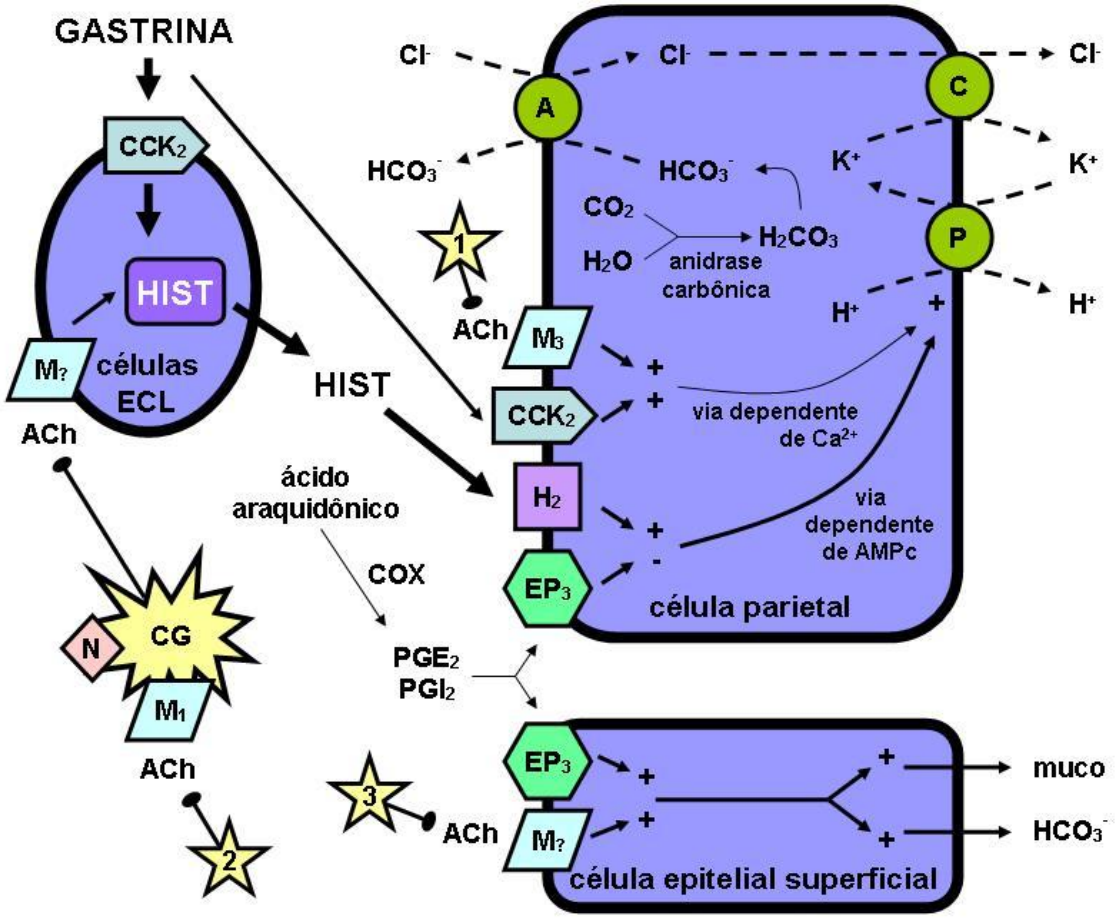


Figura 1.2. Regulação fisiológica da secreção gástrica. A figura mostra interações entre uma célula semelhante às células enterocromafins (**ECL**) que libera histamina, uma célula parietal (que secreta ácido) e uma célula epitelial superficial secretora de muco e bicarbonato. As vias fisiológicas (setas em negrito) podem ser estimuladoras (+) ou inibidoras (-). **1** e **3** indicam possíveis influxos de fibras colinérgicas pós-ganglionares, enquanto **2** mostra o influxo neural do nervo vago sobre uma célula ganglionar (**CG**) do sistema nervoso entérico. Os agonistas fisiológicos e seus respectivos receptores incluem: receptores de acetilcolina (**ACh**), muscarínicos (**M**) e nicotínicos (**N**); gastrina, receptor de colecistocinina 2 (**CCK_2**); histamina (**HIST**), receptor **H_2**, e prostaglandinas E_2 e I_2 (**PGE_2**, **PGI_2**), receptor **EP_3**. A secreção ácida envolve uma bomba de prótons (**P**), que é uma H^+/K^+ATPase, um cotransportador (**C**) de K^+ e Cl^- e um antitransportador (**A**) que troca Cl^- e HCO_3^-. Adaptado de BRUNTON, 2006.

Essas lesões são geradas por um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa da mucosa gástrica e forças lesivas (Figura 1.3), particularmente a secreção ácida e a pepsina. Entretanto, hiperacidez não é um requisito, já que apenas uma minoria dos pacientes com úlcera gástrica apresenta essa característica (embora quando presente é um fator fortemente ulcerogênico).

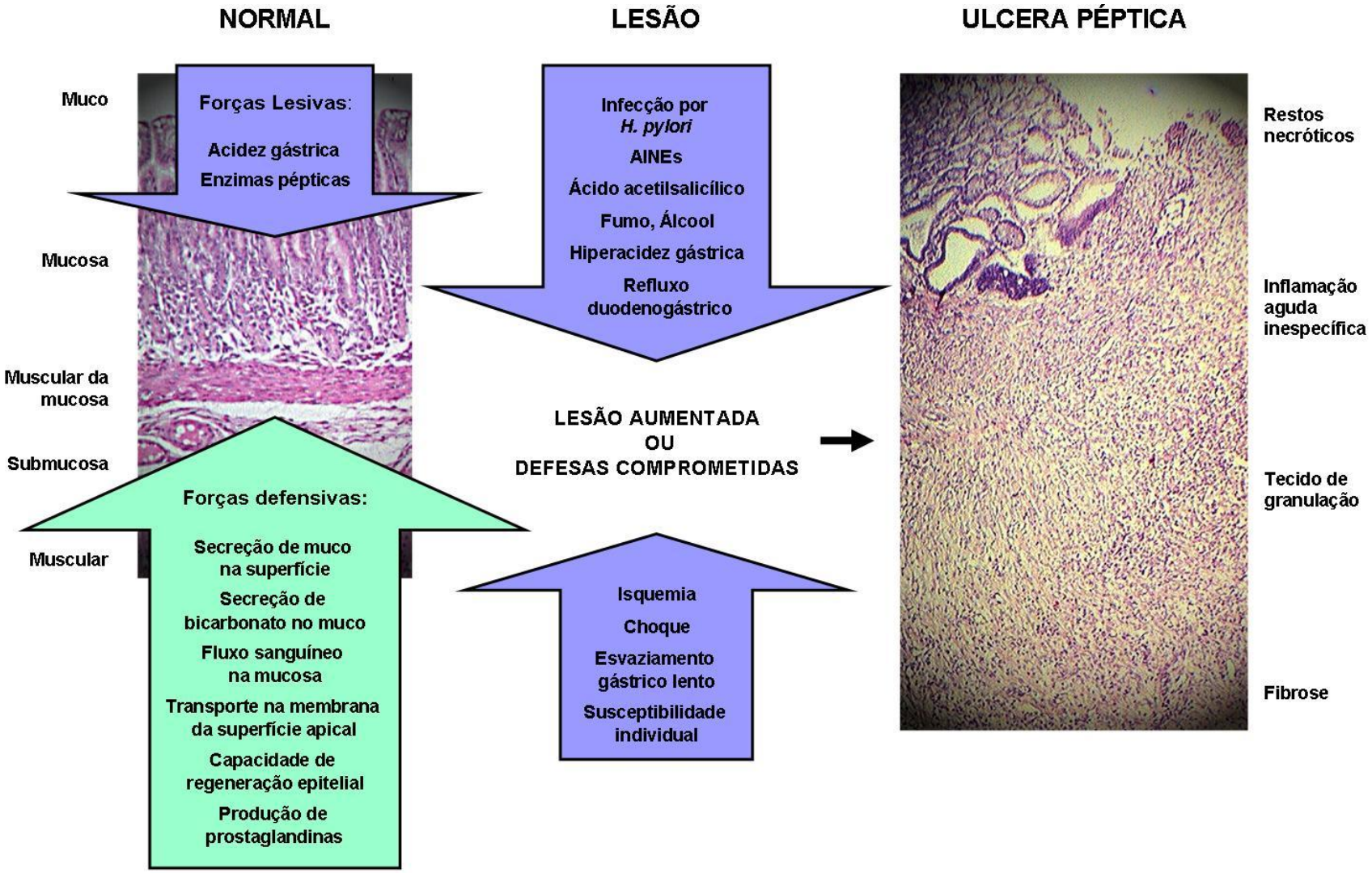


Figura 1.3. Esquema da fisiopatologia da úlcera péptica. Adaptado de KUMAR, 2005.

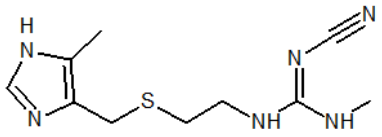
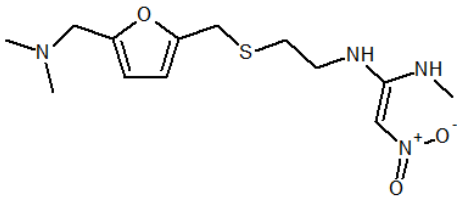
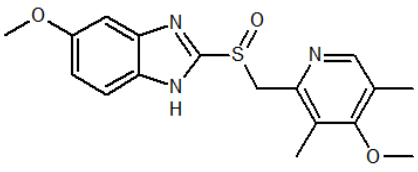
Preferencialmente, as úlceras ocorrem quando as defesas da mucosa colapsam, quando o fluxo sanguíneo da mucosa se reduz, quando o esvaziamento gástrico é retardado ou a restituição epitelial está debilitada.

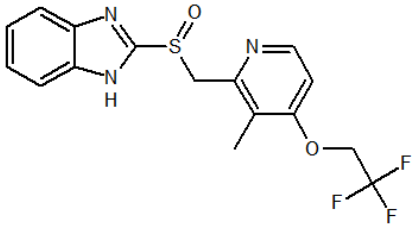
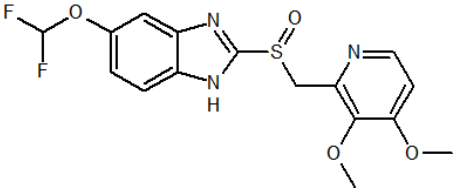
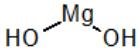
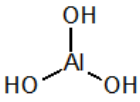
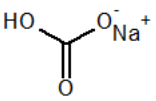
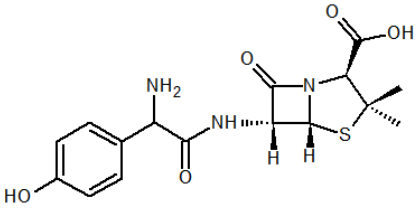
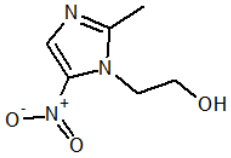
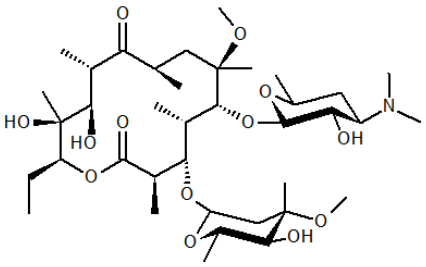
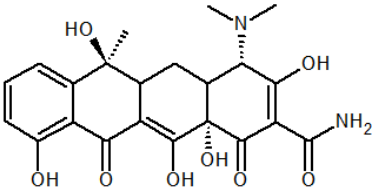
A infecção por *H. pylori* é um fator preponderante na patogênese de úlcera péptica. Está presente em praticamente todos os pacientes com úlcera duodenal e em aproximadamente 70% daqueles com úlcera gástrica. Outros fatores como anti-inflamatórios não esteroidais, ou AINEs (impedem a produção de prostaglandinas), cigarro (compromete o fluxo sanguíneo e cicatrização) e estresse psicológico também contribuem para a formação de úlceras (KUMAR, 2005).

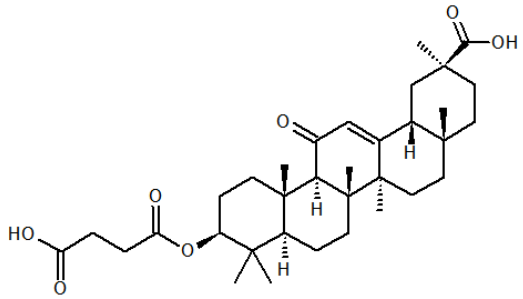
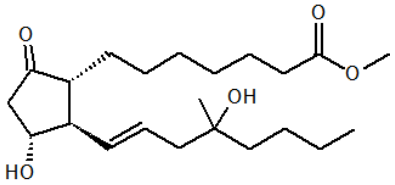
1.4. Estratégias de tratamento

Visto que os principais fatores que levam a formação de úlceras no trato gastrintestinal (TGI) envolvem o desequilíbrio entre os fatores que provocam dano da mucosa (como ácido e pepsina) e os agentes protetores (muco e bicarbonato), além da infecção por *H. pylori*, as estratégias de tratamento de úlceras visam corrigir ou atenuar estes problemas, baseadas nos mecanismos de ação dos fármacos disponíveis, como mostra a Tabela 1.3:

Tabela 1.3. Exemplos de fármacos utilizados no tratamento de úlcera péptica, suas respectivas estruturas e classificação segundo mecanismo de ação.

Mecanismo de ação	**Exemplo de fármaco**	**Estrutura molecular**
Antagonistas dos receptores H_2 de histamina	cimetidina	
	ranitidina	
Inibidores da bomba de prótons	omeprazol	

Mecanismo de ação	Exemplo de fármaco	Estrutura molecular
Inibidores da bomba de prótons	lansoprazol	
	pantoprazol	
Antiácidos	hidróxido de magnésio	
	hidróxido de alumínio	
	bicarbonato de sódio	
Antibióticos	amoxicilina	
	metronidazol	
	claritromicina	
Antibióticos	tetraciclina	

Mecanismo de ação	Exemplo de fármaco	Estrutura molecular
Citoprotetores	carbenoxolona	
	misoprostol	

1.5. Modelos para avaliação de atividade antiúlcera em animais

Para descrever de modo sucinto o uso de modelos para avaliação da atividade antiúlcera em animais, foram selecionados alguns artigos de revisão, cujas informações se encontram a seguir.

1.5.1. Modelo de indução por etanol acidificado

O uso de etanol na indução de úlceras é realizado através de procedimentos simples e reprodutíveis, com a administração de diferentes quantidades (0,5 a 2 mL) de etanol concentrado (50-100%). Dependendo da quantidade de etanol administrada, entre 10 e 40% da porção glandular dos estômagos de ratos e camundongos se tornam cobertas por lesões hemorrágicas e úlceras, que são observadas entre 1-2 horas após a administração. Estudos feitos com base no tempo do modelo demonstram que a maior parte das lesões se forma dentro de 1-3 minutos do contato do etanol com a mucosa. Através desse modelo, foi observado que a administração de prostaglandinas exógenas antes da dose de etanol previne o dano à mucosa em curva dose-resposta. Através de estudos histológicos, percebeu-se que o

comprometimento do fluxo sanguíneo tem um papel na etiologia da úlcera induzida por esse modelo, devido às lesões vasculares provocadas pelo etanol (GLAVIN, 1992). Mecanismos envolvidos nesse modelo podem ser encontrados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4. Fatores envolvidos na lesão da mucosa gástrica induzida por etanol. (Adaptado de GLAVIN, 1992)

Aumento	**Diminuição**
Geração de radicais livres	Produção de muco
Refluxo na difusão de ácido	Motilidade gástrica
Liberação de serotonina	Diferença de potencial transmucosa
Liberação de histamina	Produção endógena de GSH (glutationa)
Efluxo de sódio e potássio	Produção de prostaglandinas
Influxo de cálcio	Fluxo sanguíneo na mucosa gástrica
Produção de leucotrienos	
Isquemia	
Permeabilidade vascular gástrica	

Kawano (2000) realizou um trabalho de revisão onde destaca o papel da endotelina-1 (ET-1) e do óxido nítrico (NO) na úlcera gástrica, inclusive em lesões causadas por etanol. A administração de etanol ou outro estímulo (como por exemplo hipóxia) aumenta a liberação de ET-1 pelos vasos sanguíneos no estômago. A endotelina-1 por sua vez, interage com receptores ET_A na musculatura dos vasos promovendo vasoconstrição, que leva a distúrbios na microcirculação gástrica, o que contribui para a formação das lesões. Já o óxido nítrico endógeno ajuda a reduzir as lesões gástricas hemorrágicas provocadas pelo etanol devido à sua ação vasodilatadora, que ajuda a regular a microcirculação.

Em 2002, Repetto destacou em sua revisão o papel de espécies reativas de oxigênio na patogênese da úlcera gástrica, inclusive quando essas lesões são ocasionadas por etanol. Atribui-se ao álcool o aumento de ânions superóxido, radicais hidroxila e peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzindo estresse oxidativo intracelular. Kwiecień (2002) também encontrou

evidências de que as espécies reativas de oxigênio têm participação na etiologia da ulceração causada por etanol. Gazzieri, em 2007 realizou um trabalho para colaborar com a elucidação do mecanismo que relacione etanol, radicais livres e lesão gástrica. Com os resultados, foi sugerido que há o envolvimento de canais receptores de potencial transiente vanilóides do tipo 1 (TRPV-1), que ao serem ativados por etanol resultam na liberação de substância P que estimula receptores de neurocinina-1 a gerar espécies reativas de oxigênio.

1.5.2. Modelo de indução por indometacina

O efeito colateral mais conhecido dos AINEs é o dano provocado à mucosa gástrica. Esse dano pode ocorrer por dois mecanismos distintos. O primeiro é a conhecida inibição das enzimas ciclo-oxigenases, diminuindo assim a produção de prostaglandinas endógenas. O segundo consiste na formação de um gradiente de íons que favorece o influxo de H^+ para dentro das células da mucosa gástrica, com efluxo de K^+ e Na^+ para o lúmen, resultando em mudanças na permeabilidade celular e consequente lesão celular (GLAVIN, 1992).

Há outros mecanismos pelos quais essas substâncias podem induzir lesão. Alguns AINEs, particularmente os que apresentam caráter ácido, promovem diretamente a morte de células epiteliais. Podem também destruir a camada de fosfolipídeos tensoativos na superfície da mucosa (que ajudam na proteção), independente de seu efeito sobre a síntese de prostaglandinas. Ainda são capazes de reduzir a capacidade regenerativa promovida pelo EGF - fator de crescimento epitelial (WALLACE, 2008).

Mais detalhes sobre o mecanismo de formação de lesões gástricas através da influência dos AINEs sobre as ciclo-oxigenases estão na Figura 1.4.

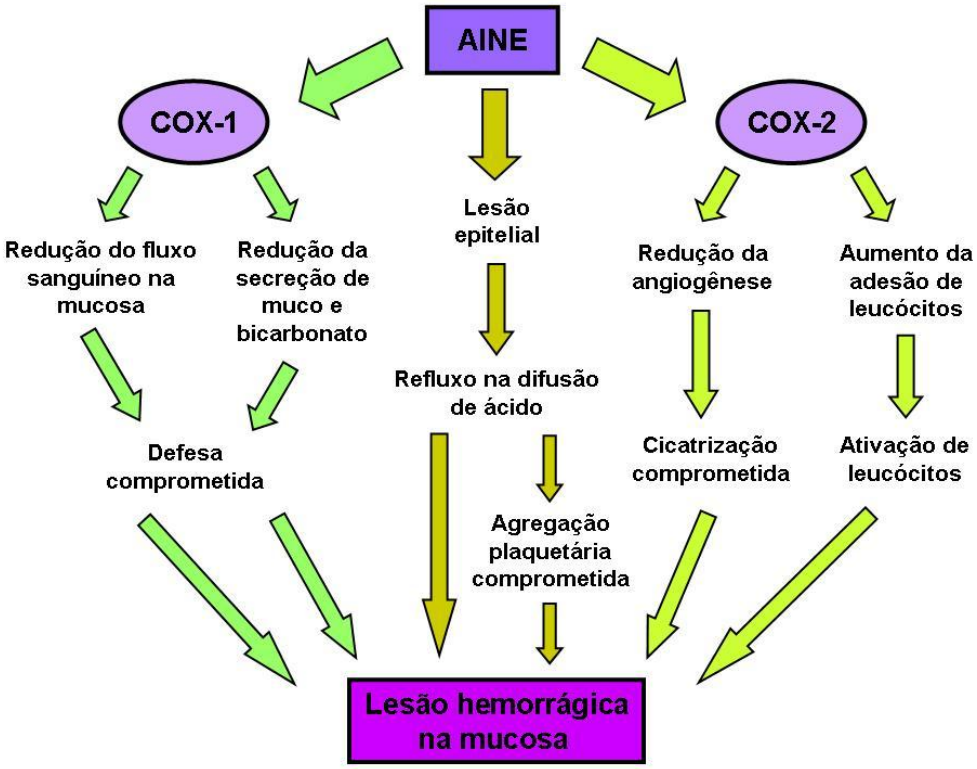


Figura 1.4. Mecanismos e fatores envolvidos na lesão da mucosa gástrica induzida por anti-inflamatórios não esteroidais (**AINEs**). **COX-1** e **2** : ciclo-oxigenases. Adaptado de WALLACE, 2008.

1.5.3. Modelo de ligadura do piloro

A ligadura do piloro estimula a liberação de ácido por um período de 4 a 6 h. Há indicações que essa resposta se dá por reflexos do nervo vago, através de sensores de pressão localizados na região do piloro (ALUMETS, 1982). Segundo Loscalzo (1981) e Parmar (1984), essa resposta é inibida (entre outros modos) por antagonistas de receptores H_2 como a cimetidina, já que há outros mecanismos envolvidos nesse processo. No entanto, outros autores relataram que a cimetidina não tem efeito pronunciado nesse modelo (OKABE, 1977; SALIM, 1988).

1.5.4. Modelo de indução por ácido acético

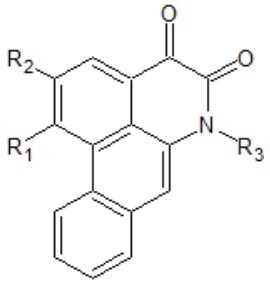
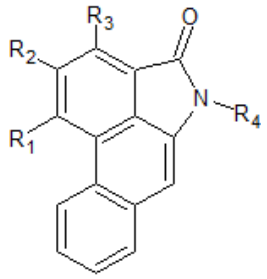
De acordo com um completo trabalho de revisão, realizado por Okabe[1] (2005) as principais razões do uso desse modelo consistem principalmente em 3 fatores: primeiro na sua relativa simplicidade de execução, com a formação de úlceras de tamanho e severidade constantes com incidência de 100%; depois, esse modelo é o que mais se aproxima da úlcera humana, tanto em termos patológicos quanto de cicatrização; por fim, as úlceras formadas respondem bem a vários agentes antiúlcera como: inibidores da bomba de próton, sucralfato e diversos fatores de crescimento. Após estudos histopatológicos, concluiu-se que o mecanismo de formação de úlceras por esse modelo começa por lesão vascular, que resulta em necrose isquêmica, provocando a ulceração. Por fim, a fase crônica muito se assemelha às úlceras humanas. Quanto ao processo de cicatrização, foi observado que fármacos anti H_2 não têm um efeito pronunciado sobre as úlceras formadas pelo ácido acético, fato que pode ser explicado pela inibição da angiogênese no tecido de granulação pelo bloqueio dos receptores H_2, resultando em um fator desfavorável à cicatrização. Já os inibidores da bomba de prótons aceleram de forma significante a cicatrização quando utilizados nesse modelo, assim como prostaglandinas e seus análogos.

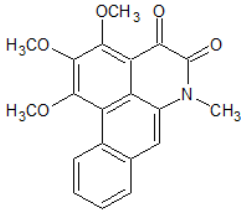
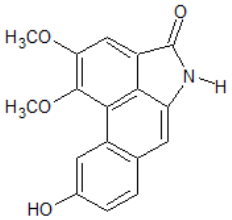
1.6. Aristolactamas na família Piperaceae

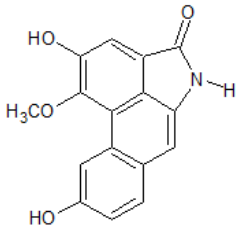
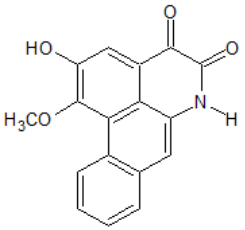
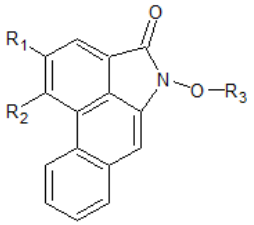
Conforme o andamento do trabalho, aristolactamas foram identificadas na fração que apresentou melhor atividade antiúlcera. Assim, surgiu a necessidade de buscar na literatura relatos da ocorrência dessa classe de compostos na família Piperaceae, a fim de se obter material para comparação com os resultados obtidos (resumo na Tabela 1.5). Não foram incluídas repetições ou a ocorrência dessas moléculas todas em espécies de Piperaceae, pois a intenção era verificar as diferentes estruturas. Assim deu-se prioridade aos primeiros relatos ou revisões de dados.

[1] Em 1969, juntamente com Takagi et.al., Okabe desenvolveu uma das metodologias mais empregadas para esse modelo, justamente a que foi utilizada neste trabalho.

Tabela 1.5. Resumo de aristolactamas isoladas em espécies da família Piperaceae. O símbolo * indica moléculas que foram apenas identificadas.

Nome	Estrutura		Espécie	Referência
cefaradiona B	$R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = CH_3$		*Piper longum*	DESAI, 1988
cefaradiona A	$R_1 + R_2 = OCH_2O$, $R_3 = CH_3$			
norcefaradiona B	$R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = H$			
piperadiona	$R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = CH_3$			
2-hidroxi-1-metoxi-4H-dibenzo[*de*,*g*]quinolina-4,5(6H)-diona	$R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$			
cefaranona B	$R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = R_4 = H$			
aristolactama AII	$R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = R_4 = H$			
piperolactama A	$R_1 = OH$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = R_4 = H$			
diacetato da piperolactama B	$R_1 = OAc$, $R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = Ac$			
metil eter da piperolactama B	$R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = H$			
piperolactama C	$R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = H$		*Piper boehmeriifolium,* *Piper longum*	DESAI, 1989 *
4-hidroxi-3-metoxi-*N*-metil-aristolactama	$R_1 = OH$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = H$, $R_4 = CH_3$		*Piper ribesioides*	RUANGRUNGSI, 1992
piperolactama B	$R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$		*Piper acutisleginum*	OLSEN, 1993

Nome	Estrutura	Espécie	Referência
piperolactama D	$R_1 = OH$, $R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = H$	*Piper acutisleginum*	OLSEN, 1993
caldensina	$R_1 = R_2 = OCH_3$, R_3, $R_4 = CH_3$	*Piper caldense*	CARDOZO JÚNIOR, 2003
piperolactama S	$R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$ $R_4 = CH_3$	*Piper puberulum*	KUMAR, 2003
piperolactama E	$R_1 = OH$, $R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = CH_3$	*Piper taiwanense*	CHEN, 2004
2,3,4-trimetoxi-*N*-metil-aristolactama	$R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = CH_3$	*Piper crassinervium*	DANELUTTE, 2005
3-hidroxi-2-metoxi-N-metil-aristolactama	$R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = OCH_3$, $R_4 = CH_3$		
1,2,3-trimetoxi-4,5-dioxo-6a,7-dehidroaporfina		*Piper arborescens*	TSAI, 2005
goniotalactama			

Nome	Estrutura	Espécie	Referência
aristolactama AIIIa		*Piper wallichii*	YUN, 2005 *
noraristolodiona		*Piper lolot*	LI, 2007
piperumbellactama A	$R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = H$		*Pothomorphe umbellata*	TABOPDA, 2008
piperumbellactama B	$R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$			
piperumbellactama C	$R_1 = R_2 = OH$, $R_3 = CH_3$			
piperumbellactama D	$R_1 + R_2 = -OCH_2O-$, $R_3 = CH_3$			
N-hidroxi-aristolactama II	$R_1 + R_2 = -OCH_2O-$, $R_3 = H$			

* Acesso apenas ao resumo.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são: o estudo fitoquímico e farmacológico de extratos da espécie *P. umbellata*, direcionados à atividade antiúlcera. Mais especificamente, pretende-se:

- Avaliar o extrato bruto liofilizado e suas frações quanto à atividade antiúlcera em diferentes modelos animais;

- Realizar o perfil cromatográfico dos extratos e frações e identificar substâncias que possam estar relacionadas à atividade farmacológica;

- Avaliar a viabilidade farmacotécnica de uma formulação constituída por uma suspensão de nanocápsulas contendo o extrato vegetal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material vegetal

Para iniciar o trabalho, folhas e raízes de espécimes de *P. umbellata* foram fornecidas pelo Grupo Centroflora (empresa situada em Botucatu - SP). Exsicata foi depositada pelo fornecedor em herbário próprio, sob número SP373331. Segundo o produtor, o material vegetal foi previamente seco em estufa com ventilação forçada, sob temperatura máxima de 60º C, e passou por um processo inicial de fragmentação.

3.2. Preparo do extrato bruto liofilizado e frações

Inicialmente foram feitos extratos em pequena quantidade, apenas para verificar qual parte da planta seria utilizada. Após o resultado do primeiro ensaio, foram feitos extratos em maior quantidade. Para todos os extratos foi realizado o mesmo procedimento, descrito a seguir.

As folhas e raízes foram pulverizadas em moinho de facas e martelos de marca Thomas®, passando por tamis de tamanho apropriado (1 mm). O extrato bruto liofilizado (EB) foi elaborado através de percolação com etanol 70%, segundo a Farm. Bras. 2.ed. (1959), método A, de forma adaptada, já que o extrato foi recolhido uma única vez. Posteriormente o etanol foi retirado em um concentrador de película descendente (de construção acadêmica) onde a temperatura máxima atingida foi de 60º C por poucos segundos. A água residual foi removida por liofilização (liofilizador Edwards®, modelo LK4).

Para o fracionamento, para cada grama do EB de raízes foram adicionados 10 mL de clorofórmio. A mistura foi mantida em agitador magnético por 30 min, à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada. O filtrado (fração clorofórmica) foi concentrado em rotaevaporador. Ao resíduo do papel de filtro foram adicionados 10 mL (por grama de EB) de acetato de etila e mantidos em agitador magnético por mais 30 min, repetindo o procedimento anterior para a obtenção da fração concentrada. Foram realizadas ainda extrações com etanol e etanol 50% em água, sendo o último extrato

concentrado e a água retirada por liofilização. Nas frações concentradas, o solvente foi removido inicialmente por evaporação à temperatura ambiente (em capela) por 48 h e em seguida com auxílio de nitrogênio comprimido por 2 h.

3.3. Avaliação da atividade antiúlcera

Neste trabalho, a avaliação da atividade antiúlcera foi feita através de diferentes modelos, para auxiliar na elucidação do mecanismo de ação dos extratos e frações. Inicialmente, foi utilizado o modelo de indução por etanol acidificado, para avaliar a atividade tanto de folhas como de raízes. Como as folhas não demonstraram atividade, o trabalho prosseguiu apenas com as raízes.

3.3.1. Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas - *Rattus norvegicus (albino*) - da linhagem Wistar, pesando entre 150 e 180 g, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura (22 ± 2)^{o} C e umidade controlada. Para adaptação, os animais permaneceram no local do experimento durante os 7 dias anteriores ao ensaio. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF-USP, em 10 de março de 2008, sob Protocolo CEEA n° 172, Ofício CEEA n° 11/2008.

3.3.2. Modelo de indução por etanol acidificado

Foram ensaiados 5 grupos de 7 animais cada, sendo um para controle negativo (água), um com lansoprazol Medley® no ensaio com extrato de folhas, e Hexal® nos demais (controle positivo) na dose de 30 mg/kg e três grupos para o EB (doses de 100, 200 e 400 mg/kg). A administração aos ratos Wistar foi feita por via oral. O extrato foi ressuspenso em água destilada, o volume

administrado foi de 10 mL/kg. Após 30 minutos, foi administrado, também por gavagem, ácido clorídrico a 0,3 M em etanol a 60%, com volume de 10 mL/kg. Uma hora depois da administração do indutor, os animais foram mortos em câmara de CO_2. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, prensados entre placas de vidro e copiados por *scanner* para o computador. A área das ulcerações foi medida através do software *Image-Pro Plus*®. O mesmo protocolo foi seguido utilizando o EB. Em outro ensaio semelhante, porém com 6 grupos, foram administradas frações de clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol a 50 % (do extrato de raízes) na dose de 200 mg/kg (MIZUI, 1983).

3.3.3. Modelo de indução por indometacina

Para indução, foi administrada indometacina Indocid® (Merck Sharp & Dohme) a 5 grupos de 7 ratos Wistar na dose de 50 mg/kg via oral. As úlceras apresentam níveis máximos em 4 h. Os grupos teste receberam diferentes doses (100, 200 e 400mg/kg) de EB de raízes (via oral, ressuspenso em água destilada, 10 mL/kg), 30 min antes da dose do indutor. O controle negativo recebeu água e o positivo lansoprazol Hexal®. Após as quatro horas, os animais foram mortos em câmara de CO_2, os estômagos retirados e analisados de maneira análoga ao método anterior (CHATTOPADHYAY, 2004).

3.3.4. Modelo de ligadura do piloro

A incisão abdominal foi feita sob anestesia com ketamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, em seguida, com o estômago exposto foi feita a ligadura do piloro. O EB de raízes foi ressuspenso em água e injetado no interior do lúmen duodenal (5 mL/kg) em doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Para o controle negativo foi utilizada água destilada, para o positivo, 100mg/kg de cimetidina Hexal®. Após 4 h os animais foram mortos, a secreção gástrica coletada com o auxilio de uma seringa e os estômagos abertos pela curvatura maior. O volume da secreção gástrica foi determinado em proveta de 10 mL e o pH medido em pH-metro Micronal®, modelo B474. A acidez total do suco gástrico foi

determinada por titulação com NaOH 0,1 N e fenolftaleína a 2% como indicador (MESIA-VELA, 2002).

3.3.5. Modelo de indução por ácido acético

Neste procedimento, os animais foram anestesiados com ketamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, em seguida feita incisão abdominal, o estômago exposto e injetado o ácido acético (a 30%, 0,05 mL) abaixo da serosa do estômago, para indução da úlcera subaguda. Dois dias após a cirurgia, o EB de raízes (ressuspenso em água destilada) passou a ser administrado por via oral (10 mL/kg), nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, a grupos de 7 animais, durante 8 dias. O controle negativo recebeu água, e o positivo, 100mg/kg de cimetidina Hexal®. Após esse período, os animais foram mortos em câmara de CO_2, retirados os estômagos e medida a área da ulceração (TAKAGI, 1969). A medida das ulcerações foi realizada a partir do programa *Image-Pro Plus*®.

Logo após a medição, os estômagos foram fixados em solução água/formol a 9:1. Posteriormente foram enviados à empresa Histotech® onde foi realizado o preparo das lâminas histológicas. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e analisados no laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.3.6. Forma de análise dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, com intervalo de confiança de 0,05%, seguidos pelo teste de Tukey.

3.4. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência

A procura por compostos que possam estar relacionados à atividade antiúlcera foi inciada a partir da fração que demonstrou ser mais ativa no ensaio *in vivo* (compostos solúveis em acetato de etila). Para tal, foi preparado um novo extrato (da mesma maneira que o anterior), utilizando 2,8849 kg de

droga vegetal e 29 L de etanol 70%, em seguida foi realizado o fracionamento com 177 g de EB.

Para iniciar a análise dos componentes da fração, empregou-se em todas as corridas equipamento Shimadzu® com bombas LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm.

Inicialmente foi feita uma corrida em gradiente de 30 min, 10 - 100% B (acetonitrila grau HPLC Tedia®) em água Milli-Q® com ácido trifluoroacético Merck® (TFA) a 0,1%, para avaliar qual a polaridade dos principais compostos. Percebeu-se que os compostos estavam sendo eluídos apenas a partir de 40% B, sendo então feita nova corrida empregando gradiente com metanol e água com TFA 0,1% (50 - 100% B em 40 min) obtendo picos em região de 65% B.

A partir dessas análises, foi feita separação de 3,2783 g de amostra em coluna de vidro aberta, com 60g de sílica C18 de 55-105 µm. Para a eluição utilizou-se metanol P.A. Synth® a 40% em água acidificada com 0,1% TFA (para eliminar resíduos de compostos mais polares), 65% (para coletar a região dos picos) e 100% (para eliminar os resíduos de compostos menos polares). Durante a separação na coluna aberta, houve a formação de um anel amarelo durante a eluição com 65%. Esta porção (fração 65-2) foi coletada separadamente para posterior análise (procedimentos usuais do laboratório).

Como o sistema de CLAE semi-preparativo possui apenas uma bomba, foi necessário o desenvolvimento de uma corrida isocrática que separasse melhor os picos da fração 65-2 (para posterior separação em maior escala), e após otimização variando % B e tempo de corrida, os melhores resultados foram obtidos empregando-se 50% ACN (acetonitrila) em água acidificada (0,1% TFA) por 25 min.

Para realizar a separação em maior quantidade da fração 65-2, os parâmetros de corrida encontrados foram então empregados no sistema de CLAE semi-preparativo composto por equipamento Shimadzu®, com bomba LC-6AD, loop de 1000 µL, detector UV-Vis SPD-20A, fluxo de 10 mL/min e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack PREP-ODS de 250 mm x 20 mm, tamanho de partícula de 5 µm.

3.4.1. Identificação das frações

Para a identificação, os compostos obtidos na separação por CLAE foram solubilizados em 500 µL de DMSO-d_6 ou CD_3OD, transferidos para tubos próprios para RMN e submetidos a análises de ^{1}H, ^{13}C, DEPT, COSY, HSQC e HMBC em equipamento Digital NMR - Avance DPX 300 (Bruker®).

3.5. Preparação das nanocápsulas com extrato bruto liofilizado

Para a obtenção das nanocápsulas foi utilizado o método de precipitação de polímero pré-formado. Inicialmente é preparada uma fase orgânica (agitação por 30 min a 40° C) e outra aquosa (apenas homogeneizada). Em seguida, sob agitação (por 10 minutos em agitador magnético), a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa. O detalhamento das composições está descrito na Tabela 3.1. A eliminação do solvente e parte da água foi efetuada empregando evaporador rotatório a 37° C e o volume da suspensão (10 mL) foi ajustado em balão volumétrico (BECK, 2004).

Tabela 3.1. Composição das fases orgânica e aquosa para preparo de suspensão de nanocápsulas contendo extrato bruto de raízes de pariparoba.

Componentes	Quantidade
Fase orgânica	
poli (ε-caprolactona) 60.000 Daltons	0,1 g
monoestearato de sorbitan (span 60)	0,077 g
triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico (Miglyol®)	0,333 g
acetona	27,0 mL
EB de raízes de pariparoba	0,412 g
Fase aquosa	
polissorbato 80	0,077 g
água purificada	53,0 mL

3.6. Caracterização física das suspensões de nanocápsulas com extrato bruto liofilizado

3.6.1. Distribuição do tamanho de partícula

O diâmetro das partículas em suspensão foi determinado por método de espalhamento de luz dinâmica, empregando equipamento N5 Submicron Particle Size Analyser (Beckman Coulter®). As amostras foram diluídas (20 µL de suspensão de nanocápsulas para 2,0 mL de água purificada, filtrada empregando membrana éster de celulose tamanho de poro 0,22 µm) e a luz espalhada é medida em ângulo de 90 ºC. O equipamento realizou 3 medições, cuja média compõe o resultado (LOPES, 2000).

3.6.2. Determinação da taxa de associação do extrato bruto liofilizado às nanocápsulas, empregando cromatografia líquida de alta eficiência

A concentração do extrato bruto liofilizado de raízes de *P. umbellata*. ligada ao sistema nanoparticulado foi avaliada por meio da transferência de 200 µL da suspensão para ultrafiltro Microcon Ultracel YM-10 (Regenerated Cellulose 10.000 MWCO) Millipore® e centrifugação empregando equipamento Eppendorf®, Centrifuge 5804 R a 8000 rpm durante 30 minutos. A alíquota obtida do filtrado (teor do extrato não ligado à partícula) foi analisada empregando sistema de CLAE Shimadzu® com bombas LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific® C18 ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm.

Em uma corrida foi injetado o filtrado, em outra, uma mistura contendo 400 µL de acetonitrila e 200 µL da suspensão com extrato, para promover a lise das nanocápsulas e então comparar o perfil do extrato não-ligado com o perfil do filtrado (LOPES, 2000).

4. RESULTADOS

4.1. Preparo do extrato bruto e frações

Nas Tabelas 4.1 e 4.2 foram organizados os dados referentes à quantidade obtida e rendimento dos extratos e frações de *P. umbellata*.

Tabela 4.1. Rendimento dos diferentes extratos brutos de *P. umbellata* preparados.

Parte utilizada	Massa de droga vegetal (kg)	Quantidade de solvente empregada (L)	Quantidade de liofilizado (g)	Rendimento (%)
Raízes	0,0680	0,700	2,1762	3,20
Folhas	0,0890	0,900	16,7560	18,82
Raízes	1,3000	15,000	45,4227	3,49

Tabela 4.2. Rendimento das frações preparadas a partir do extrato de raízes de *P. umbellata* (em relação à massa de 20,0972 g de extrato bruto liofilizado empregada).

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
clorofórmio	4,3633	21,7
acetato de etila	0,3195	1,6
etanol	0,8291	4,1
etanol 50%	11,6588	58,0
TOTAIS	**17,1707**	**85,4**

4.2. Avaliação da atividade antiúlcera

Os resultados referentes aos experimentos para a avaliação da atividade antiúlcera encontram-se nas seções a seguir, organizados em forma de tabelas e gráficos. Figuras ilustrativas foram montadas apenas para auxiliar na visualização dos dados. A Área Relativa de Lesão corresponde à Área Total de Lesão dividida pelo tamanho do estômago.

4.2.1. Modelo de indução por etanol acidificado

Este modelo foi escolhido para determinar qual parte da planta seria utilizada, além de indicar em qual fração do extrato podem estar presentes compostos com maior atividade. A preferência por essa técnica se deve ao seu mecanismo mais geral (com vários fatores envolvidos) na formação das lesões ulcerativas, além de ser um método relativamente rápido e que fornece resultados claros (as lesões formadas ocupam uma área grande do estômago, facilitando a medição).

4.2.1.1. Extrato bruto liofilizado de folhas

O uso do extrato de folhas não demonstrou atividade antiúlcera por esse modelo, como pode ser visto na Tabela 4.3 e na Figura 4.1. Nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo. Dessa forma, optou-se por não utilizar extrato de folhas nos ensaios seguintes. A Figura 4.2 mostra de forma ilustrativa a aparência geral do resultado obtido. As lesões apresentaram tamanho atípico (menor que o usual), mesmo no grupo que recebeu apenas água.

Tabela 4.3. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com extrato de folhas de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7).

Grupo	ATL (mm²)	ARL (%)
100 mg/kg	22,09 ± 6,41	2,11 ± 0,61
200 mg/kg	29,42 ± 15,17	2,82 ± 1,37
400 mg/kg	21,64 ± 13,58	2,04 ± 1,18
água	16,05 ± 6,45	1,61 ± 0,66
lansoprazol	23,27 ± 15,86	1,90 ± 1,26

A ANOVA não apresentou diferença significativa entre os grupos.

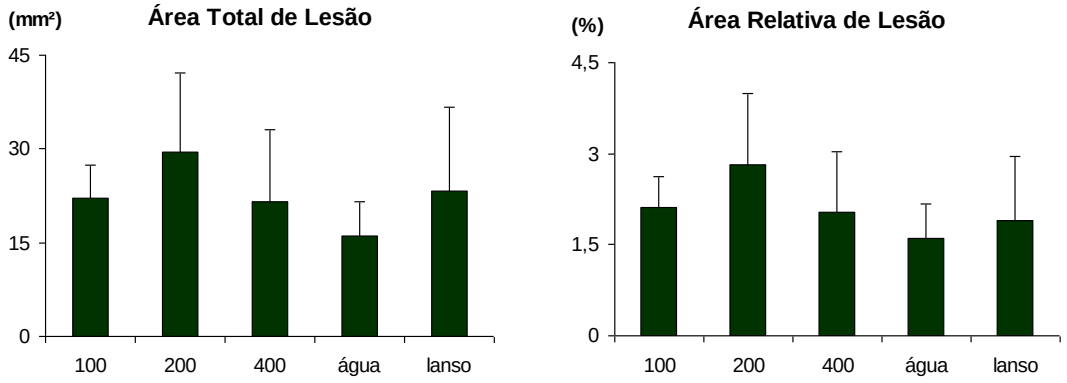


Figura 4.1. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com extrato de folhas de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7). A ANOVA não apresentou diferença significativa entre os grupos.

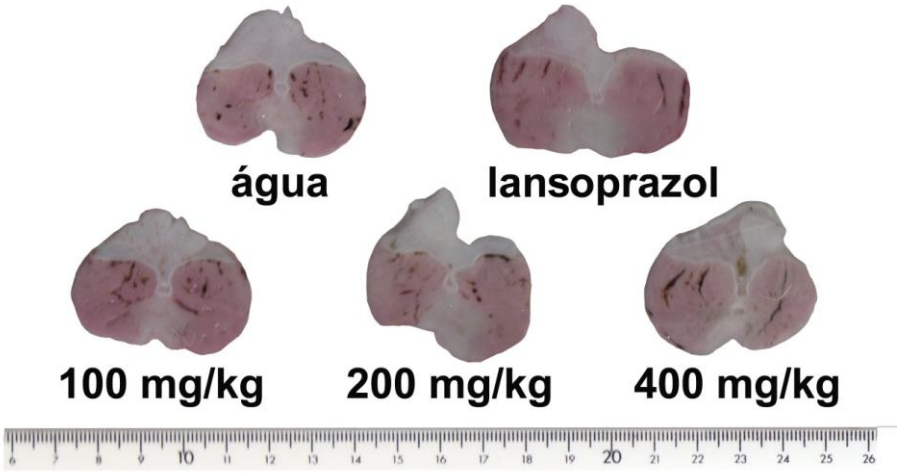


Figura 4.2. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com extrato de folhas de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Foi escolhido apenas um estômago para representar cada grupo, somente para ilustrar a aparência dos resultados. Escala em centímetros.

4.2.1.2. Extrato bruto liofilizado de raízes

Mais uma vez, nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo, porém ao observar as médias (Tabela 4.4) e o gráfico (Figura 4.3), percebe-se uma possível relação dose-resposta na administração do extrato, o que motivou a continuação dos experimentos. A Figura 4.4 (meramente ilustrativa) ajuda na visualização.

Tabela 4.4. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7).

Grupo	ATL (mm²)	ARL (%)
100 mg/kg	142,69 ± 28,65	11,62 ± 2,13
200 mg/kg	60,53 ± 30,91	5,09 ± 2,35
400 mg/kg *	11,23 ± 3,61	1,07 ± 0,34
água	80,55 ± 25,41	6,66 ± 1,95
lansoprasol	62,26 ± 25,62	5,52 ± 2,03

* Diferença em relação ao grupo de 100 mg/kg, teste de Tukey, p < 0,05.

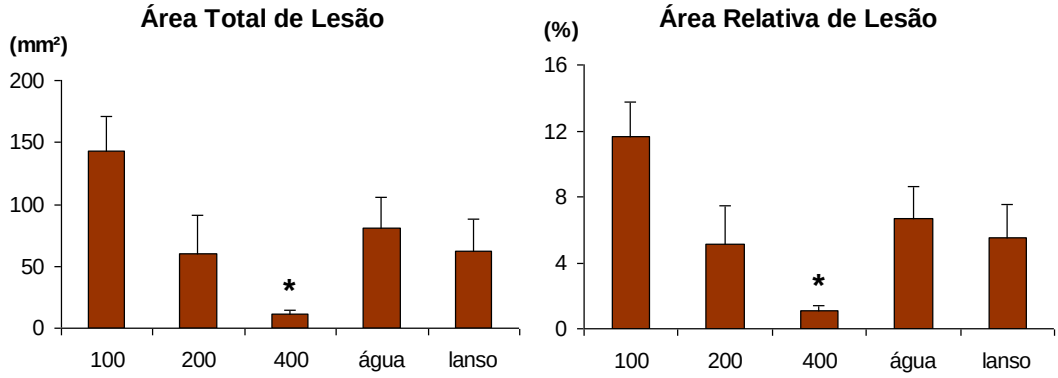


Figura 4.3. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7).
* Diferença em relação ao grupo de 100 mg/kg, teste de Tukey, p < 0,05.

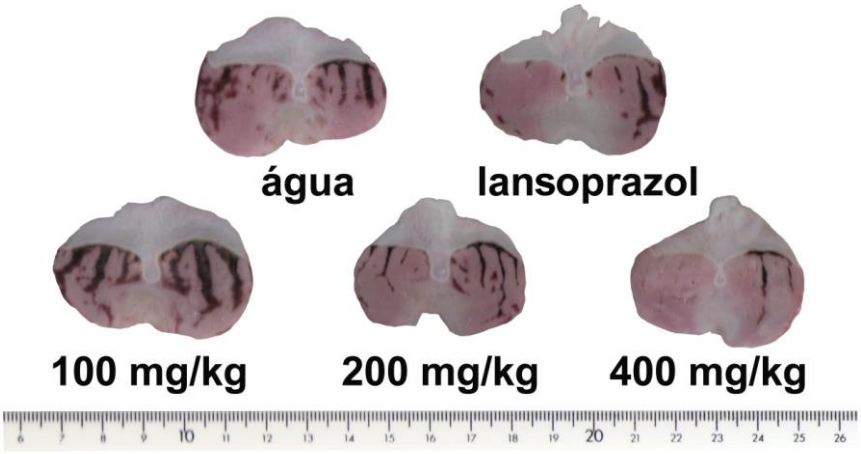


Figura 4.4. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Foi escolhido apenas um estômago para representar cada grupo, somente para ilustrar a aparência dos resultados. Escala em centímetros.

4.2.1.3. Frações do extrato de raízes

Após o fracionamento, os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (Tabela 4.5 e Figura 4.5). As frações acetato de etila e clorofórmica promoveram maior inibição na formação de lesões. A Figura 4.6 ilustra o resultado do experimento.

Tabela 4.5. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com frações do extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7).

Grupo	ATL (mm²)	ARL (%)
acetato de etila *	19,47 ± 6,35	1,72 ± 0,51
clorofórmio *	50,80 ± 28,66	4,24 ± 2,58
etanol	105,60 ± 51,99	8,77 ± 4,12
etanol 50% *	92,86 ± 33,73	7,47 ± 2,58
água	232,81 ± 45,96	18,08 ± 3,52
lansoprazol *	32,27 ± 18,53	3,00 ± 1,67

* Diferença em relação ao controle negativo, teste de Tukey, $p < 0,05$.

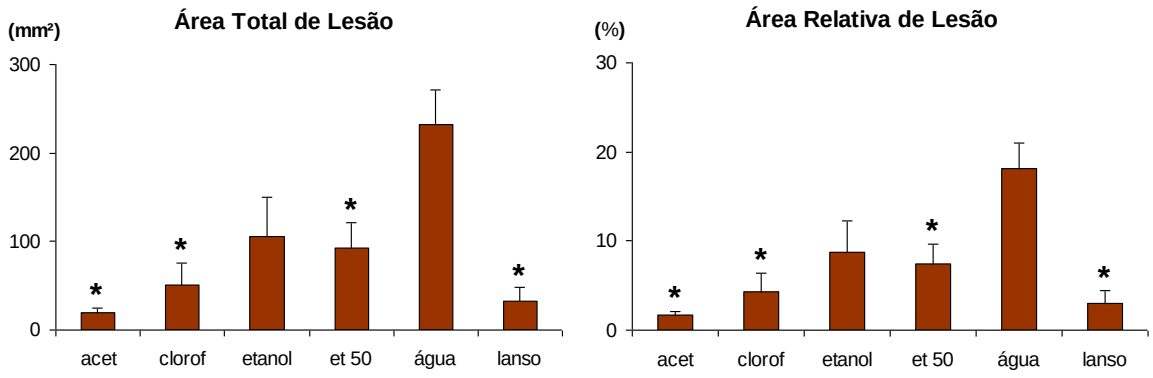


Figura 4.5. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com frações do extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7). ***** Diferença em relação ao controle negativo, teste de Tukey, $p < 0,05$.

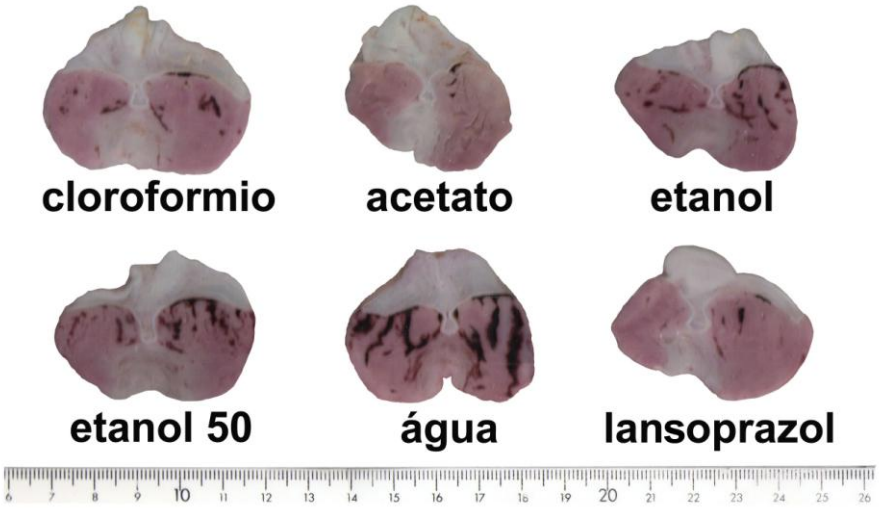


Figura 4.6. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com frações do extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por etanol acidificado. Foi escolhido apenas um estômago para representar cada grupo, somente para ilustrar a aparência dos resultados. Escala em centímetros.

4.2.2. Modelo de indução por indometacina

O extrato bruto de raízes não demonstrou diferença significativa em relação ao controle negativo, como demonstrado na Tabela 4.6 e na Figura 4.7. Houve a formação de pequenas lesões e com grande variação entre elementos do mesmo grupo, o tamanho das lesões pode ser visto na Figura 4.8.

Tabela 4.6. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7).

Grupo	ATL (mm²)	ARL (%)
100 mg/kg	1,03 ± 0,54	0,11 ± 0,05
200 mg/kg	5,07 ± 2,21	0,47 ± 0,20
400 mg/kg	0,98 ± 0,55	0,10 ± 0,06
água	4,92 ± 2,82	0,54 ± 0,30
lansoprazol	0,17 ± 0,20	0,02 ± 0,02

A ANOVA não apresentou diferença significativa entre os grupos.

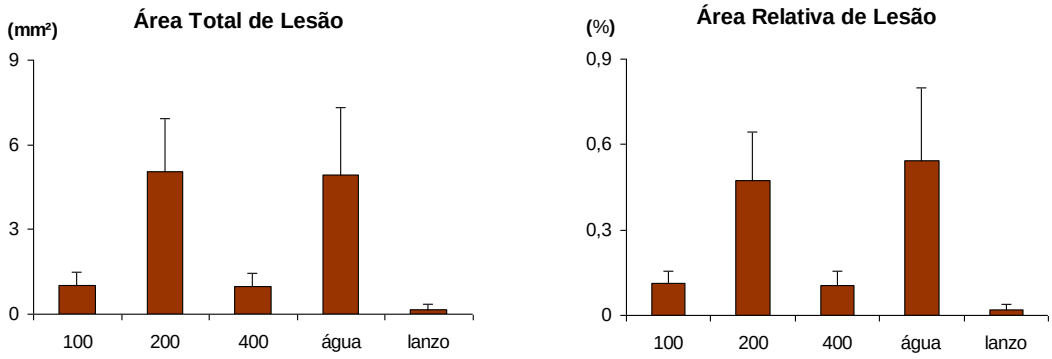


Figura 4.7. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por indometacina. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7). A ANOVA não apresentou diferença significativa entre os grupos.

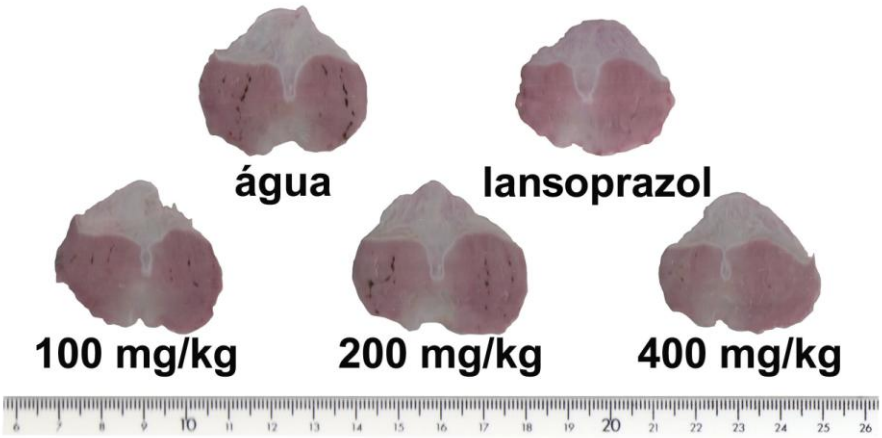


Figura 4.8. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por indometacina. Foi escolhido apenas um estômago para representar cada grupo, somente para ilustrar a aparência dos resultados. Escala em centímetros.

4.2.3. Modelo de ligadura do piloro

Com o modelo de ligadura do piloro, foram obtidos os resultados expostos na Tabela 4.7 e na Figura 4.9. Nenhuma dose do extrato exibiu diferença em relação ao controle negativo em nenhum dos 3 parâmetros verificados. Apenas a cimetidina elevou o pH com diferença significativa.

Tabela 4.7. Volume de Secreção Gástrica (VSG, em mL), pH da Secreção Gástrica e Acidez Total (AT, $[H^+]$ em $mol.L^{-1}$) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de ligadura do piloro. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7).

Grupo	VSG (mL)	pH	AT($[H^+]$ em $mol.L^{-1}$)
100 mg/kg	1,07 ± 0,11	3,23 ± 0,14 **	(4,43 ± 0,35) x 10^{-2}
200 mg/kg (n=6)	0,65 ± 0,10 *	3,54 ± 0,05	(5,75 ± 0,96) x 10^{-2}
400 mg/kg	0,71 ± 0,07	3,41 ± 0,13 **	(4,42 ± 0,70) x 10^{-2}
água (n=6)	0,85 ± 0,07	3,29 ± 0,11 **	(3,96 ± 0,57) x 10^{-2}
cimetidina	0,81 ± 0,09	4,01 ± 0,19	(3,63 ± 0,57) x 10^{-2}

* Diferença em relação ao grupo de 100 mg/kg, teste de Tukey, $p < 0,05$.

** Diferença em relação ao controle positivo, teste de Tukey, $p < 0,05$.

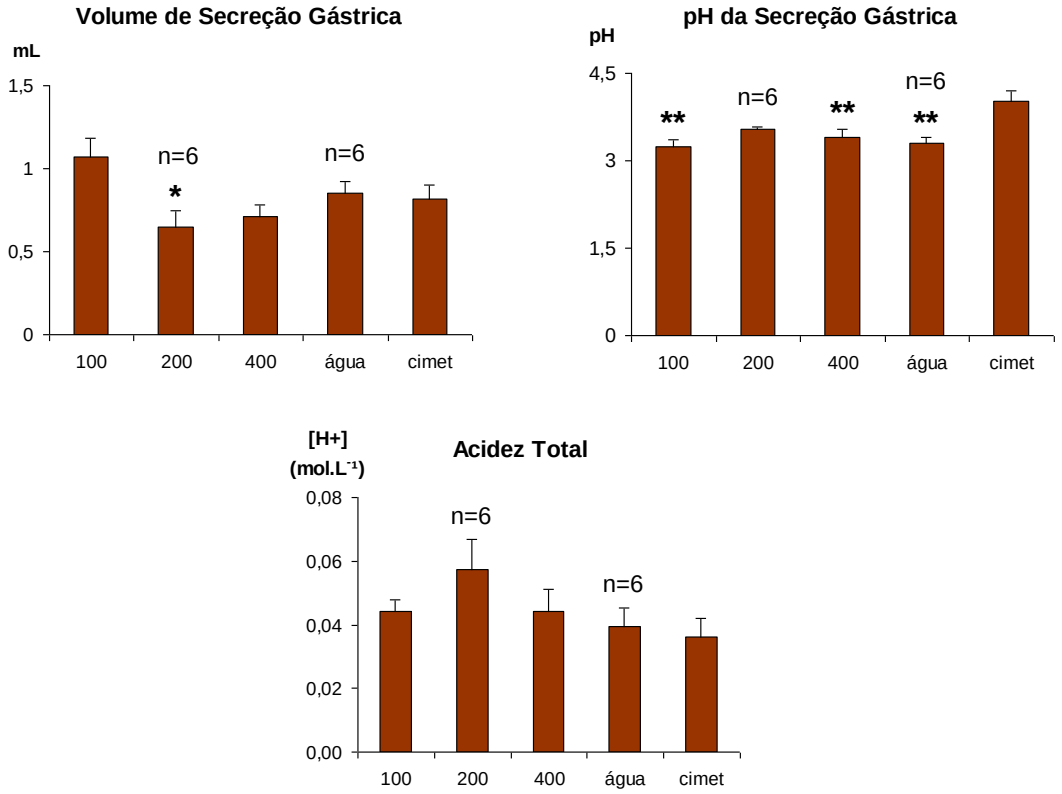


Figura 4.9. Gráficos representativos do Volume de Secreção Gástrica (VSG, em mL), pH da Secreção Gástrica e Acidez Total (AT, $[H^+]$ em $mol.L^{-1}$) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de ligadura do piloro. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7). * Diferença em relação ao grupo de 100 mg/kg. ** Diferença em relação ao controle positivo. Teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

4.2.4. Modelo de indução por ácido acético

No ensaio onde foi utilizado esse modelo de indução, tanto a dose de 200 mg/kg, quanto a de 400 mg/kg apresentaram diferença em relação ao controle negativo ao promover a redução da área de lesão ulcerativa. O controle positivo (cimetidina) demonstrou menor atividade, sem exibir diferença significativa. Os dados estão dispostos na Tabela 4.8 e na Figura 4.10. A Figura 4.11 ilustra a aparência dos estômagos.

Tabela 4.8. Área Total de Lesão (ATL, em mm²) e Área Relativa de Lesão (ARL, em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7).

Grupo	ATL (mm²)	ARL (%)
100 mg/kg	60,05 ± 11,12	5,48 ± 0,86
200 mg/kg *****	28,95 ± 8,55	2,91 ± 0,92
400 mg/kg *****	25,97 ± 5,67	2,56 ± 0,54
água	70,44 ± 8,91	6,80 ± 0,74
cimetidina (n=5)	39,63 ± 9,42	3,84 ± 1,05

* Diferença em relação ao controle negativo, teste de Tukey, p ≤ 0,05.

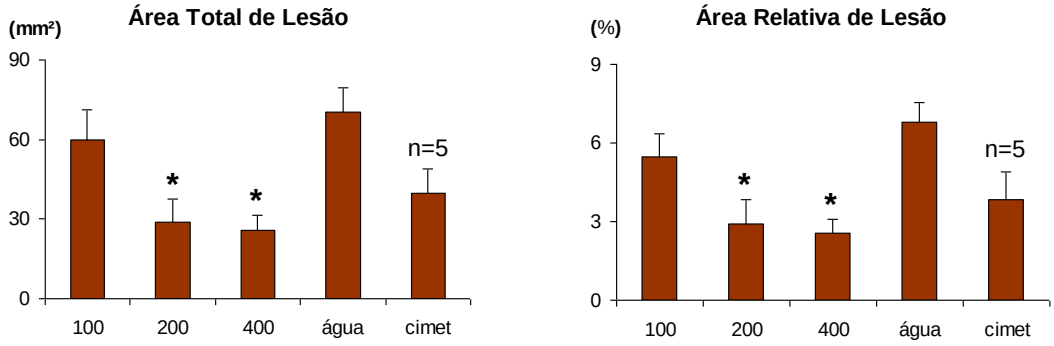


Figura 4.10. Gráficos representativos da Área Total de Lesão (em mm²) e Área Relativa de Lesão (em %) do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético. Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n=7).

* Diferença em relação ao controle negativo, teste de Tukey, p ≤ 0,05.

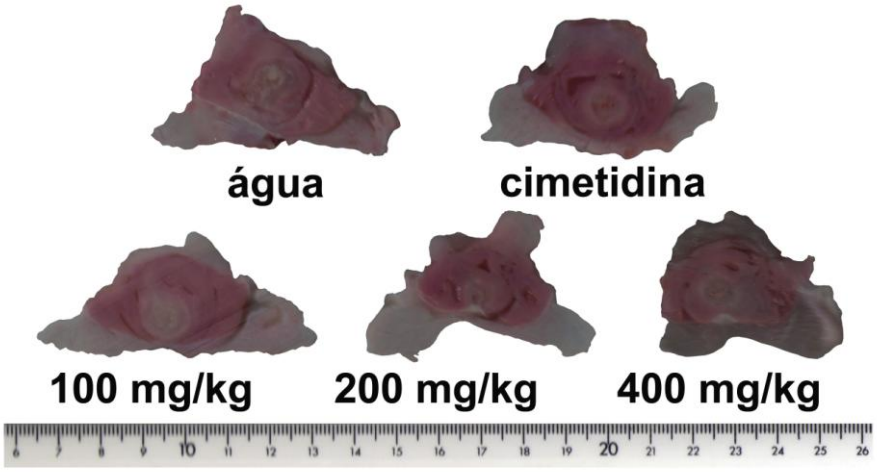


Figura 4.11. Ilustração com fotos de estômagos do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético. Foi escolhido apenas um estômago para representar cada grupo, somente para ilustrar a aparência dos resultados. Escala em centímetros.

A análise histológica revelou diferenças entre o grupo que recebeu a dose de 400 mg/kg e o controle negativo. Foi realizada uma avaliação semi-quantitativa (comparação subjetiva) por meio de escore. Os dados estão organizados na Tabela 4.9. Não foram colocados os dados de todos os estômagos, pois alguns cortes se mostraram inadequados para análise. Nas Figuras 4.12 e 4.13 observa-se lâminas dos grupos onde foram observadas as diferenças.

Tabela 4.9. Avaliação por escore da presença de necrose e infiltrado inflamatório no fundo da lesão ulcerativa (porção superficial, desprovida de mucosa) nas lâminas dos estômagos do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético. **L1** a **L6** - Lâminas. Os dados foram ordenados pela ordem de severidade da lesão. Os espaços em branco representam cortes inadequados para análise.

Grupo	L1	L2	L3	L4	L5	L6
100 mg/kg	++++	++++	+++	++	++	+
200 mg/kg	++++	++++	++			
400 mg/kg	++	++	++	+	+	
água	++++	++++	++++	++++		
cimetidina (n=5)	++++	++				

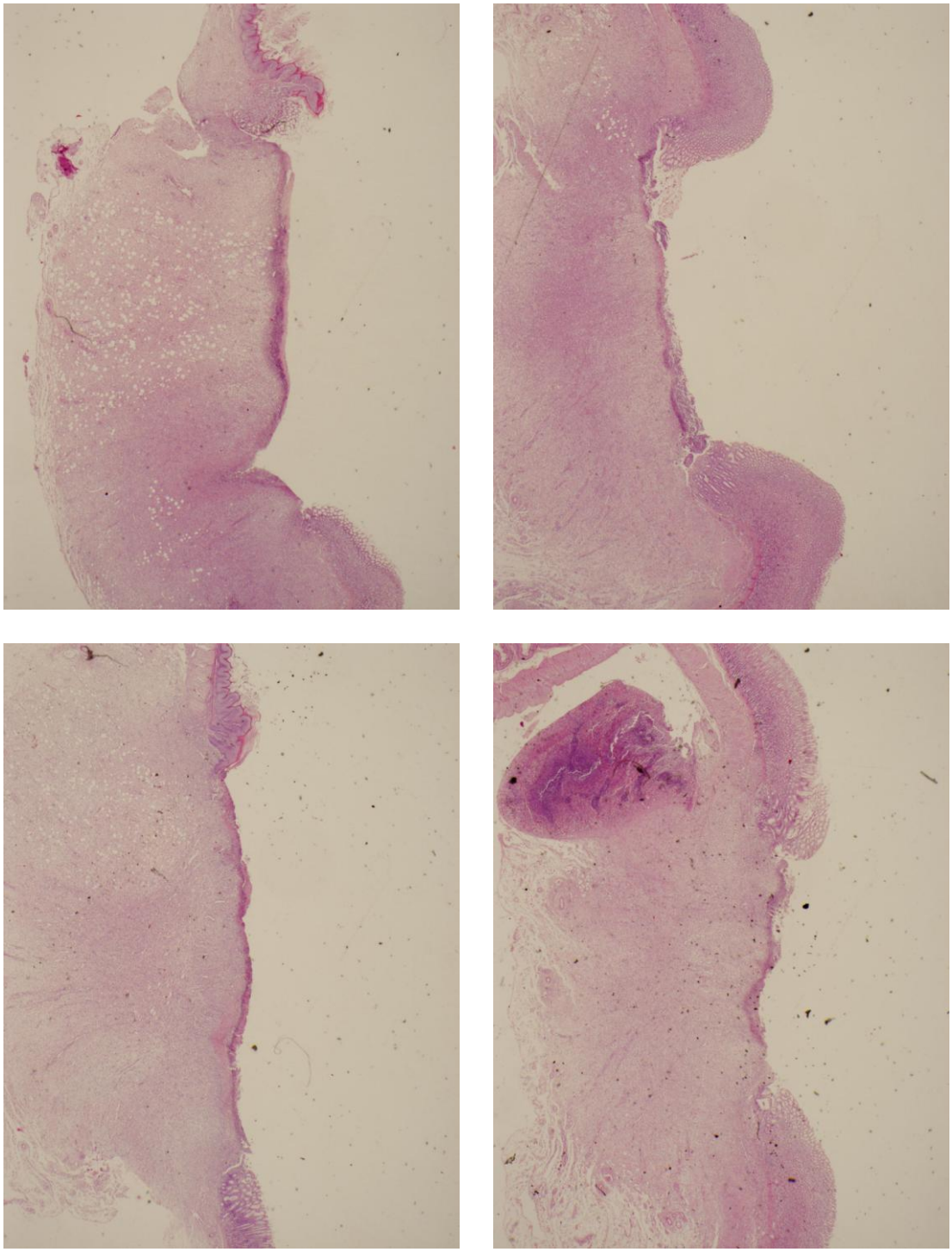


Figura 4.12. Fotos das lâminas histológicas do grupo controle negativo do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético. Presença de necrose e infiltrado inflamatório no fundo da lesão ulcerativa (porção superficial, desprovida de mucosa). O lúmen do estômago encontra-se voltado para a direita. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 1,6 x.

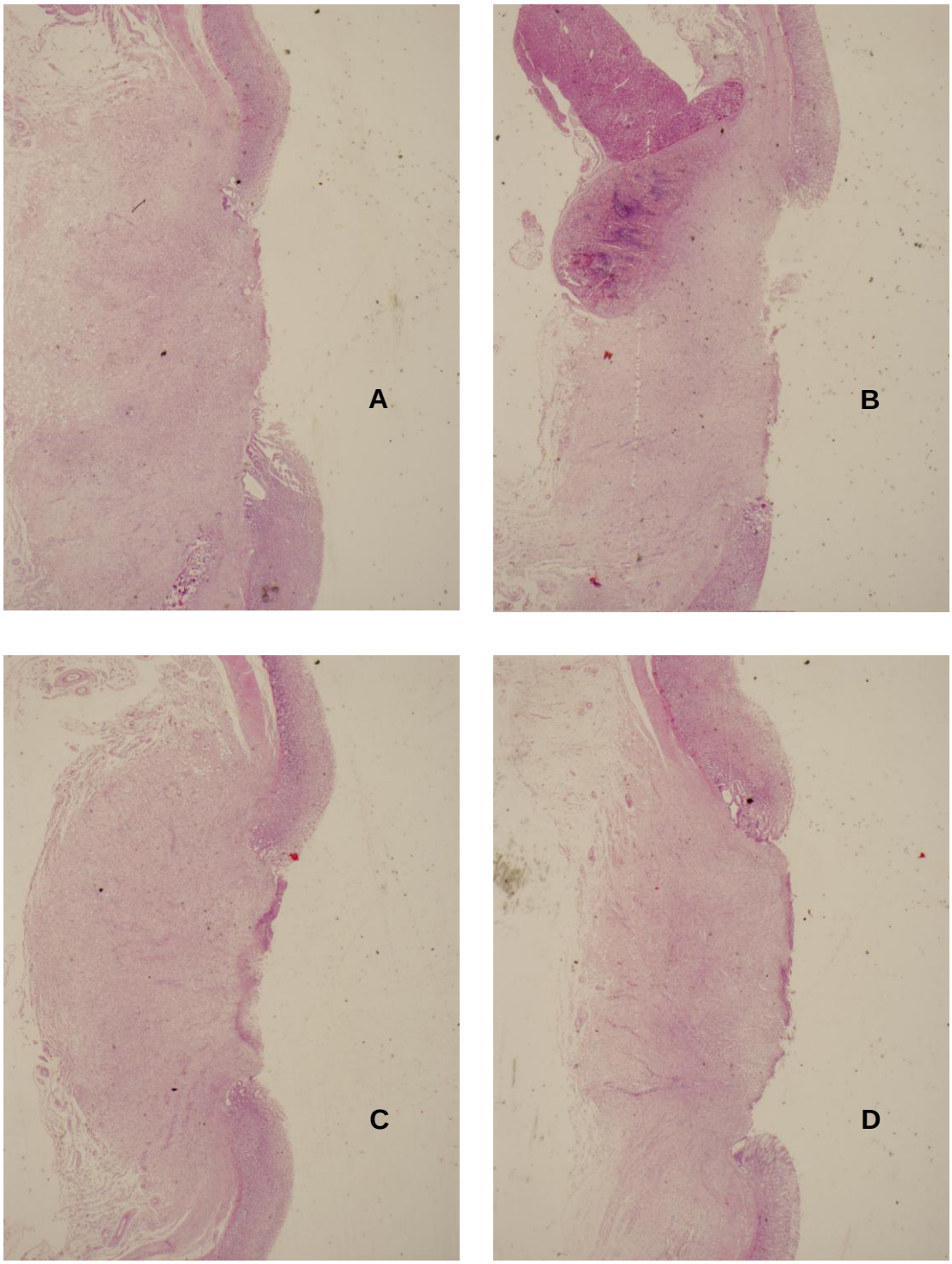


Figura 4.13. Fotos das lâminas histológicas do grupo 400mg/kg do ensaio com extrato de raízes de *P. umbellata*, em modelo de indução por ácido acético. Os estômagos em A e B apresentam menor presença de necrose e infiltrado inflamatório no fundo da lesão ulcerativa (porção superficial, desprovida de mucosa) que C e D. O lúmen do estômago encontra-se voltado para a direita. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 1,6 x.

4.3. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência

No preparo do extrato para o fracionamento, foram obtidos 182,67 g de EB (6,33% de rendimento) e 3,2783 g da fração acetato de etila (1,85% em relação ao extrato, 0,11% em relação à droga). Na Tabela 4.10, estão mostrados os rendimentos das frações obtidas durante o processo de separação.

Tabela 4.10. Rendimentos das frações obtidas por cromatografia em coluna a partir da fração acetato de etila, em relação à massa de droga vegetal. O rendimento do processo de separação foi de 90,70%.

Fração	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
40	0,4139	0,0143
65-1	0,2178	0,00755
65-2	0,2389	0,00828
100	2,1030	0,0729

A análise inicial da fração acetato de etila está ilustrada na Figura 4.14. Na Figura 4.15 observa-se o cromatograma referente à corrida otimizada para a fração 65-2, obtida após separação em coluna aberta. Há 5 picos de maior intensidade, que foram selecionados como parâmetro para melhorar a separação. De acordo com a análise de pureza do detector PDA, 3 desses picos apresentaram melhor separação, cujos espectros UV-Vis (numerados conforme o cromatograma) estão detalhados na Figura 4.16. A separação da fração 65-2 realizada no sistema semi-preparativo forneceu o cromatograma apresentado na Figura 4.17.

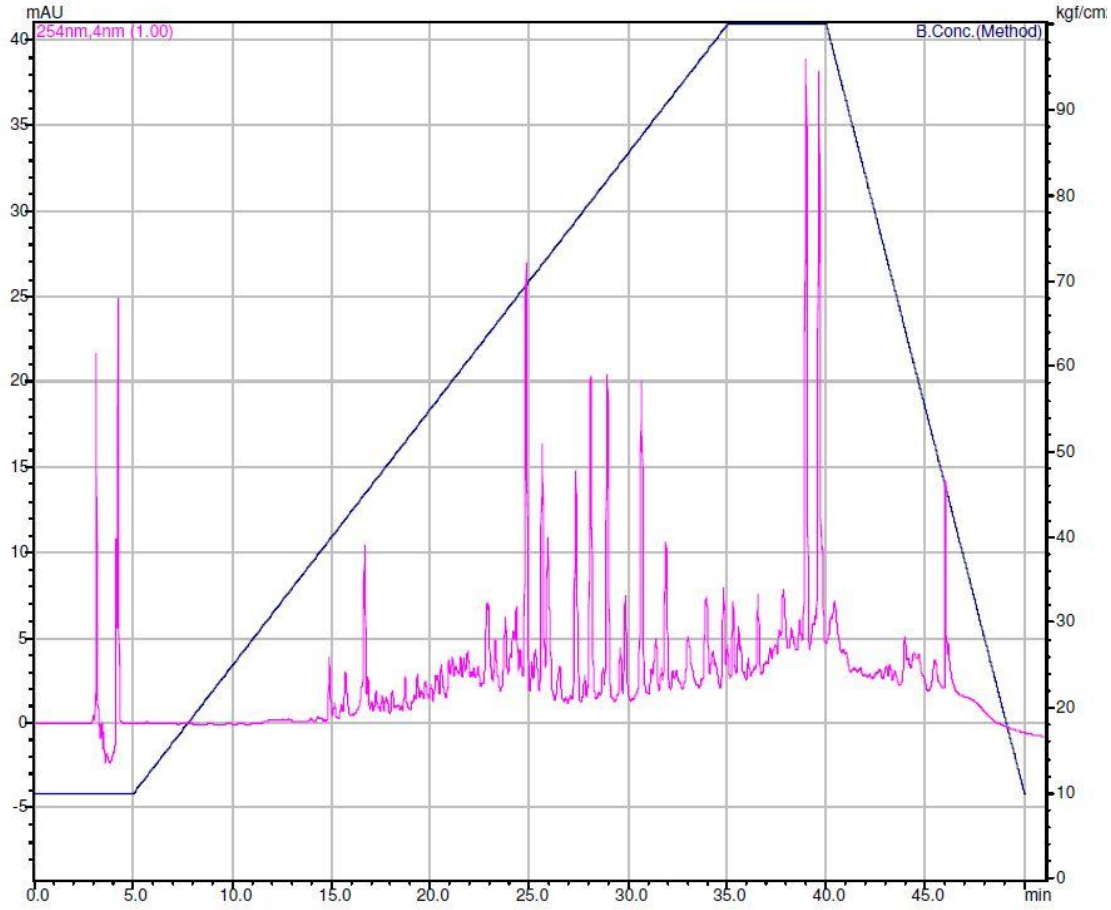


Figura 4.14. Cromatograma da fração acetato de etila (1 mg/mL) obtida a partir do extrato de raízes de *P. umbellata*. Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Shim-Pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Gradiente de ACN em H_2O+TFA 0,1%, 10 - 100% B em 30 minutos.

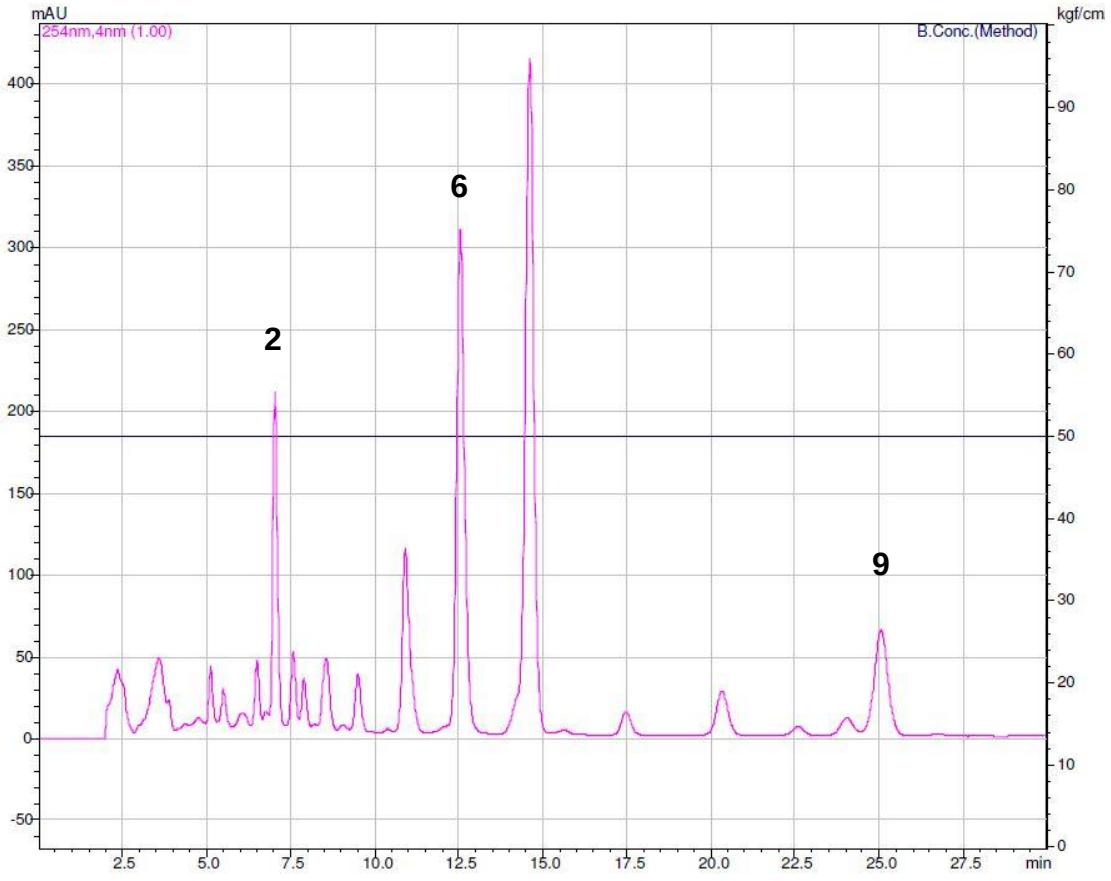


Figura 4.15. Cromatograma da fração 65-2 (1 mg/mL) obtida a partir do extrato de raízes de *P. umbellata*. Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Shim-Pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Fase móvel ACN 50% em água acidificada com TFA 0,1%. Os picos numerados apresentaram melhor separação.

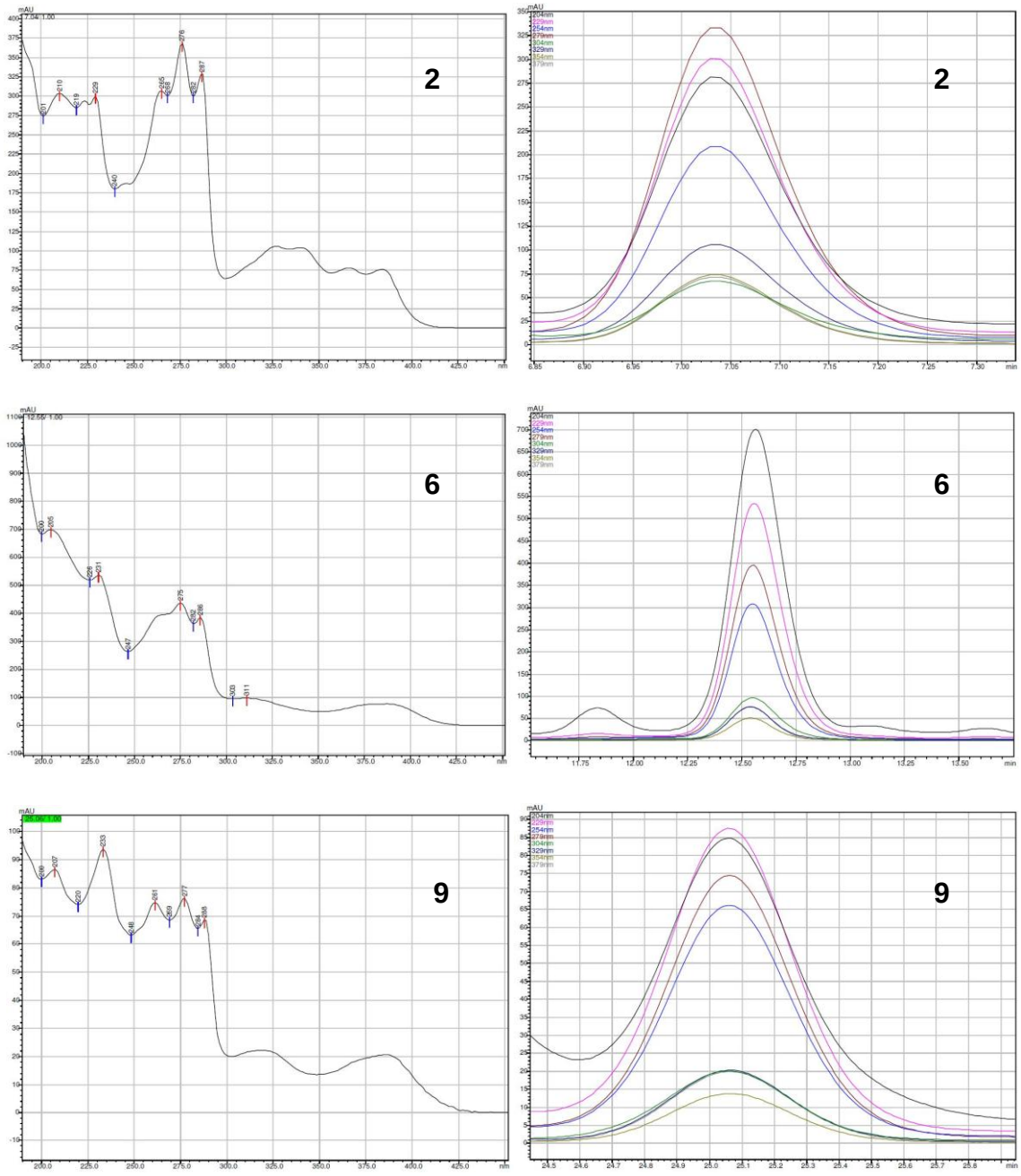


Figura 4.16. Espectros UV-Vis para os picos que apresentaram melhor separação no cromatograma da fração 65-2 do extrato de raízes de *P. umbellata.* À esquerda, espectro UV-Vis (unidades de absorbância x comprimento de onda). À direita, cromatograma dos picos em diferentes comprimentos de onda simultâneos para auxiliar na avaliação da pureza.

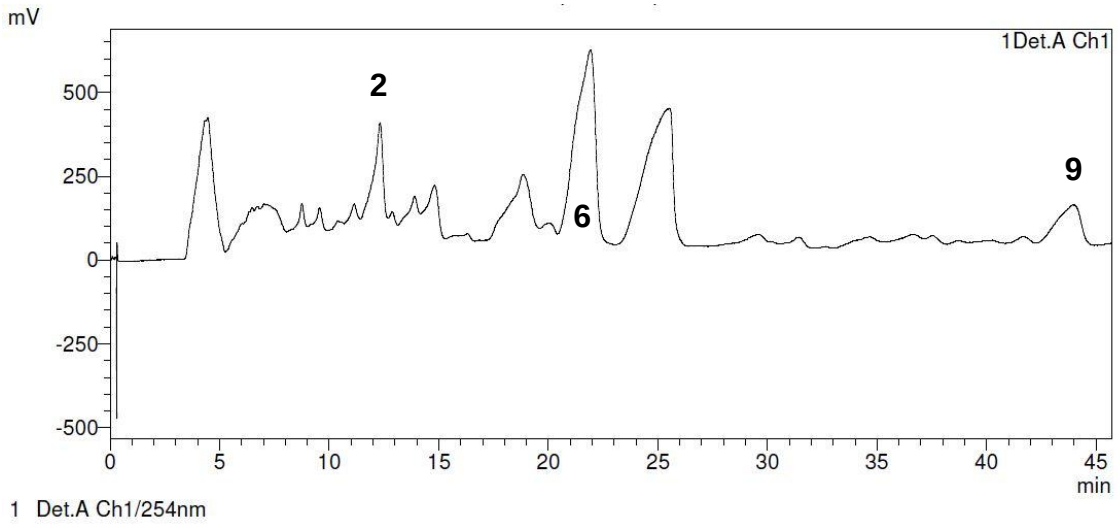


Figura 4.17. Cromatograma da fração 65-2 (50 mg/mL) obtida a partir do extrato de raízes de *P. umbellata*. Equipamento Shimadzu LC-6AD, loop de 1000 µL, detector UV-Vis em 254 nm, fluxo de 10 mL/min e coluna C18 Shim-Pack PREP-ODS de 250 mm x 20 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Fase móvel ACN 50% em água acidificada com TFA 0,1%. Os picos numerados apresentaram melhor separação.

4.3.1. Identificação das frações

4.3.1.1. Fração 2

A fração 2 (6,8 mg) é constituída por uma molécula (Figura 4.18) previamente isolada por Tabopda (2008), denominada piperumbellactama B (lactama do ácido-10-amino-4,*N*-di-hidroxi-3-metoxifenatren-1-carboxílico). Apresenta-se em forma de pó. O espectro UV em ACN:H_2O (1:1) apresenta picos de absorção em 210, 229, 276 e 287 nm característicos de fenantreno substituído (SCOTT, 1964). A análise do espectro de RMN ^{1}H em CD_3OD, propõe uma estrutura com 6 hidrogênios aromáticos, sendo 2 singletos (7,7 ppm e 7,1 ppm), 4 hidrogênios de um sistema complexo e um singleto em 4,1 ppm característico de metoxila. O espectro de RMN ^{1}H em DMSO-d_6 (Figura 4.19) apresenta um sinal em 10,66 ppm de hidroxila ligada a um nitrogênio, sinais em 9,3 ppm, 7,9 ppm, 7,8 ppm, 7,5 ppm e 7,1 ppm de um sistema na região aromática e um sinal de metoxila em 4,05 ppm. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.20) apresenta sinais de 15 carbonos, sinal em 57,106 ppm de

metoxila e um sinal em 168,8 ppm característico de carbonila de lactama cíclica. O espectro de DEPT (Figura 4.21) apresenta carbonos hidrogenados, confirmando a presença de carbonos CH aromáticos com deslocamentos químicos 104,3 ppm, 108,5 ppm, 124,8 ppm, 126,5 ppm, 126,9 ppm e 128,6 ppm. Observa-se também que a molécula não apresenta carbonos CH_2. Comparando os espectros de RMN ^{13}C com o DEPT conclui-se que a molécula possui 8 carbonos quaternários. O espectro de COSY (Figura 4.22) apresenta as correlações dos hidrogênios com deslocamento químico de 9,3 ppm com os de 7,9 ppm e 7,5 ppm e acoplamento do hidrogênio de 7,9 ppm com o de 7,5 ppm. Ao reunir os dados chega-se à conclusão que correspondem a uma aristolactama com esqueleto fenantrênico *N*-hidroxilada, apresentando uma metoxila como substituinte. O espectro de HSQC (Figura 4.23) apresenta as correlações dos hidrogênios com os carbonos tais como: 7,8 ppm com 108,5 ppm; 9,3 ppm com 126,9 ppm; 7,5 ppm com 124,8 ppm; 7,5 ppm com 126,5 ppm; 7,9 ppm com 128,6 ppm; 7,1 ppm com 104,3 ppm e 4,1 ppm com 57,1 ppm. O espectro HMBC (Figura 4.24) apresenta as correlações do hidrogênio em 10,66 ppm com C-10, C-11, C-1, C-4a, C-8a, H-5 com C-8a, H-8 com C-5, C-6, H-2 com C-3, C-4, C-4a, H-9 com C-5a, C-8, C-8a. Os dados estão resumidos nas Tabelas 4.11 e 4.12.

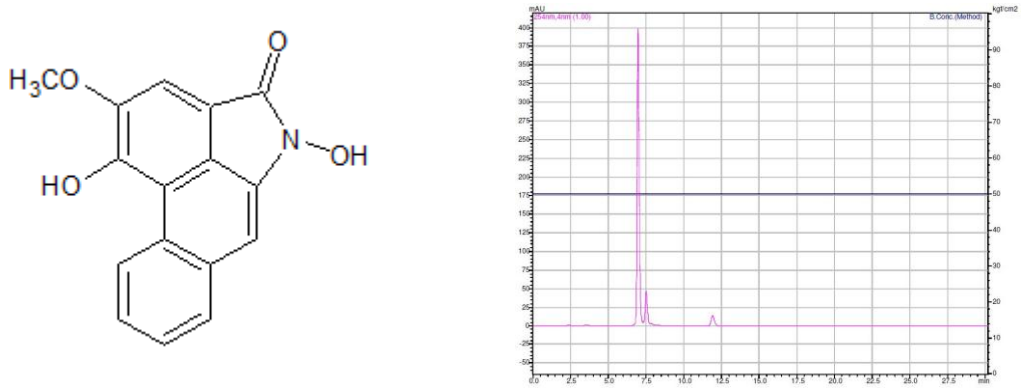


Figura 4.18. Estrutura da molécula presente na fração 2 do EB de *P. umbellata* e cromatograma correspondente. Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Shim-Pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Fase móvel ACN 50% em água acidificada com TFA 0,1%.

Tabela 4.11. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (300 e 75 MHz) da fração 2 do EB de *P. umbellata*, em comparação aos obtidos por Tabopda (2008).

Posição	δ ^{1}H			δ ^{13}C	
	TABOPDA, 2008	**2 CD_3OD**	**2 DMSO-d_6**	**TABOPDA, 2008**	**2 DMSO-d_6**
1	-	-	-	114,9	114,3
2	7.77	7,7	7,8	109,0	108,5
3	-	-	-	149,9	149,2
4	-	-	-	148,7	148,1
4a	-	-	-	124,8	124,2
5	9,27	9,3	9,3	125,4	126,9
5a	-	-	-	127,2	126,6
6	7,54	7,5	7,5	127,1	124,8
7	7,54	7,5	7,5	127,9	126,5
8	7,93	7,8	7,9	129,2	128,6
8a	-	-	-	134,6	134,1
9	7,13	7,1	7,1	104,9	104,3
10	-	-	-	135,6	135,1
11	-	-	-	116,3	115,9
12	-	-	-	169,4	168,8
OCH_3	4,05	4,08	4,05	57,6	57,1
N-OH	10,66	-	10,7	-	-

Tabela 4.12. Dados de RMN DEPT, COSY, HSQC e HMBC (300 e 75 MHz, DMSO-d_6) da fração 2 do EB de *P. umbellata*.

Posição	**DEPT**	**COSY (H→H)**	**HSQC (H→C)**	**HMBC (H→C)**
1	-	-	-	-
2	CH	-	108,5	C-3, C-4, C-4a
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
4a	-	-	-	-
5	CH	H-6, H-7, H-8	126,9	C-8a
5a	-	-	-	-
6	CH	H-5, H-7, H-8	124,8	
7	CH	H-5, H-6, H-8	126,5	
8	CH	H-5, H-6, H-7	128,6	C-5,C-6
8a	-	-	-	-
9	CH	-	104,3	C-5a, C-8, C-8a
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
OCH_3	CH_3	-	57,1	C-3, C-4
N-OH	-	-	-	C-1, C- 4a, C-8a, C-10, C11

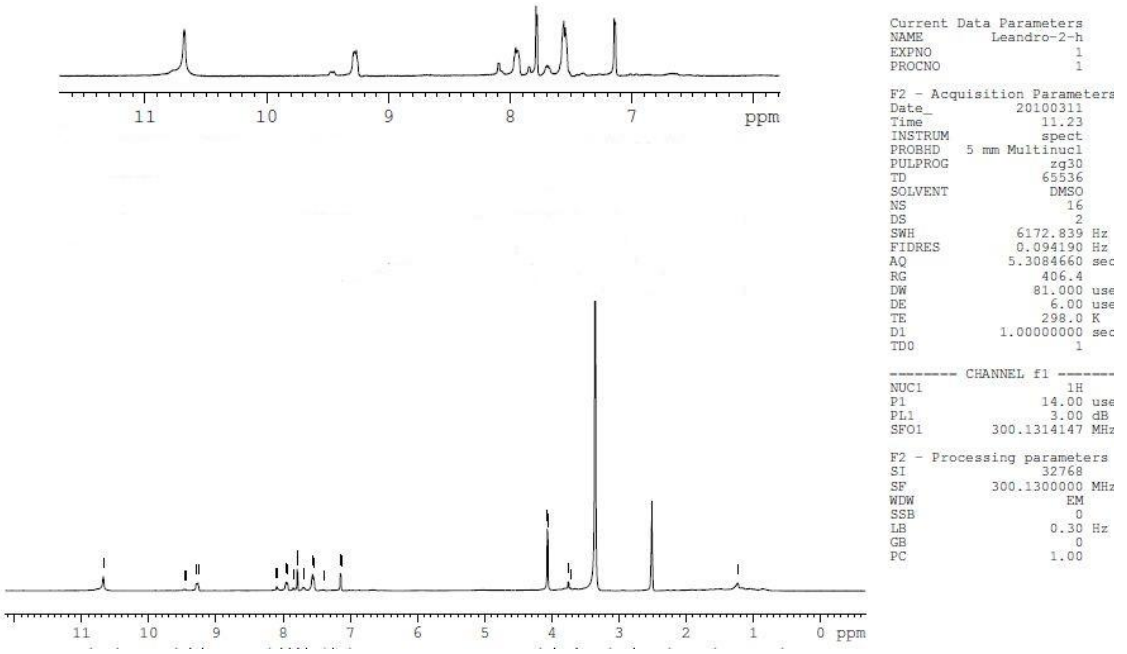


Figura 4.19. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata.*

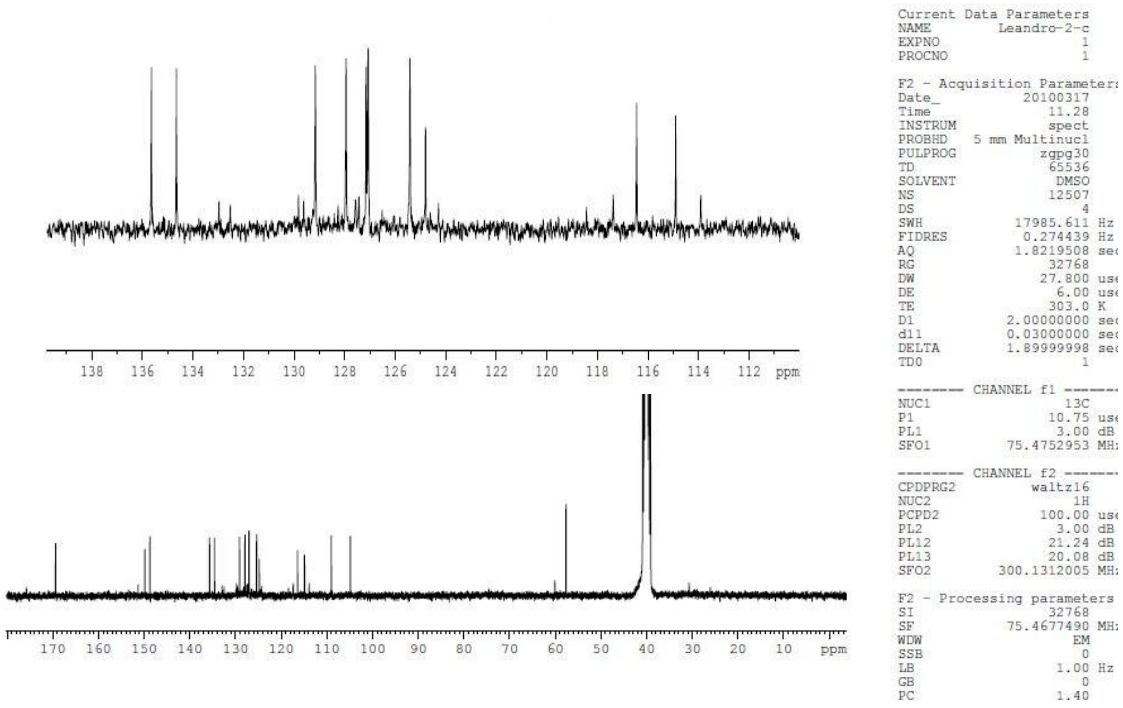
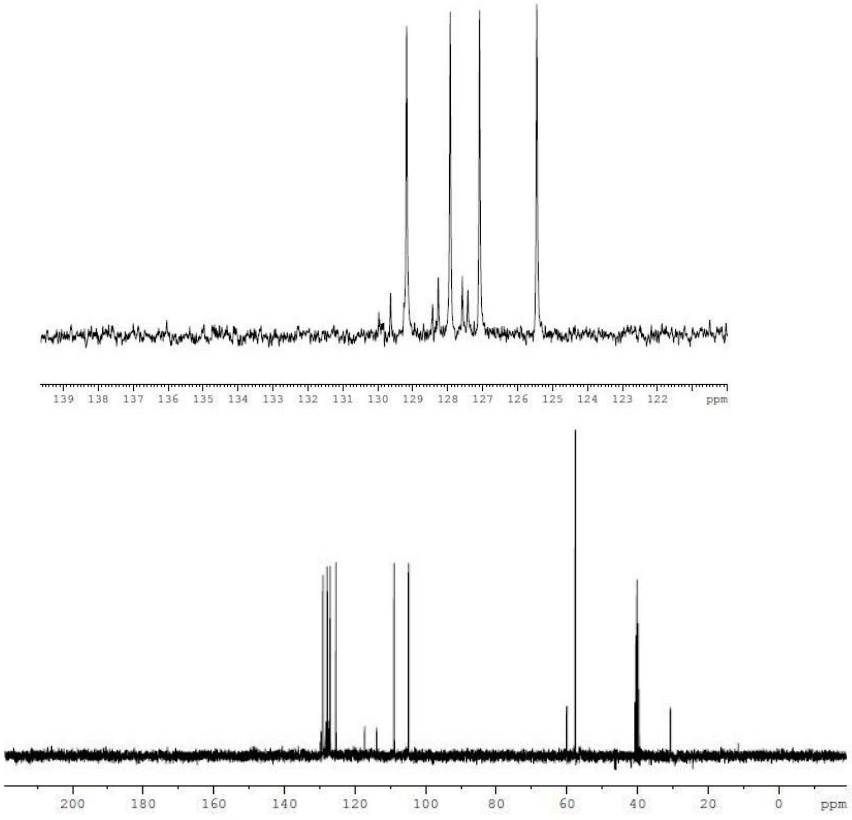


Figura 4.20. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata.*




```
Current Data Parameters
NAME      Leandro-2-dept
EXPNO                  1
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20100324
Time               15.44
INSTRUM            spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG         dept135
TD                65536
SOLVENT             DMSO
NS                16384
DS                    4
SWH           17985.611 Hz
FIDRES        0.274439 Hz
AQ            1.8219508 sec
RG                32768
DW               27.800 use
DE                6.00 use
TE              295.6 K
CNST2       145.0000000
D1            2.00000000 sec
d2            0.00344828 sec
d12           0.00002000 sec
DELTA         0.00001369 sec
TD0                   1

======== CHANNEL f1 =======
NUC1                 13C
P1                10.75 use
p2                21.50 use
PL1                3.00 dB
SFO1         75.4752953 MHz

======== CHANNEL f2 =======
CPDPRG2          waltz16
NUC2                 1H
P3                12.25 use
p4                24.50 use
PCPD2            100.00 use
PL2                3.00 dB
PL12              21.24 dB
SFO2        300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI                32768
SF           75.4677490 MHz
WDW                  EM
SSB                   0
LB                 1.00 Hz
GB                    0
PC                 1.40
```

Figura 4.21. Espectro de RMN DEPT (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata.*

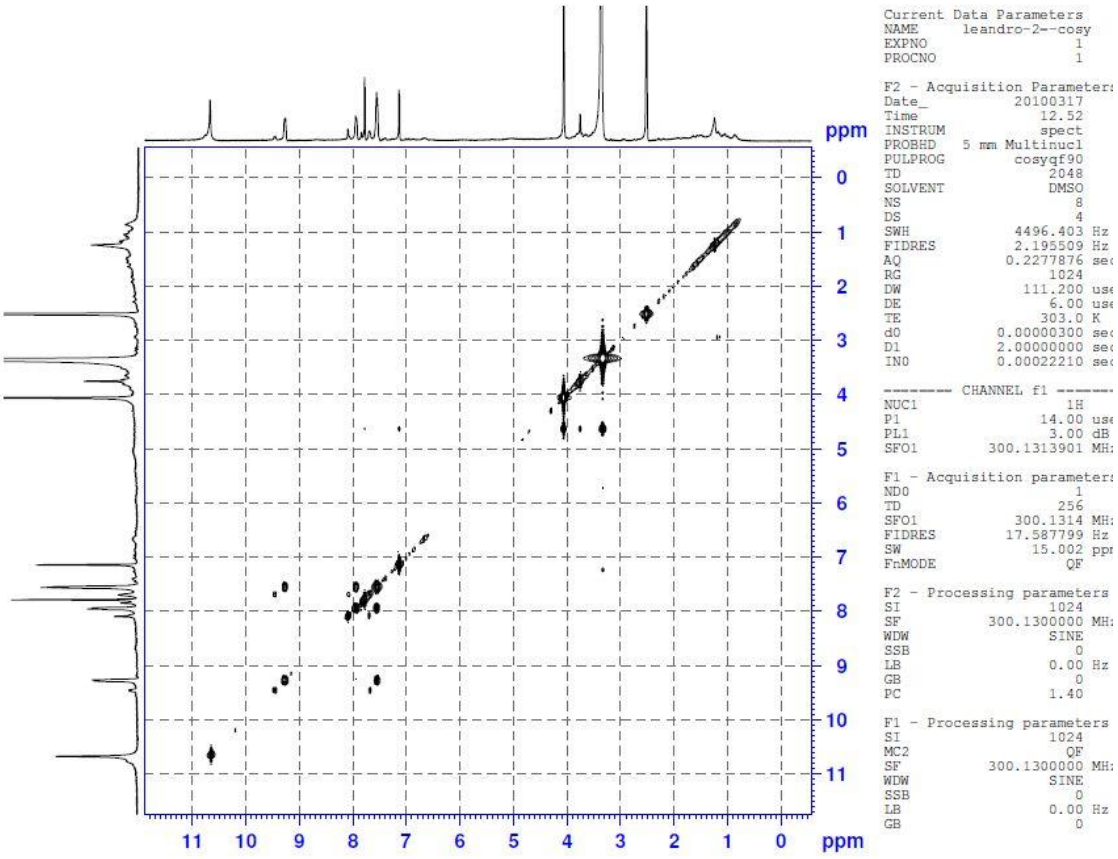


Figura 4.22. Espectro de RMN COSY (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata.*

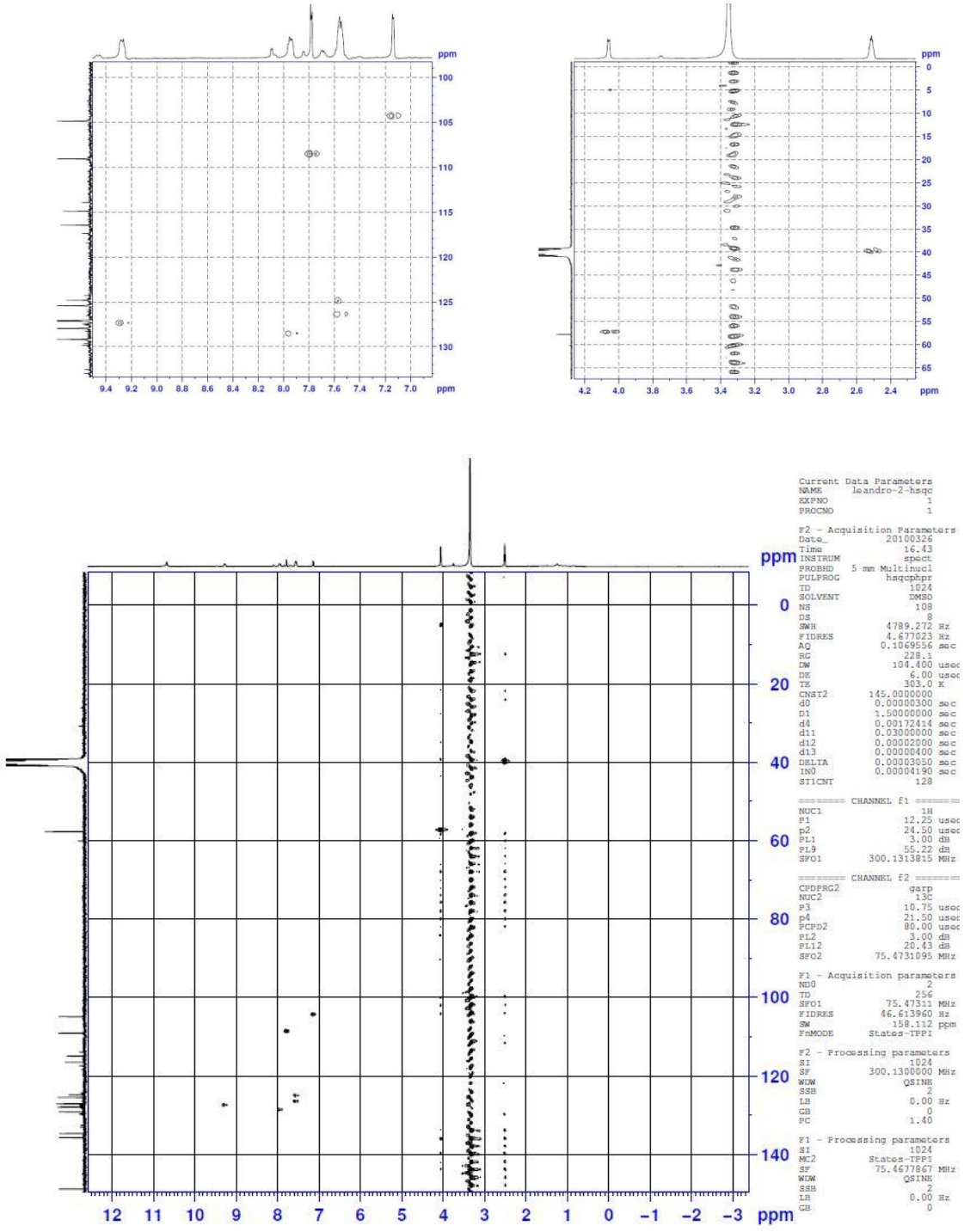


Figura 4.23. Espectro de RMN HSQC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata.*

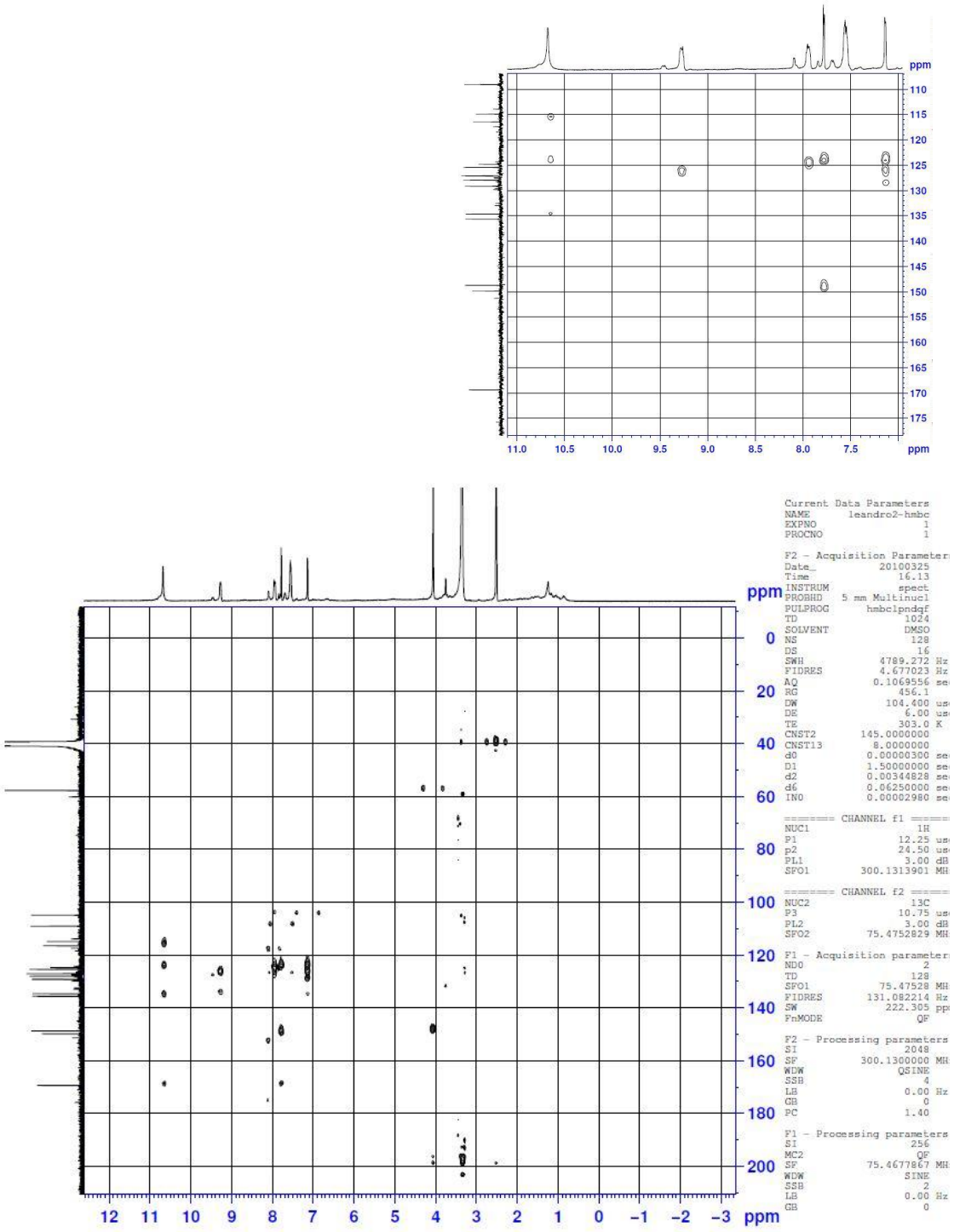
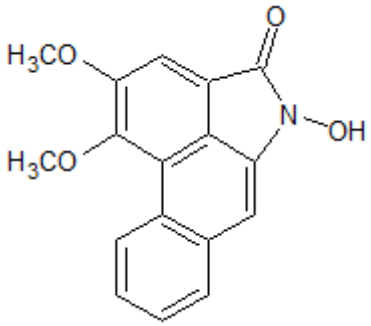


Figura 4.24. Espectro de RMN HMBC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 2 do EB de *P. umbellata.*

4.3.1.2. Fração 6

A fração 6 (14 mg) constitui uma mistura de duas substâncias, e uma delas é a molécula (Figura 4.25) previamente isolada por Tabopda (2008), denominada piperumbellactama A (lactama do ácido-10-amino-*N*-hidroxi-3,4-dimetoxi-fenantren-1-carboxílico). Apresenta-se em forma de pó. O espectro de RMN ^{1}H em DMSO-d_6 (Figura 4.26), apresenta sinais na região de aromáticos e deslocamentos químicos na região de metoxilas. O sinal em 10,9 ppm é muito semelhante ao sinal da hidroxila ligada ao nitrogênio na lactama da fração 2 e os sinais 7,1 (s) ppm (H-9), 7,6 (m) ppm (H-6 e H-7), 7,9 (s) ppm (H-2), 8,3 (d) ppm (H-8), 9,1 (d) ppm (H-5) são característicos de aristolactama. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.27) também apresenta sinais de uma mistura de compostos com elevado número de carbonos, observando-se sinal em 168,3 ppm característico de carbonila de lactama cíclica. O espectro de DEPT (Figura 4.28) possui sinais de carbonos hidrogenados (CH, CH_2, CH_3). O espectro de COSY (Figura 4.29) mostra correlações entre os hidrogênios H-5 e H-6; H-7 e H-8 e vice-versa. O espectro de HSQC (Figura 4.30) mostra a correlação dos hidrogênios com os carbonos enquanto o de HMBC (Figuras 4.31 e 4.32) mostra essas correlações à longa distância, auxiliando a confirmar a estrutura da aristolactama como sendo a que está relatada na literatura. Os dados estão resumidos nas Tabelas 4.13 e 4.14.



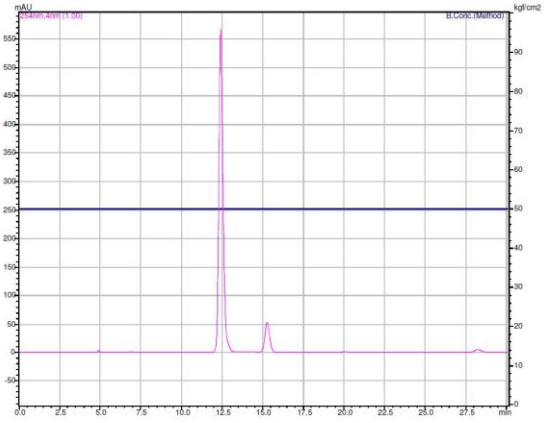


Figura 4.25. Estrutura da molécula presente na fração 6 do EB de *P. umbellata* e cromatograma correspondente. Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Shim-Pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Fase móvel ACN 50% em água acidificada com TFA 0,1%.

Tabela 4.13. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (300 e 75 MHz) da fração 6 do EB de *P. umbellata*, em comparação aos obtidos por Tabopda (2008).

Posição	δ ^{1}H		δ ^{13}C	
	TABOPDA, 2008	**6 DMSO-d_6**	**TABOPDA, 2008**	**6 DMSO-d_6**
1	-	-	122,0	121,5
2	7,88 s	7,9 s	110,4	109,8
3	-	-	154,7	154,2
4	-	-	150,9	150,3
4a	-	-	120,4	119,8
5	9,13 dd (*J* = 6, 3)	9,1 d (*J* = 7,8)	126,0	126,8
5a	-	-	126,4	125,9
6	7,58 m	7,6 m	127,3	125,4
7	7,58 m	7,6 m	128,0	127,4
8	7,96 dd (*J* = 6,3)	8,3 d (*J* = 7,5)	129,6	128,9
8a	-	-	135,3	134,8
9	7,15 s	7,1 s	105,1	104,6
10	-	-	135,6	135,1
11	-	-	123,8	123,3
12	-	-	168,9	168,3
3-OCH_3	4,06 s	4,05	57,4	56,9
4-OCH_3	4,04 s	3,9	60,4	59,9
N-OH	10,86 s	10,9	-	-

Tabela 4.14. Dados de RMN DEPT, COSY, HSQC e HMBC (300 e 75 MHz, DMSO-d_6) da fração 6 do EB de *P. umbellata*.

Posição	COSY (H→H)	DEPT	HSQC (H→C)	HMBC (H→C)
1	-	-	-	-
2	-	CH	109,8	C-3, C-4, C-11, C-12
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
4a	-	-	-	-
5	H6	CH	126,8	C-4a, C-5, C-8a
5a	-	-	-	-
6	H5	CH	125,4	C-5, C-8a
7	H8	CH	127,4	C-8a
8	H7	CH	128,9	C-9, C-6, C-8a
8a	-	-	-	-
9	-	CH	104,6	C-8a, C-10, C-11
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
3-OCH_3	-	CH_3	56,9	C-3, C-4
4-OCH_3	-	CH_3	59,9	-
N-OH	-	-	-	C-1, C-8a, C-11, C-12

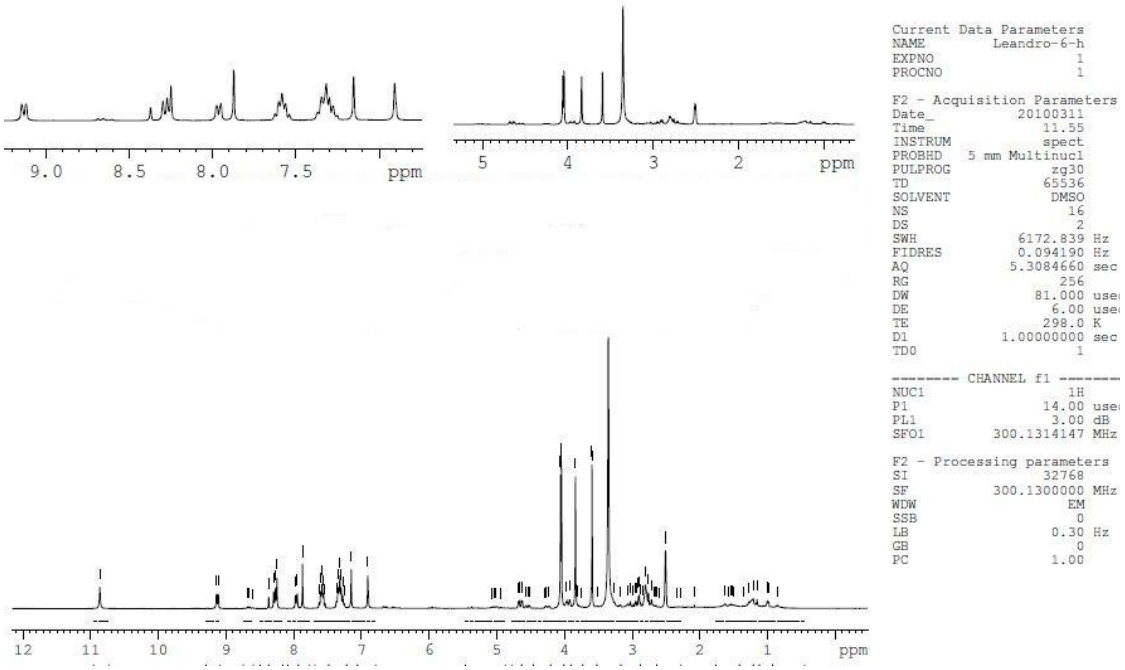


Figura 4.26. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*

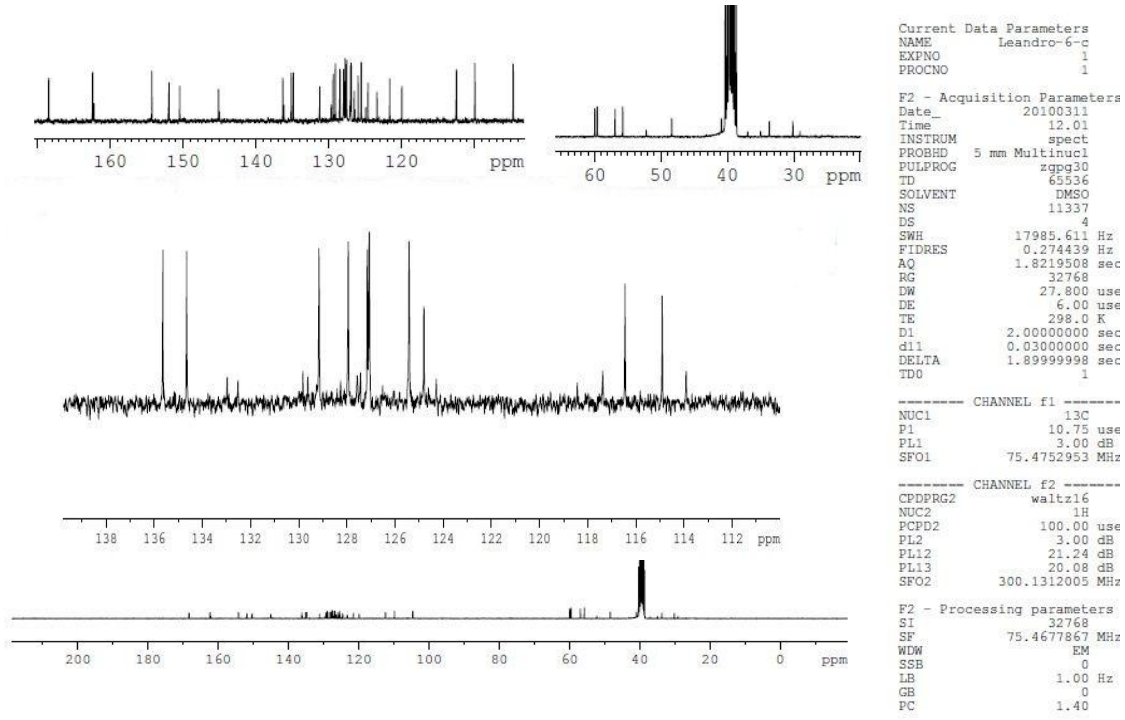


Figura 4.27. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*

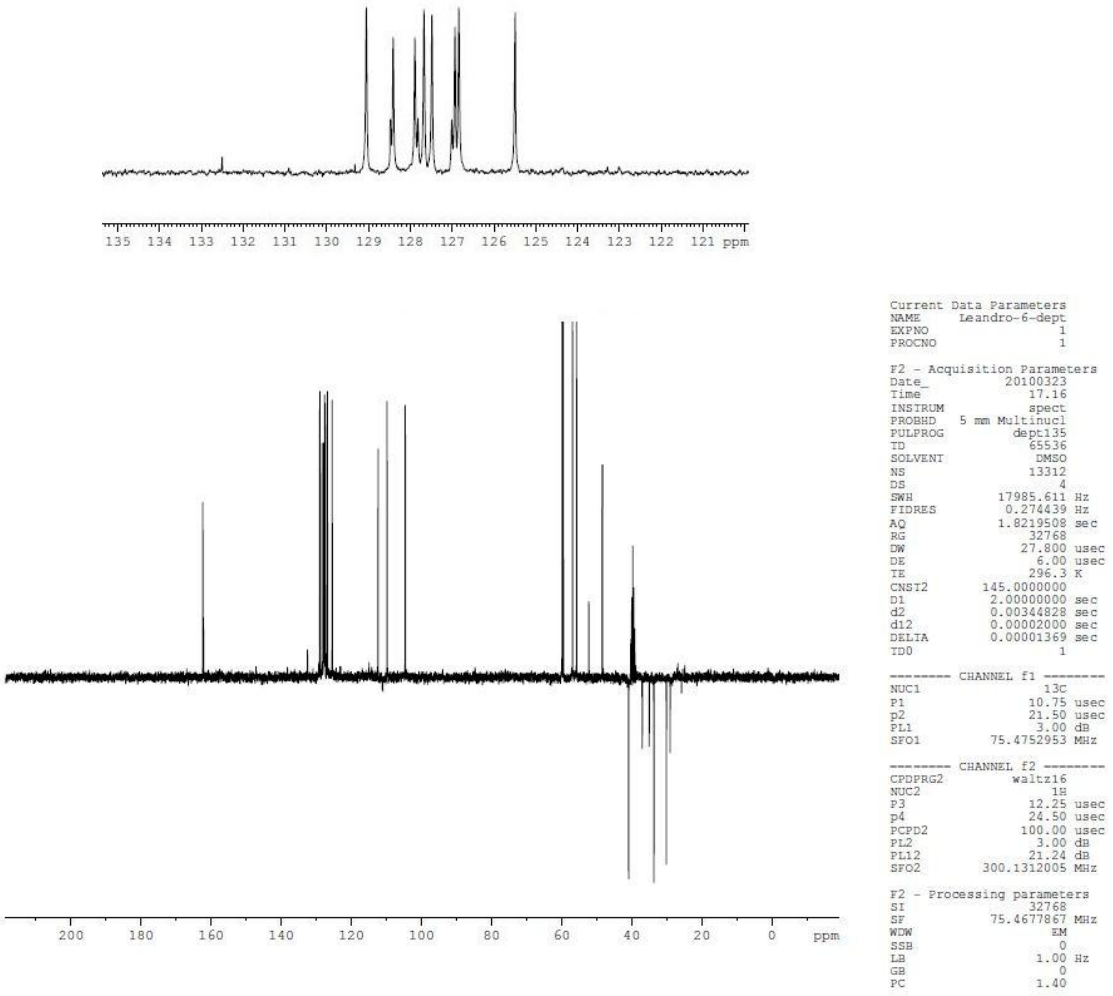


Figura 4.28. Espectro de RMN DEPT (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*

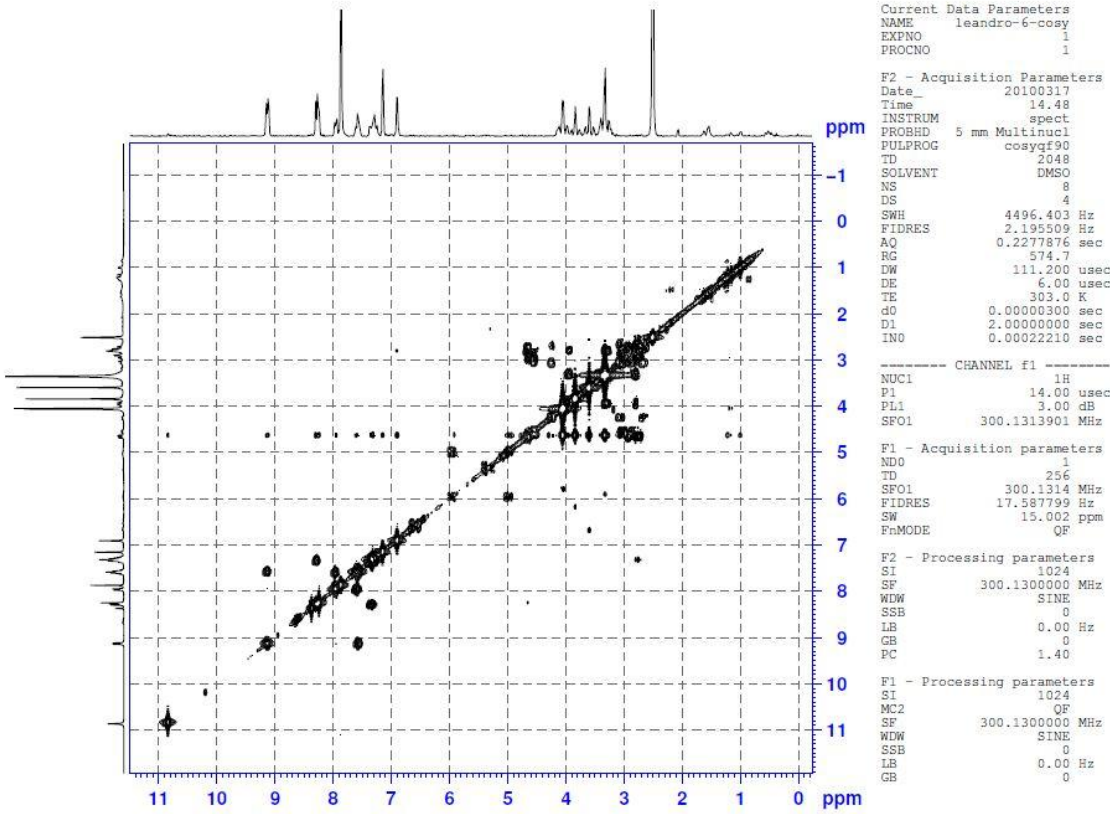


Figura 4.29. Espectro de RMN COSY (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*

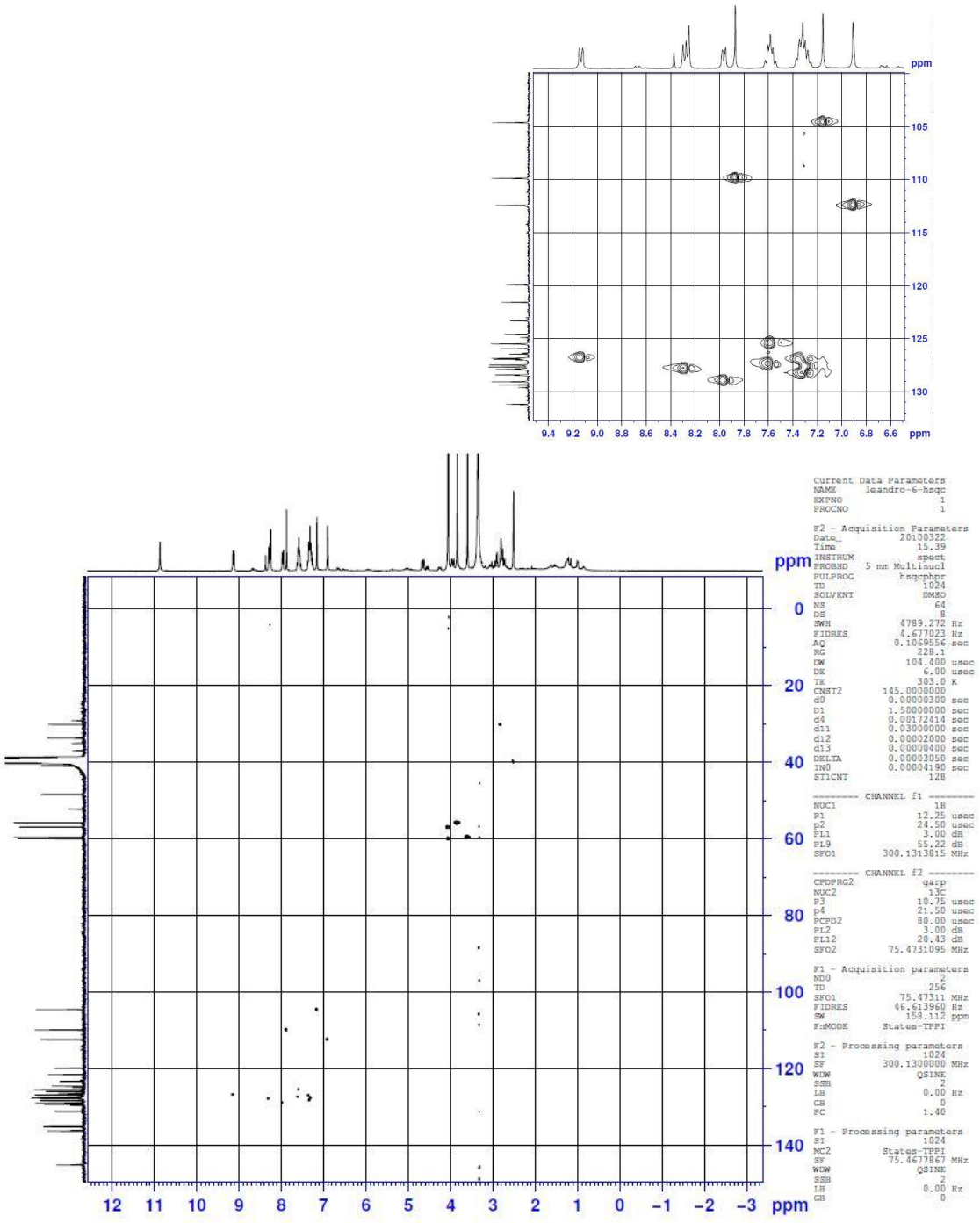


Figura 4.30. Espectro de RMN HSQC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*

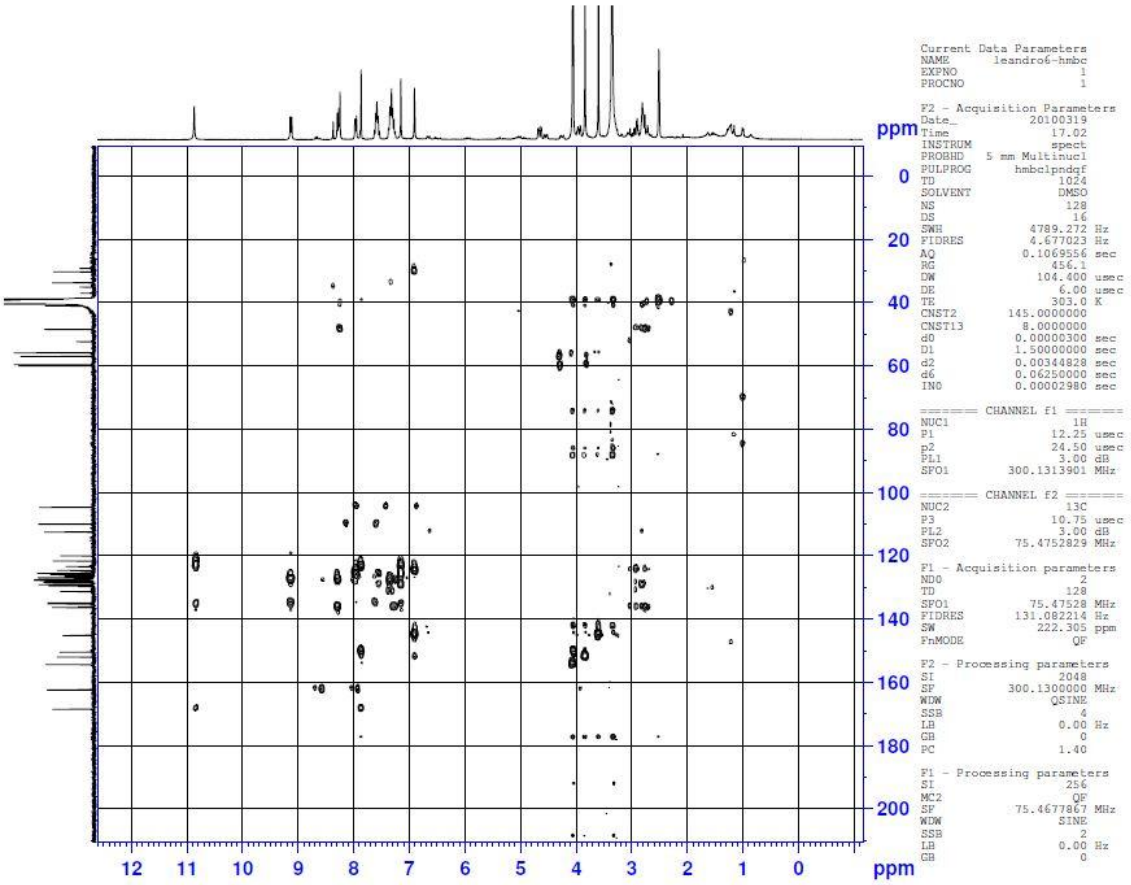


Figura 4.31. Espectro de RMN HMBC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*

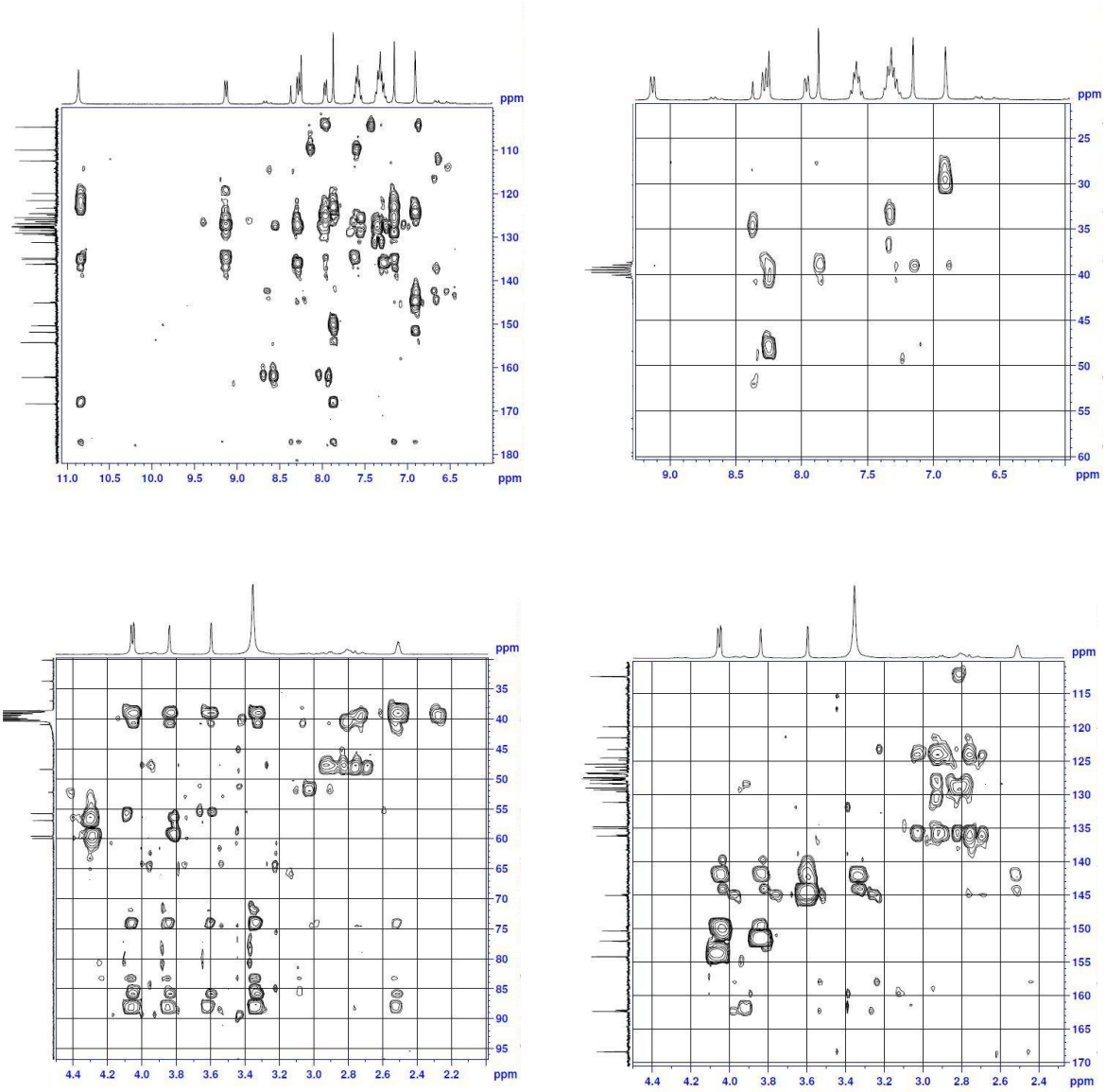
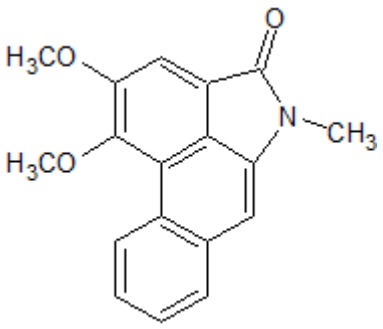


Figura 4.32. Ampliação de regiões do espectro de RMN HMBC (DMSO-d_6, 300 e 75 MHz), da fração 6 do EB de *P. umbellata.*

4.3.1.3. Fração 9

A fração 9 (5,8 mg) é composta majoritariamente pela caldensina (Figura 4.33), obtida artificialmente por Rao (1990) e posteriormente isolada por Cardozo Júnior (2003) da espécie *Piper caldense*. Apresenta-se em forma de pó. O espectro de RMN ^{1}H em DMSO-d_6 (Figura 4.34) apresenta sinais na região do espectro característica de aromáticos, dois singletos em 7,9 ppm (H-2) e 7,4 ppm (H-9), dois duplos dubletos em 9,1 ppm (H-5) e 7,96 ppm (H-8), um multipleto em 7,6 ppm (H-6, H-7); duas metoxilas em 4,05 ppm (CH_3O-C) e 4,04 ppm (CH_3O-C), o espectro também apresenta um sinal em 3,42 ppm da metila ligada ao nitrogênio da lactama (CH_3-N). Diferente do espectro da molécula 2, não se observa o sinal da hidroxila como substituinte na aristolactama. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.35) em DMSO-d_6 apresenta um sinal de carbonila de lactama em 166,6 ppm. Em 154,1 ppm e 150,3 ppm aparecem sinais de carbonos quaternários aromáticos substituídos por metoxilas, com sinais correspondentes em 59,9 ppm e 56,9 ppm; em 26,1 ppm observa-se o sinal da metila ligada ao nitrogênio da aristolactama. Na Figura 4.36 observa-se o espectro de COSY. Os dados estão resumidos na Tabela 4.15.



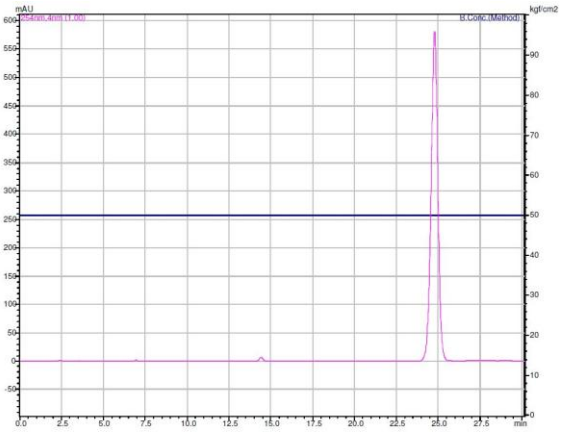


Figura 4.33. Estrutura da molécula presente na fração 9 do EB de *P. umbellata* e cromatograma correspondente. Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Shim-Pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Fase móvel ACN 50% em água acidificada com TFA 0,1%

Tabela 4.15. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (300 e 75 MHz) da fração 9 do EB de *P. umbellata*, em comparação aos obtidos por Rao (1990).

Posição	δ ^{1}H		δ ^{13}C
	RAO, 1990	**9 DMSO-*d*$_6$**	**9 DMSO-*d*$_6$**
1	-	-	120,6
2	7,78	7,9	110,1
3	-	-	154,1
4	-	-	150,3
4a	-	-	119,6
5	9,18 dd (*J* = 7,0; 2,5)	9,1 dd (*J* = 7,5; 1,2)	125,6
5a	-	-	126,1
6	7,55 td (*J* = 7,0; 2,5)	7,6 m	126,8
7	7,55 td (*J* = 7,0; 2,5)	7,6	127,5
8	7,85 dd (*J* = 7,0; 2,5)	7,96 dd (*J* = 7,5; 1,2)	129,0
8a	-	-	134,5
9	6,94	7,4	104,1
10	-	-	136,6
11	-	-	121,9
12	-	-	166,6
CH_3O	4,1	4,05	59,88
CH_3O	4,05	4,04	56,90
CH_3N	3,46	3,42	26,1

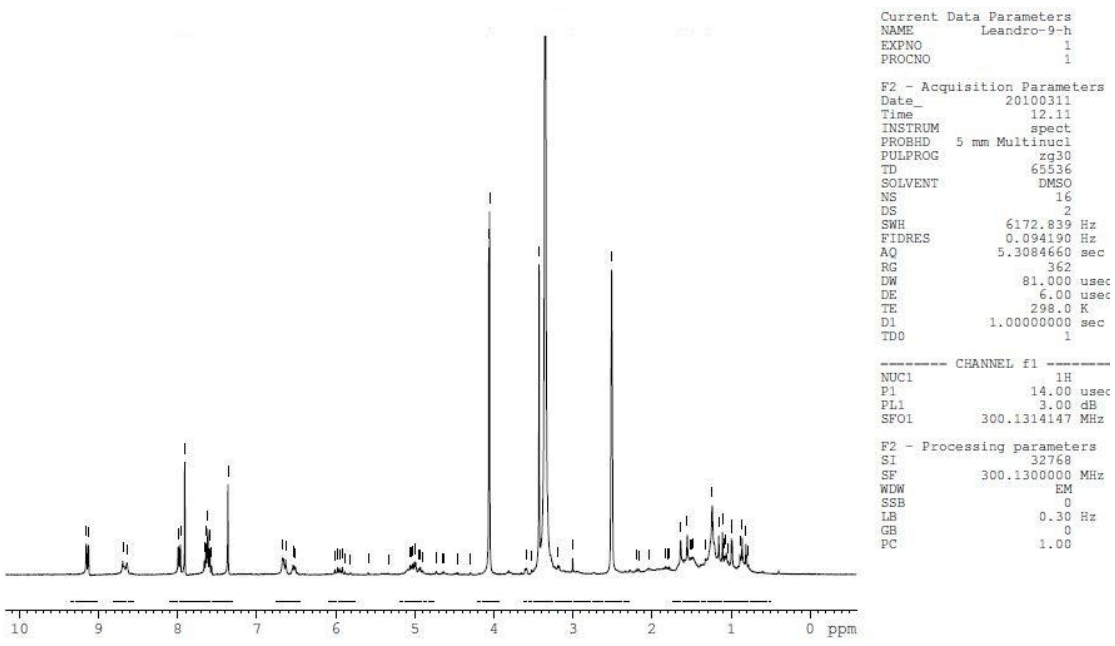


Figura 4.34. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 9 do EB de *P. umbellata.*

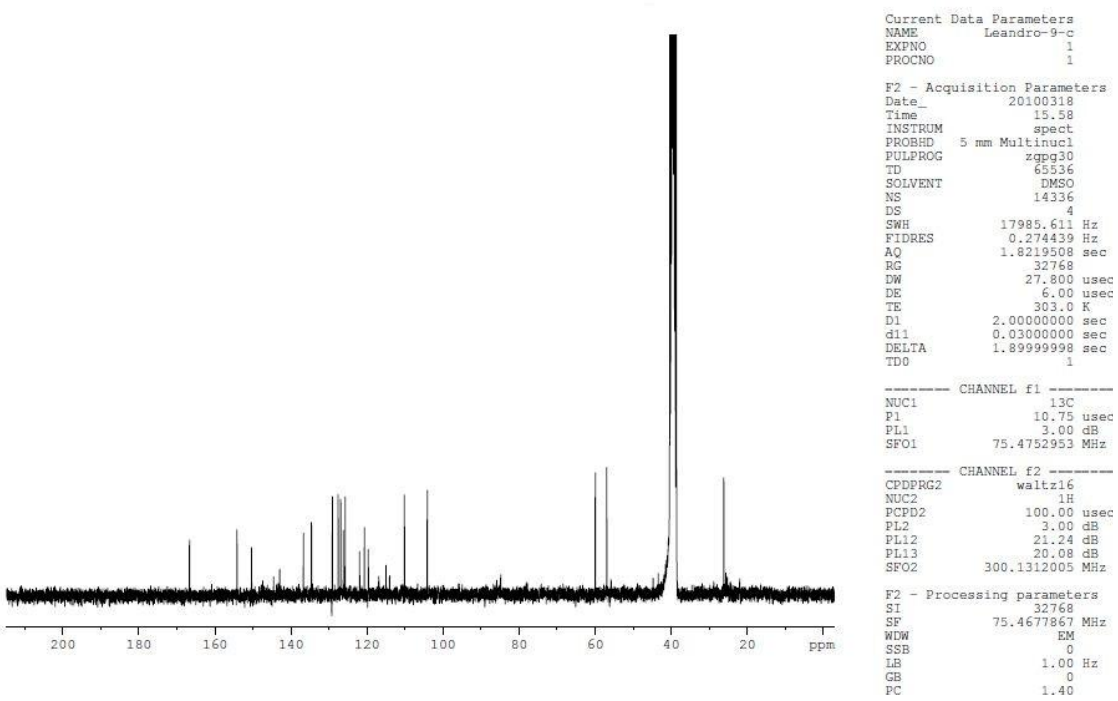


Figura 4.35. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz), da fração 9 do EB de *P. umbellata.*

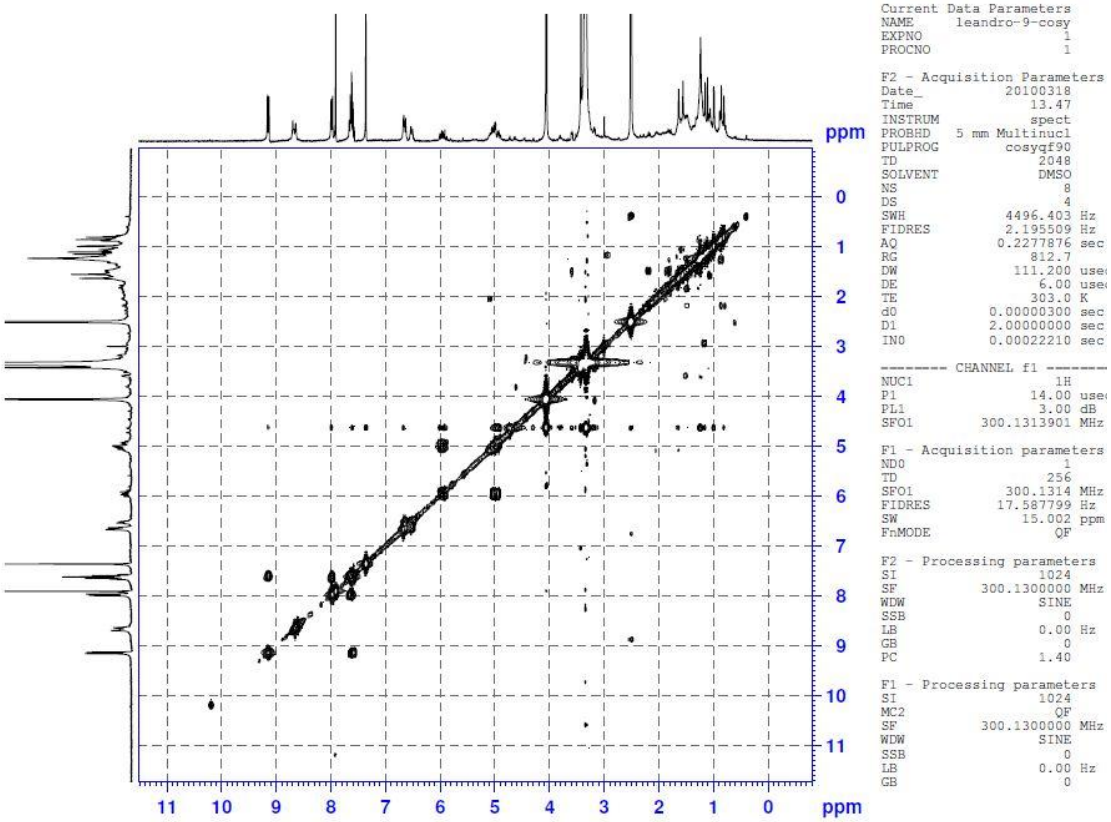


Figura 4.36. Espectro de RMN COSY (DMSO-d_6, 300 MHz), da fração 9 do EB de *P. umbellata.*

4.4. Caracterização física das suspensões de nanocápsulas com extrato bruto liofilizado das raízes de *P. umbellata*

4.4.1. Distribuição do tamanho de partícula

A Figura 4.37 refere-se às análises efetuadas no equipamento N5 Submicron Particle Size (Beckman Coulter®).

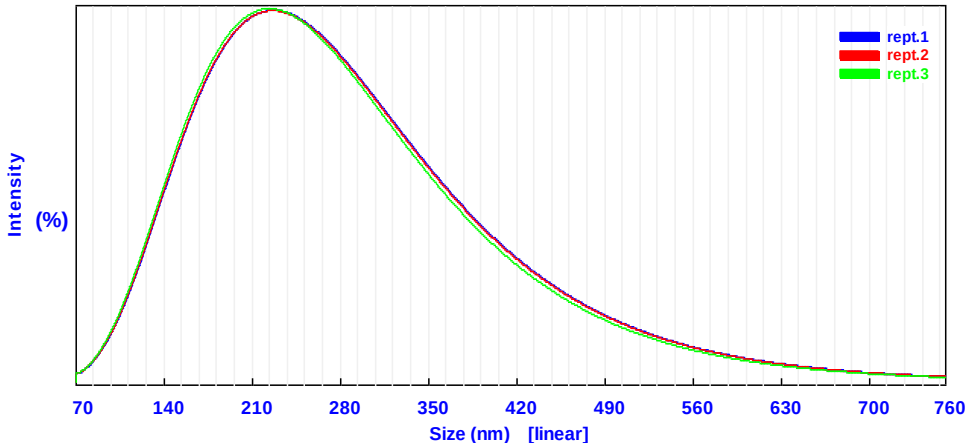


Figura 4.37. Gráfico referente a 3 medições da distribuição do diâmetro de partícula das nanocápsulas (unimodal) do extrato liofilizado de raízes *de P. umbellata*, utilizando método de espalhamento de luz dinâmica.

Após 3 medições a média do diâmetro obtida foi de 230,2 ± 48,2 nm (desvio padrão) e do índice de polidispersão de 0,053.

4.4.2. Determinação da taxa de associação às nanocápsulas do extrato bruto liofilizado das raízes de *P. umbellata*, empregando cromatografia líquida de alta eficiência

A análise por CLAE mostrou que os compostos mais apolares (inclusive as frações 6 e 9, além de parte da 2) foram encapsulados com eficiência, pois não aparecem no filtrado antes da lise das nanocápsulas (Figura 4.38A). Após a lise (Figura 4.38B), uma série de picos que pode ser observada no extrato bruto, passa a aparecer também no filtrado (Figura 4.38C).

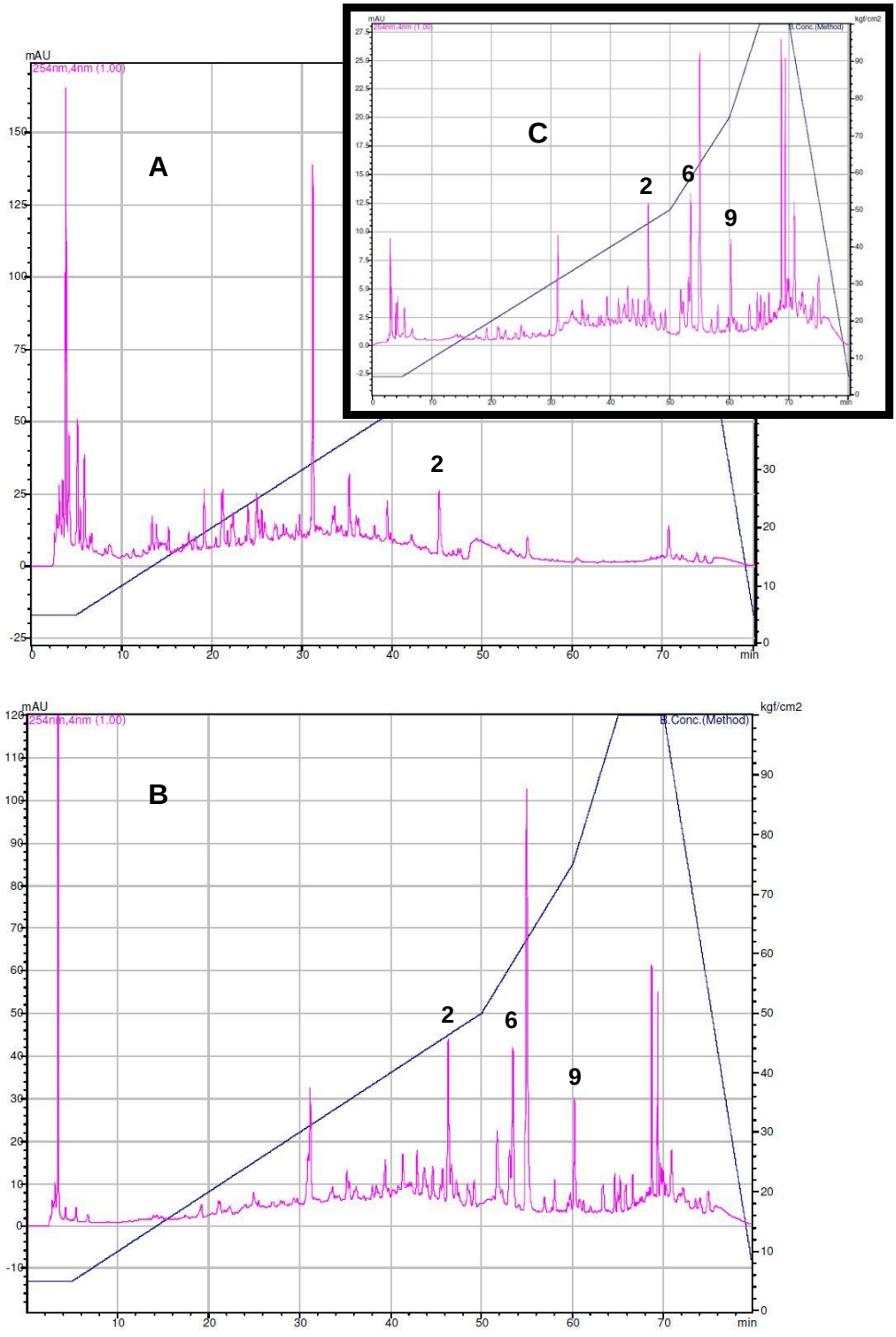


Figura 4.38. Cromatogramas referentes ao ultrafiltrado da suspensão de nanocápsulas do extrato liofilizado das raízes de *P. umbellata*. **A** - Anterior à lise das nanocápsulas. **B** - Após a lise. **C** - Extrato sem nanocápsulas. **2**, **6** e **9** indicam os picos correspondentes às frações do extrato. Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Gradiente de ACN em H_2O+TFA 0,1%, 10 - 100% B em 30 minutos.

5. DISCUSSÃO

As plantas medicinais constituem uma fonte de grande diversidade de compostos que apresentam alta relevância na descoberta de novos fármacos (KOHEM, 2005).

Apesar do recente interesse da indústria farmacêutica por modelagem molecular, química combinatória entre outras técnicas para a produção de compostos sintéticos, os produtos naturais, sobretudo os provenientes de plantas medicinais, continuam sendo uma importante fonte de novas moléculas. Em 2001 e 2002, cerca de 25% dos fármacos mais vendidos mundialmente, eram produtos naturais ou derivados destes (BALUNAS, 2005).

Com os relatos populares do uso de pariparoba para úlceras (BALBACH, 1971) e afecções gástricas (MARTINS, 1995), aliados aos dados na literatura sobre sua atividade antioxidante (BARROS, 1996); antibacteriana *in vitro* contra *H. pylori* (ISOBE, 2002) e anti-inflamatória (PERAZZO, 2005), tornou-se óbvio o interesse pelo estudo de sua possível atividade antiúlcera, e de possíveis moléculas que possam estar ligadas a esta atividade.

Ao início do trabalho, foram feitos dois ensaios antiúlcera pelo modelo de indução por etanol acidificado, para determinar qual parte da planta seria utilizada já que havia relatos populares e científicos do uso de folhas e raízes da pariparoba. O ensaio com folhas apresentou resultado negativo para a atividade antiúlcera.

No ensaio com EB frente às lesões causadas por etanol acidificado, não houve diferença significativa entre os grupos e o controle negativo. Entretanto, ao observar as médias, há uma possível indicação de relação dose-resposta para o EB. Apesar da ANOVA não acusar diferença significativa, há uma diferença visível entre as médias do grupo de 400 mg/kg e o controle negativo. Através das fotos dos estômagos, é possível perceber essa diferença (Figura 3.4).

Ainda utilizando o modelo de indução por etanol acidificado, foram ensaiadas as frações do EB. Com exceção do grupo que recebeu a fração etanólica, todos exibiram redução significativa das lesões em relação ao controle negativo. Observando as médias, nota-se que os grupos acetato de

etila e clorofórmio, que receberam essas frações a 200 mg/kg, tiveram desempenho semelhante ao grupo que recebeu lansoprazol a 30 mg/kg.

Há na literatura diversos estudos que associam a administração de etanol e o aumento de espécies reativas de oxigênio como íons superóxido e radicais hidroxila. Acredita-se que a ação direta do álcool sobre a mucosa promove peroxidação lipídica, que juntamente com o aumento dos radicais livres, leve a um estresse oxidativo, resultando em morte celular (KWIECIEŃ, 2002; REPETTO, 2002). Gazzieri et. al. (2007), sugerem que esse mecanismo está associado à ativação de canais receptores de potencial transiente vanilóides do tipo 1 (TRPV-1) por etanol, desencadeando a liberação de substância-P (sP) que estimula receptores de neurocinina-1 a gerar espécies reativas de oxigênio. Ainda no trabalho referido, verificou-se que substâncias que capturam espécies reativas de oxigênio previnem lesões causadas por etanol.

A inibição de lesões por substâncias antioxidantes também é relatada no artigo de revisão elaborado por Repetto (2002), com diversas referências.

Sabendo que os extratos de pariparoba demonstram pronunciada atividade antioxidante (AGBOR, 2007; BARROS, 1996; DESMARCHELIER, 1997; TABOPDA, 2008), sugere-se que as substâncias antioxidantes presentes no EB possam colaborar na inibição da formação de lesões por etanol, embora seja importante lembrar que os processos de formação e cicatrização das lesões ulcerativas são mais complexos, e podem envolver outros mecanismos.

Com os resultados obtidos no experimento que utilizou o modelo de indução por indometacina, também não se observa diferença significativa entre os grupos (nem mesmo entre os controles positivo e negativo). O tamanho das úlceras formadas ocupa pequena parte do estômago.

Para avaliar a influência do EB sobre a secreção ácida, utilizou-se o modelo de ligadura do piloro. Quanto à avalicão do efeito sobre o volume de secreção gástrica, não houve diferença significativa entre os grupos testados e os controles. A única diferença observada foi entre os grupos de 100 e 200 mg/kg cujas médias (a mais alta e a mais baixa) se situam nos opostos de um resultado global sem diferença estatística. A cimetidina não reduziu a quantidade de secreção.

Em relação ao efeito sobre o pH, apenas o fármaco referência demonstrou atividade, reduzindo significativamente a concentração de ácido, ao se mostrar diferente do controle negativo e dos grupos de 100 e 400 mg/kg. A dose de 200 mg/kg não mostrou diferença quando comparada à cimetidina e ao controle negativo.

A medida de acidez total, feita por titulação, não demonstrou diferença entre os grupos. A baixa atividade demonstrada pela cimetidina pode estar de acordo com o que foi encontrado por alguns autores para este modelo (OKABE, 1977; SALIM, 1988), que também não observaram redução das lesões ao utilizar esse fármaco. Entretanto a escolha pelo uso de antagonista H_2 se deu por outros artigos e por trabalhos anteriores do laboratório (BACCHI, 1995), onde o resultado mostrou inibição da secreção ácida (LOSCALZO, 1981; MESIA-VELA, 2002; PARMAR, 1984).

O EB, quando testado em modelo de úlcera subcrônica (induzida por ácido acético) demonstrou que em doses de 200 e 400 mg/kg aumenta a cicatrização, ao promover redução significativa da área de lesão. A cimetidina, por sua vez, não demonstrou diferença significativa na análise estatística, mesmo com média da área de lesão menor que a do controle negativo. Vasconcelos (2008), também não observou diferença entre o grupo que recebeu cimetidina e o controle negativo, assim como Okabe (2005) que sugere que a cimetidina, por inibir a angiogênese, compromete a cicatrização. Ito, em 1986, publicou um artigo em que conseguiu promover cicatrização das úlceras com cimetidina, porém com a definição de horários para alimentação dos animais e duas administrações diárias a 100 mg/kg, assim como Mahattanadul (2009), mas esse último não utilizou regime de alimentação.

A análise histológica dos estômagos apresentou diferença evidente entre o grupo de 400 mg/kg e o controle negativo na porção mais superficial do fundo da úlcera (onde a mucosa foi removida pela lesão). Nos estômagos do grupo de 400 mg/kg, existe nesse local menos infiltrado inflamatório e menos necrose quando comparado aos animais do controle negativo. Com relação às doses intermediárias (100 mg/kg e 200mg/kg), a diferença não é tão evidente, apesar de haver animais que também têm menos infiltrado inflamatório nesses grupos.

Acredita-se que o mecanismo de ação das substâncias presentes no EB esteja mais ligado à sua comprovada atividade antioxidante, ou possivelmente

a algum fator de proteção da mucosa, devido aos resultados obtidos com os modelos de indução por etanol acidificado e ácido acético. Como o resultado obtido no experimento com indução por indometacina foi pouco conclusivo, fica difícil descartar a influência do EB sobre o mecanismo de produção de prostaglandinas, muco e bicarbonato. Sobre a secreção ácida, é pouco provável que o EB tenha alguma ação, devido ao resultado obtido através do modelo de ligadura do piloro.

Em relação aos estudos fitoquímicos, optou-se por estudar a fração acetato de etila, já que esta apresentou a maior inibição da formação de lesões no modelo de indução por etanol acidificado. Com a exploração inicial no sistema de CLAE, determinou-se como seria feita a separação em coluna aberta, para extrair em maior quantidade os mais pronunciados picos no cromatograma. Obteve-se então a fração 65-2, escolhida por apresentar substâncias com grupos altamente cromóforos (sua intensa coloração amarela formou um destacado anel na coluna de vidro). A análise por CLAE com visualização simultânea de vários comprimentos de onda demonstrou que ao menos três dos picos dessa fração poderiam estar com uma pureza razoável. Foi realizada então a separação no sistema semi-preparativo, rendendo as frações 2, 6 e 9.

A fração 2, após análise por RMN, demonstrou ser constituída quase unicamente por piperumbellactama B, molécula descrita exclusivamente na espécie *P. umbellata* por Tabopda em 2008, quando foi obtida de partes aéreas, diferentemente deste trabalho que descreve sua extração das raízes. Esse mesmo autor testou essa substância quanto a sua atividade antioxidante, e observou maior capacidade de captura de radicais livres quando comparada ao ácido cafeico. Esse resultado colabora na hipótese de que o mecanismo do extrato esteja ligado a sua capacidade antioxidante, visto que essa molécula se encontra na fração mais ativa (acetato de etila).

Não foi obtida a mesma eficiência de separação para a fração 6, que é composta por duas moléculas. Entre as substâncias, foi possível distinguir a piperumbellactama A, também descrita pela primeira vez por Tabopda (2008) nos ramos de pariparoba.

Com a análise dos espectros de RMN da fração 9, observou-se que esta era composta majoritariamente pela caldensina, substância isolada de outra

espécie da família Piperaceae (*Piper caldense*) por Cardozo Júnior em 2003. No entanto, não foram encontrados na literatura relatos de sua ocorrência em *Pothomoprhe umbellata*.

As nanocápsulas preparadas apresentaram diâmetro médio de 230,2 nm com desvio padrão de 48,2 nm e a distribuição do tamanho das partículas foi unimodal com reduzido índice de polidispersão (0,053) após a medição realizada, números que são um bom indicativo da formação de nanocápsulas de tamanho e população adequados.

Os resultados da análise por CLAE revelaram uma aparente eficiência no encapsulamento das substâncias menos polares do EB. As frações 6 e 9 (além de outros picos correspondentes a substâncias mais hidrofóbicas presentes no extrato), aparecem apenas na solução em que foi promovida a lise das nanocápsulas. A fração 2 teve também uma parte associada à formulação, pois no cromatograma da solução ultrafiltrada seu pico se mostrou proporcionalmente reduzido em relação aos vizinhos.

Para finalizar a caracterização das nanocápsulas, ainda seriam necessárias a medição do potencial zeta, para avaliar a viabilidade e estabilidade da formulação, e a microscopia eletrônica, para mostrar a forma e aparência das partículas formadas (BECK, 2004; LOPES, 2000). Para testar efeitvamente sua atividade antiúlcera em animais seriam ainda necessários ensaios *in vitro* para auxiliar na inferência de parâmetros biológicos, como a cinética de liberação. Com as nanocápsulas, espera-se melhora na ação do EB, já que este apresenta baixa solubilidade em meio aquoso.

6. CONCLUSÃO

Os extratos de *P.* umbellata ainda não haviam sido estudados quanto à atividade antiúlcera, e através dos diferentes modelos testados é possível extrair algumas conclusões.

Quando testado em modelo de etanol acidificado, o extrato de folhas de *P. umbellata* não demonstrou indicação de atividade antiúcera. Entretanto, o extrato de raízes apresentou indicação de atividade no mesmo modelo, e as frações obtidas com clorofórmio, acetato de etila e etanol 50% foram capazes de inibir a formação de lesões sem diferença estatística em relação ao fármaco padrão empregado (lansoprazol).

Quando testado nos modelos de indução por indometacina e ligadura do piloro, o EB não apresentou ação. Porém, em modelo de úlcera subaguda, as doses mais altas do extrato (200 e 400 mg/kg) foram capazes de acelerar a redução do tamanho das lesões, e a dose de 400 mg/kg, promoveu destacada redução da presença de necrose e infiltrado inflamatório.

Houve observação de ação antiúlcera nos extratos de raízes de pariparoba frente a alguns modelos testados, atividade que pode ser atribuída (ao menos parcialmente) a sua comprovada atividade antioxidante.

Foram identificadas três moléculas na fração mais ativa em relação à ação antiúlcera. Duas delas (piperumbellactamas A e B) já haviam sido descritas nessa espécie, porém nas partes aéreas. A terceira (caldensina) havia sido isolada de *Piper caldense*, e não foram encontrados na literatura relatos de sua ocorrência em *P. umbellata*.

A suspensão elaborada com nanocápsulas foi capaz de melhorar a solubilidade do extrato em água, ao conseguir associar as substâncias mais apolares com sua matriz polimérica. Ao mesmo tempo, formou partículas de tamanho adequado com distribuição unimodal, informações que trazem indicação da viabilidade da formulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Informação e Documentação - Referências - Elaboração: NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Informação e Documentação - Citações em doucmentos - Apresentação: NBR 10520. Rio de Janeiro, 2002. 7p.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Informação e Documentação - Trabalhos acadêmicos - Apresentação: NBR 14724. 2.ed. Rio de Janeiro, 2005. 9p.

ADAMI, Y.L. **Estudo in vivo e in vitro da potencial atividade antimalárica de *Pothomorphe peltata* e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq**. Rio de Janeiro, 1995. 102p. Dissertação de Mestrado - Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) *apud* ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.N.S.; SILVA, E.C.C; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.S.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.N.; SILVA, L.F.R.; COSTA, M.R.F.; NUNOMURA, R.C.S.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.C.; CHAVES, F.C.M; VIEIRA, P.P.R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.3, p.359-365, 2007.

AGBOR, G.A.; VINSON, J.A.; OBEN, J.E.; NGOGANG, J.Y. In vitro antioxidant activity of three *Piper* species. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v.7, n.2, p.49-64, 2007.

AIRES, M.M., **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1251p.

ALUMETS, J.; EKELUND, M.; HAKANSON, R.; HEDENBRO, J.; REHFELD, J.F.; SUNDLER, F.; VALLGREN S. Gastric acid response to pylorus ligation in rats: is gastrin or histamine involved? **The Journal of Physiology**, v.323, p.145-156, 1982.

AMORIM, C.Z.; FLORES, C.A.; GOMES, B.E.; MARQUES, A.D.; CORDEIRO, R.S. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.24, n.1, p.101-106, 1988.

ANTIDEHOU, K.K., SCHIMID, C.; BRUN, R.; KONÉ, M.W.; TRAORE, D. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.221-227, 2004.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v.61, p.204-207, 1995.

BALBACH, A. **As plantas curam**. 28.ed. São Paulo: Editora MV, 1971.

BALDOQUI, D.C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; KATO, M.J.; MARQUES, M.O.M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (*Piperaceae*). **Química Nova**, v.32, n.5, p.1107-1109, 2009.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.431-441, 2005.

BARROS, L.F.M.; BARROS, P.S.M.; ROPKE, C.D.; SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M.; BELFORT, R.Jr. Dose-dependent in vitro inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of *Pothomorphe umbellata* after alkali injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.1129-1132, 2007.

BARROS, S.; ROPKE, C.D.; SAWADA, T.C.H.; SILVA, V.V.; PEREIRA, S.M.M.; BARROS, S.B.M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq (Pariparoba). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, p.53-61, 2005.

BARROS, S.B.M.; TEIXEIRA, D.S.; AZNAR, A.E.; MOREIRA JUNIOR, J.A.; ISHII, I.; FREITAS, P.C.D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Pariparoba). **Ciência e Cultura**, v.48, n.1/2, p.114-116, 1996.

BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v.21, n.5, p.499-512, 2004.

BERNHARD, H.O.; THIELE, K. Isolierung von 1-Allyl-2,3-dimethoxy-4,5-methylendioxybenzol (= Dill-Apiol) aus Heckeria umbellata (L.) Kunth (*Piperaceae*). **Helvetica Chimica Acta**, v.61, n.6, p.2273-2274, 1978.

BIOKA, D.; ABENA, A. Psychopharmacologic profile of an aqueous extract of *Piper umbellatum*. **L'Encephale**, v.16, n.3, p.205-208, 1990.

BORRELLI, F.; IZZO, A A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v.14, p.581-591, 2000.

BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.; KONNO, T.U.P.; DUARTE, G.G.; SCIO, E. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v.47, n.1, p.44-52, 2009.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O., SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.396-402, 2007.

BRASIL E SILVA, G.A.; LUIZ, B. Chemistry of the essential oil of *Heckeria umbellata* (*Piperaceae*). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.53, n.2, p59-61, 1972.

BROHEM, C.A.; SAWADA, T.C.H.; MASSARO, R.R.; ALMEIDA, R.L.; RIVELLI, D.P.; ROPKE, C.D.; DA SILVA, V.V.; DE LIMA, T.M.; CURI, R.; BARROS, S.B.M.; MARIA-ENGLER, S.S. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v.23, p.111-119, 2009.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

CARDOZO JÚNIOR, E. L.; CHAVES, M. C. O. Caldensin, a new natural *N*-methylaristolactam from *Piper caldense*. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.3, p.216-218, 2003.

CHATTOPADHYAY, I.; NANDI, B.; CHATTERJEE, R.; BISWAS, K.; BANDYOPADHYAY, U.; BANERJEE, R.K. Mechanism of antiulcer effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract: effect on H^+-K^+-ATPase, oxidative damage and apoptosis. **Inflammopharmacology**, v.12, n.2, p. 153-176, 2004.

CHAVES, M. C. O.; OLIVEIRA, A. H.; SANTOS, B. V. O. Aristolactams from *Piper maginatum* Jacq (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p.75-77, 2006.

CHEN, Y. C.; CHEN, J. J.; CHANG, Y. L.; TENG, C. M.; LIN, W. Y.; WU, C. C.; CHEN, I. S. A new aristolactam alkaloid and anti-platelet aggregation constituents from *Piper taiwanense*. **Planta Medica**, v.70, p.174-177, 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.5, pt.1, 1974.

DANELUTTE, A. P.; COSTANTIN, M. B.; DELGADO, G. E.; BRAZ-FILHO, R.; KATO, M. J. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v.16, n.6B, p.1425-1430, 2005.

DESAI, S. J.; PRABHU, B. R.; MULCHANDANI, N. B. Aristolactams and 4,5-dioxoaporphines from *Piper longum*. **Phytochemistry**, v.27, n.5, p.1511-1515, 1988.

DESAI, S. J.; CHATURVEDI, R. N.; BADHEKA, L. P.; MULCHANDANI, N. B. Aristolactams and 4,5-dioxoaporphines from Indian *Piper* species. **Indian Journal of Chemistry**, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, v.28B, n.9, p.775-777, 1989

DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORRE, L.R.; KATO, M.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. 4-Nerolidylcatechol from Pothomorphe spp. scavenges peroxyl radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. **Planta Medica**, v.63, n.6, p.561-563, 1997.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2.ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.

FELZENSZWALB, I; VALSA, J.O.; ARAUJO, A.C.; GOMES, R.A. Absence of mutagenicity of *Pothomorphe umbellata* and *Pothomorphe peltata* in the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.20, n.3/4, p.403-405, 1987.

GAZZIERI, D.; TREVISANI, M.; SPRINGER, J.; HARRISON, S.; COTTREL, G.S.; ANDRE, E.; NICOLETTI, P.; MASSI, D.; ZECCHI, S.; NOSI, D.; SANTUCCI, M.; GERARD, N.P.; LUCATTELLI, M.; LUNGARELLA, G.; FISCHER, A.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W.; GEPPETTI, P. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.581-589, 2007.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal**, v.6, p.825-831, 1992.

HAMMER, M.L.A.; JOHNS, E.A. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajo Island, Para (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v.40, p.53-75, 1993.

IPNI. The International Plant Names Index. Disponível em: <http://www.inpi.org>. Acesso em 27 de novembro de 2009.

ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of brazilian medicinal plant, pariparoba. **Yakugaku Zasshi**, v.122, n.4, p.291-294, 2002.

ITO, M.; TSUKAHARA, T.; SUZUKI, Y. Marked healing-promoting action of cimetidine on acetic acid-induced ulcer in rats with a limited food-intaking-time. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.41, p.260-262, 1986.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Gastric mucosal protection and cell proliferation. Role of mucosal blood flow: A conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.15. supl.D1-D6, 2000.

KIJJOA, A.; GIESBRECHT, A.M.; AKISUE, M.K.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Medica**, v.39, p.85-87, 1980.

KOHEN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.206-220, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

KUMAR, V.; POONAM; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. **Natural Product Reports**, v.20, p.565-583, 2003.

KWIECIEŃ, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.53, n.1, p.39-50, 2002.

LI, C. Y.; TSAI, W. J.; DAMU, A. G.; LEE, E. J.; WU, T. S.; DUNG, N. X.; THANG, T. D.; THANH, L. Isolation and identification of antiplatelet aggregatory principles from the leaves of *Piper lolot*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.9436-9442, 2007.

LOPES, E.; POHLMANN, A.R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S.S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v.55, n.7, p.527-530, 2000.

LOSCALZO, B.; AGRUSTA, A.; AGRUSTA, M.; CERCIELLO, A.; CRISCI, A.; TROVATO, C. Cimetidine in experimental gastric ulcers induced by pyloric ligation. **Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale**, v.57, n.1, p.80-85, 1981.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 354p.

MAHATTANADUL, S.; NAKAMURA,T.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; PHDOONGSOMBUT, N.; TUNGSINMUNKONG, K.; BOUKING, P. Comparative antiulcer effect of bisdemethoxycurcumin and curcumin in a gastric ulcer model system. **Phytomedicine**, v.16, p.342-351, 2009.

MARTINS, A.P.; SALGUEIRO, L.; VILA, R.; TOMI, F.; IGUERAL, S.C., CASANOVA, J.; CUNHA, A.P.; ADZET, T. Essential oils from four Piper species. **Phytochemistry**, v.49, n.7, p.2019-2023, 1998.

MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Imprensa Universitária - UFV, 1995.

MENSAH, J.K.; OKOLI, R.I.; OHAJU-OBODO, J.O.; EIFEDIYI, K. Phytochemical, nutritional and medical properties of some leafy vegetables consumed by Edo people of Nigéria. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.14, p.2304-2309, 2008.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M. T.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA A. J. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v.9, n.6, p.508-514, 2002.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.33, p.939-945, 1983.

MORAES, M.S. **Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluído de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq**. São Paulo, 1983. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

MORAES, M.S. Considerações sobre a pariparoba oficial *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.1, p.101-108, 1986.

NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L.A.; MERFORT I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v.66, p.1017-1025, 2005.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models - The history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.8, p.1321-1341, 2005.

OKABE, S.; TAKEUCHI, K.; URUSHIDANI, T.; TAKAGI, K. Effects of cimetidine, a histamine H_2-receptor antagonist, on various experimental gastric and duodenal ulcers. **Digestive Diseases and Sciences**, v.22, n.8, 1977.

OLSEN, C. E.; TYAGI, O. D.; BOLL, P. M.; HUSSAINI, F. A.; PARMAR, V. S.; SHARMA, N. K.; TANEJA, P.; JAIN, S. C. An aristolactam from *Piper acutisleginum* and revision of the structures of piperolactam B and D. **Phytochemistry**, v.33, n.2, p.518-520, 1993.

PARMAR, N.S.; HENNINGS, G. The gastric antisecretory activity of 3-methoxy-5,7,3′4′-tetrahydroxyflavan (ME) - a specific histidine decarboxylase inhibitor in rats. **Inflammation Research**, v.15, n.3-4, 1984.

PECKOLT, W. Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil: estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. **Memórias do Instituto. Butantan**, v.15, p.59-68, 1941.

PERAZZO F.F.; SOUZA G.H.B.; LOPES, W.; CARDOSO L.G.V.; CARVALHO J.C.T.; NANAYAKKARA N.P.D.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and analgesic properties of water–ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (*Piperaceae*) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.215-220, 2005.

RAO, K. V.; REDDY, G. C. S. Chemistry of *Saururus cernuus*, V. Sauristolactam and other nitrogenous constituents. **Journal of Natural Products**, v.53, n.2, p.309-312, 1990.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.523-534, 2002.

ROPKE, C.D.; MEIRELLES, R.; SILVA, V.; SAWADA, T.; BARROS, S. *Pothomorphe umbellata* extract prevents α-tocopherol from depletion after UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, v.78, n.5, p.109-116, 2003.

ROPKE, C.D.; SAWADA, T.C.H.; SILVA, V.V.; MICHALANY, N.S.; BARROS, S.B.M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.30, p.272-276, 2005.

ROPKE, C.D.; SILVA, V.V.; KERA C.; MIRANDA D.V.; ALMEIDA R.L.; SAWADA T.C.H.; BARROS S.B.M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p.439-442, 2006.

RUANGRUNGSI, N.; PRATHANTURARUG, S.; LANGE, G. L.; ORGAN, M. G. An *N*-methyl aristolactam and an oxygenated cyclohexane derivative from *Piper ribesioides*. **Phytochemistry**, v.31, n.7, p.2397-2400, 1992.

SACOMAN, J.L.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G.M.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p.411-415, 2008.

SALIM, A.S. Gastric diversion or pylorus ligation for gastric mucosal integrity and acid secretion studies in the rat? **Digestive Diseases and Sciences**, v.33, n.11, p.1441-1444, 1988.

SILVA, R.A.D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Nacional, 1926.
SUNG, J.J.Y.; KUIPERS, E.J.; EL-SERAG, H.B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.29, p.938-946, 2009.

TABOPDA, T.K.; NGOUPAYO, J.; LIU, J.; MITAINE-OFFER, A.C.; TANOLI, S.A.K.; KHAN, S.N.; ALI, M.S.; NGADJUI, B.T.; TSAMO, E.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; LUU, B. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum* **Phytochemistry**, v.69, p.1726-1731, 2008.

TAKAGI K, OKABE S, SAZIKI R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.19, n.3, p.418-26, 1969.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden.
Disponível em: <http://www.tropicos.org/name/25002115>. Acesso em: 27 de Novembro de 2009.

TSAI, I. L.; LEE, F. P.; WU, C. C.; DUH, C. Y.; ISHIKAWA, T.; CHEN, J. J.; CHEN, Y. C.; SEKI, H.; CHEN, I. S. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from Piper arborescens. **Planta Medica**, v.71, p.535-542, 2005.

UNITED STATES CENSUS BUREAU. World Population Clock. Disponível em: <http://www.census.gov/ipc/www/popclockworld.html>. Acesso em: 13 de setembro de 2009.

VALADARES M.C.; REZENDE, K.R.; KATO, M.J. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.1975-1978, 2007.

VASCONCELOS, P.C.P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M..; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R.K.; PELLIZZON, C.H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.293-301, 2008.

VYAWAHARE, N.S.; DESHMUKH, V.V.; GADKARI, M.R.; KAGATHARA, V.G. Plants with Antiulcer Activity. **Pharmacognosy Reviews**, v.3, n.5, p.108-115, 2009.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, v.88, p.1547-1565, 2008.

YUN, Z.; JINLAN, R.; YALING, C.; Study on three aristolactams from *Piper wallichii*. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v.28, n.3, p.191-193, 2005.