

CRISTIANE HATSUKO BAGGIO



**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE
GASTROPROTETORA DO EXTRATO AQUOSO
DAS FOLHAS DE *Achillea millefolium* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Consuelo
Andrade Marques

Co-orientadora: Dr.^a Sonia Mesia Vela

CURITIBA

2004

CRISTIANE HATSUKO BAGGIO

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE
GASTROPROTETORA DO EXTRATO AQUOSO
DAS FOLHAS DE *Achillea millefolium* L.**

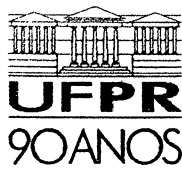
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Consuelo
Andrade Marques

Co-orientadora: Dr.^a Sonia Mesia Vela

CURITIBA

2004



P A R E C E R

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Achillea millefolium* L.**”, de autoria da Pós-Graduanda **CRISTIANE HATSUKO BAGGIO**, e composta pelos Professores Dr. João Ernesto de Carvalho (UNICAMP); Dra. Sonia Mesia Vela (UFPR, Dr. José Eduardo da Silva Santos (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela coordenadora. Em Curitiba, 30 de janeiro de 2004.

Dr. João Ernesto de Carvalho

Dra. Sonia Mesia Vela

Dr. José Eduardo da Silva Santos

*Uma vida transcorrida cometendo erros
não só é mais honrada, mas também
mais útil do que uma vida sem fazer
nada. (George Bernard Shaw)*

À **Deus**, por estar sempre ao meu lado e
por ter permitido chegar até aqui!

À meus pais, **Maria e Oswaldo**, que
sempre me incentivaram e deram o
“patrocínio” para a realização deste
trabalho. Obrigada!!!

*À minha orientadora Prof^ª Dr^ª **Maria
Consuelo A. Marques** pela compreensão
e paciência. Obrigada pelo carinho
quando pensei em desistir de tudo!!!*

*À minha co-orientadora Dr^a **Sonia Mesia**
Vela pela atenção e ensinamentos.
Obrigada pela ajuda e paciência na
realização deste trabalho e nos ensaios
para a apresentação!!!*

AGRADECIMENTOS

À **Gláucia** e ao **Dani** pelo auxílio nos experimentos e na padronização dos novos modelos. A amizade de vocês foi fundamental, principalmente nesse período de término do mestrado!

À **Cris Setim** pela grande ajuda, apoio e incentivo no início deste trabalho. Agradeço também pela amizade que tivemos...

Ao Prof. Msc. **Masahiko Ohi** pela ajuda com o cachorrinho!!!

À Prof^a Dr^a **Tomoe Nakashima** pela realização do perfil fitoquímico e pelo fornecimento de algumas substâncias.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério da UFPR pela fornecimento dos animais.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ÚLCERA PÉPTICA.....	5
1.1.1. Definição.....	5
1.1.2. Etiologia.....	5
1.1.3. Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	7
1.1.3.1. Proteção pré-epitelial.....	7
1.1.3.2. Proteção epitelial.....	8
1.1.3.3. Proteção sub-epitelial.....	12
1.1.4. Secreção ácida gástrica.....	13
1.1.4.1. Regulação da secreção ácida a nível celular.....	15
1.1.5. Terapêutica atual.....	18
1.2. <i>Achillea millefolium</i> L.....	22
1.2.1. Descrição botânica.....	22
1.2.2. Distribuição.....	23
1.2.3. Sinonímia.....	24
1.2.4. Etnomedicina.....	24
1.2.5. Composição química.....	25
1.2.6. Toxicidade.....	28
1.2.7. Atividades biológicas.....	28
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. MATERIAL.....	34

3.1.1. Material botânico.....	34
3.1.1.1. Origem.....	34
3.1.1.2. Preparação do extrato.....	34
3.1.1.3. Determinação do peso seco.....	34
3.1.2. Animais.....	35
3.1.3. Drogas e reagentes.....	35
3.1.4. Materiais laboratoriais e equipamentos.....	36
3.2. METODOLOGIA.....	37
3.2.1. Avaliação da atividade antiulcerogênica.....	37
3.2.1.1. Lesões gástricas induzidas por estresse.....	37
3.2.1.2. Lesões gástricas induzidas por indometacina.....	37
3.2.1.3. Lesões gástricas induzidas por etanol.....	37
3.2.1.4. Avaliação das lesões gástricas nos modelos agudos.....	38
3.2.2. Quantificação do muco gástrico.....	38
3.2.3. Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos.....	40
3.2.4. Avaliação da atividade antissecretora ácida.....	40
3.2.4.1. Ligadura de piloro.....	40
3.2.4.2. Avaliação da atividade na H ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	41
3.2.5. Avaliação da atividade sobre a motilidade gastrointestinal.....	43
3.2.5.1. Esvaziamento gástrico.....	43
3.2.5.2. Trânsito intestinal.....	44
3.2.5.3. Diarréia induzida pelo óleo de rícino.....	44
3.2.6. Atividade das enzimas antioxidantes gástricas.....	45
3.2.6.1. Preparação das frações subcelulares de estômago.....	45
3.2.6.1.1. Determinação da atividade da enzima NQO1.....	45
3.2.6.1.2. Determinação da atividade da enzima GST.....	46
3.2.6.1.3. Determinação da atividade da enzima CAT.....	46
3.2.7. Determinação da dose inibitória 50 (DI ₅₀) e concentração inibitória 50 (CI ₅₀).....	46
3.2.8. Expressão dos dados e análise estatística.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA.....	49

4.1.1. Efeito do EABA sobre as lesões gástricas induzidas por estresse.....	49
4.1.2. Efeito do EABA sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina.....	49
4.1.3. Efeito do EABA sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	52
4.1.4. Efeito do EABA sobre a quantidade de muco gástrico e a concentração de GSH.....	52
4.1.5. Efeito da rutina sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	54
4.1.6. Efeito da quercetina sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	56
4.1.7. Efeito do óleo volátil sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	56
4.1.8. Efeito do EABA sobre a atividade da enzima antioxidante NQO1 na mucosa gástrica com lesões gástricas induzidas por etanol.....	59
4.1.9. Efeito do EABA sobre a atividade da enzima antioxidante GST na mucosa gástrica com lesões gástricas induzidas por etanol.....	60
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTISECRETORA ÁCIDA GÁSTRICA.....	61
4.2.1. Efeito do EABA sobre a secreção ácida gástrica basal.....	61
4.2.2. Efeito do EABA sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol.....	61
4.2.3. Efeito do EABA sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina.....	62
4.2.4. Efeito do EABA sobre a secreção ácida gástrica estimulada por histamina.....	66
4.2.5. Caracterização da atividade da enzima H^+/K^+ -ATPase.....	68
4.2.6. Efeito do EABA sobre a atividade da enzima H^+/K^+ -ATPase.....	70
4.2.7. Efeito da rutina sobre a secreção ácida gástrica basal.....	70
4.2.8. Efeito da rutina sobre a atividade da enzima H^+/K^+ -ATPase.....	72
4.2.9. Efeito da quercetina sobre a secreção ácida gástrica basal.....	72
4.2.10. Efeito da quercetina sobre a atividade da enzima H^+/K^+ -ATPase.....	74
4.2.11. Efeito do óleo volátil sobre a secreção ácida gástrica basal.....	74
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL.....	76
4.3.1. Efeito do EABA sobre o esvaziamento gástrico.....	76
4.3.2. Efeito do EABA sobre o trânsito intestinal.....	77
4.3.3. Padronização do método da diarreia induzida pelo óleo de rícino.....	78

4.3.4. Efeito do EABA sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino.....	78
4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	80
4.4.1. Efeito do EABA sobre os pesos relativos dos órgãos após tratamento subcrônico.....	80
4.4.2. Efeito do EABA sobre a atividade das enzimas antioxidantes na mucosa após tratamento subcrônico.....	81
5. DISCUSSÃO.....	85
6. CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXO.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina
AINE(s) – antiinflamatório(s) não esteroideal(ais)
AMPc – adenosina monofosfato cíclica
ATC – ácido tricloroacético
ATP – adenosina 5-trifosfato
CAT – catalase
CCKB – receptor de colecistocinina do tipo B
CDNB – 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno
CI₅₀ – concentração inibitória 50
COX – enzima ciclooxigenase
COX-1 – enzima ciclooxigenase do tipo 1
COX-2 – enzima ciclooxigenase do tipo 2
DI₅₀ – dose inibitória 50
DL₅₀ – dose letal 50
DTNB – 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico
EABA – extrato aquoso das folhas da *Achillea millefolium*
ECL – célula do tipo enterocromafin
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EGF – fator de crescimento epidermal
FAS – Fundação de Ação Social
GPx – glutationala peroxidase
GSH – glutationala reduzida
GST – glutationala S-transferase
H₂ – receptor de histamina do tipo 2
H⁺/K⁺-ATPase – H⁺/K⁺-adenosina trifosfatase
IP₃ – inositol 1,4,5-trifosfato
M₁ – receptor muscarínico do tipo 1
M₃ – receptor muscarínico do tipo 3
NADPH - β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
NQO1 – NAD(P)H quinona oxidoreductase 1
PG(s) – prostaglandina(s)
PGH₂ – prostaglandina do tipo H₂
PKA – proteína quinase A
PKC – proteína quinase C
ROS – espécies reativas de oxigênio
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
SST₂ – receptor de somatostatina do tipo 2
TGI – trato gastrointestinal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.....	10
Figura 2	-	Detalhes da <i>A. millefolium</i> L. e de sua folha.....	22
Figura 3	-	As flores da <i>A. millefolium</i>	23
Figura 4	-	Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por estresse (imobilização a 4 °C) em ratas.....	50
Figura 5	-	Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por indometacina (20 mg/kg - sc) em ratas.....	51
Figura 6	-	Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.....	53
Figura 7	-	Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a quantidade de muco gástrico e a concentração dos grupos sulfidrílicos não-protéicos(GSH) em ratas.....	54
Figura 8	-	Efeito da rutina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.....	55
Figura 9	-	Efeito da quercetina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.....	57
Figura 10	-	Efeito do óleo essencial das folhas da <i>A. millefolium</i> sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.....	58
Figura 11	-	Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) na mucosa de ratas com lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo).....	59

Figura 12 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da glutatona S-transferase (GST) na mucosa de ratas com lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo).....	60
Figura 13 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.....	63
Figura 14 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol em ratas com ligadura do piloro.....	64
Figura 15 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina em ratas com ligadura do piloro.....	65
Figura 16 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por histamina em ratas com ligadura do piloro.....	67
Figura 17 - Caracterização da atividade da enzima H ⁺ /K ⁺ -ATPase (A e B)...	68
Figura 18 - Curva concentração-efeito do omeprazol e ouabaina na atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	69
Figura 19 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	70
Figura 20 - Efeito da rutina sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.....	71
Figura 21 - Efeito da rutina sobre a atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	72
Figura 22 - Efeito da quercetina sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.....	73
Figura 23 - Efeito da quercetina sobre a atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	74
Figura 24 - Efeito do óleo essencial das folhas da <i>A. millefolium</i> sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro...	75
Figura 25 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre o esvaziamento gástrico de líquidos em ratas.....	76

Figura 26 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre o trânsito intestinal em camundongos fêmeas.....	77
Figura 27 - Padronização do modelo de diarreia induzida pelo óleo de rícino em camundongos fêmeas.....	79
Figura 28 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino (0,3 ml/30 g - vo) em camundongos fêmeas.....	80
Figura 29 - Comparação das atividades específicas entre as enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT no citosol do corpo e do fundo do estômago de ratas.....	82
Figura 30 - Comparação das atividades específicas das enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT entre o citosol do corpo e do fundo do estômago de ratas.....	83
Figura 31 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da enzima antioxidante GST da mucosa gástrica de ratas.....	83
Figura 32 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da enzima antioxidante NQO1 da mucosa gástrica de ratas.....	84
Figura 33 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da enzima antioxidante CAT da mucosa gástrica de ratas.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de quantificação para lesões agudas.....	36
Tabela 2 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por estresse (imobilização à 4 °C) em ratas.....	111
Tabela 3 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por indometacina (20 mg/kg - sc) em ratas.....	111
Tabela 4 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.....	112
Tabela 5 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a quantidade de muco gástrico e a concentração dos grupos sulfidrílicos não-protéicos(GSH) em ratas.....	112
Tabela 6 - Efeito da rutina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.....	113
Tabela 7 - Efeito da quercetina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.....	113
Tabela 8 - Efeito do óleo essencial das folhas da <i>A. millefolium</i> sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.....	114
Tabela 9 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da enzima antioxidante - NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) - na mucosa de ratas com lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo).....	114

Tabela 10 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da enzima antioxidante - glutathione S-transferase (GST) - na mucosa de ratas com lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo).	115
Tabela 11 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.....	115
Tabela 12 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol em ratas com ligadura do piloro.....	116
Tabela 13 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina em ratas com ligadura do piloro.....	116
Tabela 14 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por histamina em ratas com ligadura do piloro.....	117
Tabela 15 - Curva proteína-atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase isolada de cachorro.....	117
Tabela 16 - Curva tempo-atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase isolada de cachorro.....	118
Tabela 17 - Cinética da H ⁺ /K ⁺ -ATPase dependente de ATP.....	118
Tabela 18 - Efeito do omeprazol e oubaína na atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase.	118
Tabela 19 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	119
Tabela 20 - Efeito da rutina sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.....	119
Tabela 21 - Efeito da rutina sobre a atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	120
Tabela 22 - Efeito da quercetina sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.....	120
Tabela 23 - Efeito da quercetina sobre a atividade da H ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	121
Tabela 24 - Efeito do óleo essencial das folhas da <i>A. millefolium</i> sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.	121

Tabela 25 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre o esvaziamento gástrico de líquidos em ratas....	122
Tabela 26 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre o trânsito intestinal em camundongos fêmeas.....	122
Tabela 27 - Padronização do modelo de diarreia induzida pelo óleo de rícino em camundongos fêmeas.....	123
Figura 28 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino (0,3 ml/30 g - vo) em camundongos fêmeas.....	123
Tabela 29 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre o tratamento subcrônico de ratas.....	81
Tabela 30 - Comparação das atividades específicas entre as enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT no citosol do corpo e do fundo do estômago de ratas.....	124
Tabela 31 - Comparação das atividades específicas das enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT entre o citosol do corpo e do fundo do estômago de ratas.....	124
Tabela 32 - Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da <i>A. millefolium</i> (EABA) sobre a atividade da enzima antioxidante GST, NQO1 e CAT da mucosa gástrica de ratas.....	125

RESUMO

A *Achillea millefolium* L. conhecida popularmente como mil folhas e pronto alívio é amplamente utilizada pela população mundial para uma variedade de doenças incluindo o tratamento de distúrbios gastrointestinais e dor. Estudos científicos já validaram alguns desses usos populares da espécie embora os efeitos da planta no trato gastrointestinal (TGI) permaneçam sem avaliação.

Este trabalho teve por objetivo validar as ações do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium*, obtida de cultivo controlado e padronizado, no TGI como gastroprotetor. Também visamos determinar o(s) mecanismo(s) desta atividade assim como identificar a(s) provável(is) substância(s) ativa(s) responsável(is) por esta(s) ação(ões).

Para a determinação da atividade gastroprotetora da *A. millefolium*, estudamos os efeitos do extrato bruto aquoso (EABA, 125-2000 mg/kg - vo) na lesão gástrica experimental assim como na secreção ácida gástrica e na motilidade intestinal. Para isto, o extrato bruto aquoso das folhas de *A. millefolium* (EABA) foi preparado de acordo com a sua utilização popular (extração 10%, a 70 °C durante 30 minutos, três extrações sucessivas, rendimento 29%). A ação do EABA na úlcera gástrica experimental foi avaliada nos modelos de lesão aguda induzida por estresse (imobilização a 4 °C/3 h), por um antiinflamatório não-esteroidal (indometacina, 20 mg/kg - sc) e por um agente necrotizante etanol (70%, 0,5 ml/200 g - vo). O extrato da *A. millefolium* protegeu os animais contra lesões gástricas induzidas pela indometacina e pelo etanol mas não aquelas induzidas por estresse. Como a proteção da mucosa gástrica pelo EABA foi mais potente contra lesões induzidas pelo etanol (DI₅₀ = 936 mg/kg - vo) que pela indometacina (DI₅₀ > 2000 mg/kg - vo), o modelo de etanol foi utilizado para o estudo dos mecanismos gastroprotetores do extrato. A ação do EABA sobre dois importantes fatores protetores da mucosa gástrica, como a concentração de muco gástrico e a concentração de grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) assim como na atividade das enzimas antioxidantes gástricas (NADPH quinona oxidoreductase 1 - NQO1, glutationa S-transferase - GST e catalase - CAT), foram

avaliadas neste modelo. O EABA diminuiu a depleção de GSH induzida pelo etanol sem estimular as atividades das enzimas antioxidantes, indicando que o efeito gastroprotetor da planta estaria relacionada com a ativação de fatores citoprotetores dependentes de GSH. No entanto, neste experimento de lesão aguda verificou-se que o EABA reduz a atividade da GST em 32%. Resultados similares foram obtidos após tratamento subcrônico (EABA, 1000 mg/kg - vo/7 dias) indicando que o extrato não possui uma ação antioxidante que contribua para o efeito gastroprotetor.

O estudo dos efeitos do EABA na secreção ácida gástrica foi avaliada utilizando o modelo da ligadura pilórica (4 h em ratas), na presença de agonistas de receptores muscarínicos M₁ e M₃ (betanecol), receptores de gastrina CCKB (pentagastrina) e receptores histaminérgicos H₂ (histamina). O EABA reduziu a secreção ácida basal e a estimulada por histamina e betanecol sem alterar a secreção induzida por pentagastrina indicando uma possível atividade sobre a bomba de prótons. Complementamos então o estudo com a determinação das atividades do EABA sobre a atividade da enzima H⁺/K⁺-ATPase isolada de mucosa gástrica de cachorro, que foi inibida pelo EABA com CI₅₀ = 382 µg/ml. Esses resultados mostram que há também participação de um efeito antissecretor por bloqueio da bomba de prótons no mecanismo de gastroproteção do extrato.

Os efeitos do EABA na motilidade do trato gastrointestinal foi avaliado pelos métodos de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e diarreia induzida por óleo de rícino. O EABA não alterou nenhum desses parâmetros, permitindo-nos descartar efeitos colinérgicos e adrenérgicos na atividade gastroprotetora do extrato.

Da grande variedade de compostos isolados da *A. millefolium*, obtivemos os flavonóides rutina e quercetina e o óleo volátil do Laboratório de Fitoquímica da UFPR, que trabalha com a mesma amostra da planta, e avaliamos seus efeitos no modelo de lesão por etanol e no modelo de hipersecreção por ligadura pilórica. A quercetina (50-200 mg/kg - vo) protegeu os animais contra as lesões gástricas induzidas pelo etanol (DI₅₀ = 93 mg/kg - vo) mas não reduziu a secreção ácida gástrica nos animais com ligadura pilórica. No entanto, a rutina, nas doses testadas (50-200 mg/kg - vo) e o óleo volátil (5-50 mg/kg - vo) não alteraram a

secreção ácida de animais com ligadura pilórica nem protegeram os animais de lesões gástricas induzidas por etanol.

Ambos os flavonóides reduziram a atividade de hidrólise de ATP pela H^+/K^+ -ATPase isolada de cachorro com $CI_{50} = 231$ e $339 \mu M$, respectivamente.

Em conjunto, nossos resultados permitem sugerir que o EABA possui efeito gastroprotetor contra lesões induzidas pelo etanol. O mecanismo da ação gastroprotetora parece ocorrer por mecanismos dependentes da ativação de fatores de proteção relacionados ao GSH e com participação do efeito inibitório da secreção acida gástrica. É evidente também que os flavonóides, rutina e quercetina, seriam dois possíveis mas não as únicas substâncias ativas da planta.

ABSTRACT

Achillea millefolium L. popularly known as “mil folhas” and “pronto alívio” is widely used for a variety of illnesses including gastrointestinal disturbances and pain. Scientific studies confirmed some of *Achillea*'s folk uses although its effects on the gastrointestinal tract (GIT) remain without evaluation.

The aim of the present study was to validate of the effects of aqueous crude extract (EABA) of *A. millefolium* leaves on the GIT as gastroprotective. The plant was obtained from a controlled and standardized germoplasm bank. We also try to identify the mechanism(s) as well as the active principles responsible for the gastroprotective action of the plant.

For the determination of the gastroprotective activity of *A. millefolium*, we studied the effects of the EABA (125-1500 mg/kg - *po*) on experimental gastric lesion, gastric acid secretion and intestinal motility. For this, the EABA was prepared according to its popular use (10% extraction, 70 °C during 30 minutes, three extractions, yield of 29%). EABA action on experimental gastric ulcer was evaluated in models of acute lesion induced by stress (restraint and cold/3 h), non-steroidal antiinflammatory (indomethacin, 20 mg/kg - *sc*) and necrotizing agent ethanol (70%, 0.5 ml/200 g). The extract of *A. millefolium* protected the animais against gastric lesions induced by indomethacin and ethanol but not against those induced by stress. Protection of gastric mucosa by EABA was more potent in the model induced by ethanol (ID₅₀ = 936 mg/kg - *po*) that in the indomethacin (ID₅₀ > 2000 mg/kg - *po*). Then, the model of ethanol was used for the study of gastroprotective mechanisms of the extract. EABA action on two important protective factors of gastric mucosa like the gastric mucus and non-proteic sulphhydryl groups (GSH) levels as well as the activity of gastric antioxidant enzymes (NADPH quinone oxidoreductase 1 - NQO1, glutathione S-transferase - GST and catalase - CAT) were also evaluated in this model. EABA reduced the GSH depletion induced by ethanol but did not alter the activity of antioxidants enzymes indicating that the gastroprotective effect of plant is related to the activation of cytoprotective factors depending of GSH and not to and antioxidant effect coming from tested enzymatic systems. However, in this experiment of

acute lesion was verified that the EABA reduced the GST activity by 32%. Similar results were obtained after subchronic treatment (EABA, 1000 mg/kg - *po*/7 days). Although inexplicable with the present results, this effect deserves to be better studied in order to determine its full significance.

The study of EABA effects on gastric acid secretion was evaluated using the pylorus ligation model (4 h in rats) with or without the presence of agonists of receptors muscarinics (bethanecol), CCKB (pentagastrin) and histaminergic (histamine). The EABA reduced both the basal and stimulated acid secretion by histamine and bethanecol without altering the one induced by pentagastrin, indicating a possible activity in a muscarinic and histaminergic receptors or in the proton pump, the final step of gastric acid secretion, common to both pathways. Thus, the study on gastric acid secretion was complemented with study of the activity of EABA on the hydrolysis of ATP by the H⁺/K⁺-ATPase isolated from dog gastric mucosa. The activity of the enzyme was inhibited by EABA with IC₅₀ = 304 µg/ml. These results show that exist also participation of an anti-secretor mechanism which seems to be, at least in part, by blockade of the proton pump in the gastroprotective effect of the plant.

EABA effects on GIT motility were evaluated through determination of its effects on gastric emptying, intestinal transit and diarrhea induced by castor oil. EABA did not alter any of these parameters allowing us to discard cholinergic effects on gastroprotective activity of the extract.

From the large variety of isolated compounds of *A. millefolium*, we obtained the flavonoids rutin and quercetin and the volatile oil from Phytochemistry Laboratory of UFPR which works with the same lot of plant. We evaluated its effects on the ethanol induced gastric lesion and on hypersecretion model by pylorus ligation. Quercetin (50-200 mg/kg - *po*) protected the animals against gastric lesions induced by ethanol (ID₅₀ = 93 mg/kg - *po*) but did not alter the gastric acid secretion of animals with pylorus ligation. In the other hand, rutin (50-200 mg/kg - *po*) and the volatile oil (5-50 mg/kg - *po*) did not alter the acid secretion of animals with pylorus ligation neither protect the animals from gastric lesions induced by ethanol. However, both flavonoids reduced the hydrolysis of ATP by H⁺/K⁺-ATPase isolated of dog with IC₅₀ = 231 and 307 µM, respectively.

Collectively, our results validate the popular use of *A. millefolium* as gastroprotective agent. The mechanism of gastroprotective action seems to occur by mechanisms depending of activation of cytoprotective factors related to GSH with participation of inhibitory effect of gastric acid secretion. It is also evident, that the flavonoids rutin and quercetin are two possible but not the only ones active principles of the plant.

1. INTRODUÇÃO

Várias culturas têm explorado e utilizado as plantas para fins medicinais. A presença de plantas com propriedades medicinais em uma sepultura Neanderthal no Iraque sugere o seu uso com finalidade terapêutica há mais de 60 mil anos. Os primeiros registros do uso de plantas provêm da China (~3000 a.C.), onde o Imperador Shen Nung compilou o *Pen Tsao* (Compêndio de Matéria Médica Chinesa). Este livro teve várias edições subsequentes, e muitas das 1000 ou mais drogas descritas ainda são utilizadas na China (LANGMEAD & RAMPTON, 2001). O Papiro de Ebers, descoberto em uma sepultura no Egito em 1862, data de 1550 a.C. e é o texto médico mais antigo a subsistir. O papiro contém centenas de medicamento com plantas, incluindo a sene para constipação, dentre outros. A prática mesopotâmica está descrita em placas de barro datando do século 7 a.C., indicando novamente recursos derivados de plantas, óleo de rícino e sene, como laxativos (LANGMEAD & RAMPTON, 2001). Posteriormente, Teofrastus (370-287 a.C.), um botânico grego e pupilo de Aristóteles, e Dioscórides (40-90 a.C.), um cirurgião grego do exército de Nero, escreveram livros descrevendo o uso medicinal das plantas e seus produtos. Galeno (129-216 d.C.), médico grego, ampliou a obra de Dioscórides e preparou medicamentos vegetais combinados que hoje são conhecidos como preparações galênicas (COWEN & HELFAND, 1990). Perto do final do primeiro milênio, e influenciada fortemente pelos escritos de Galeno, a medicina árabe produziu um grande número de medicamentos derivados de plantas. Ao mesmo tempo, apareceu o primeiro manuscrito médico saxão o qual descrevia muitos medicamentos herbais e sua indicações (LANGMEAD & RAMPTON, 2001).

Até o início do século passado, cerca de 90% dos medicamentos disponíveis compreendiam plantas medicinais, mas devido às dificuldades no controle de qualidade desses extratos vegetais, do ponto de vista físico-químico, farmacológico e toxicológico, seus derivados isolados ou quimicamente sintetizados predominaram no mercado (LAPA *et al.*, 2000; CORRÊA *et al.*, 2001).

No entanto, as plantas medicinais tornaram-se um tópico de importância global crescente nos últimos anos, tendo repercussões tanto sobre a saúde mundial quanto no comércio internacional. Nos últimos 10 anos, as plantas

medicinais têm desfrutado de um renascimento e essa fase têm sido alimentada por muitos consumidores interessados na medicina preventiva e por desapontamento com os medicamentos alopáticos (MAHADY, 2001).

Na verdade, a origem trans-cultural das plantas medicinais e seu uso contínuo por séculos sugerem que ao menos alguns de seus constituintes possuem valor terapêutico. Apesar disso, o seu uso por mais de mil anos não garante sua eficácia ou sua segurança e, nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico e sua preconização, ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso, devem se fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (LAPA *et al.*, 2000; LANGMEAD & RAMPTON, 2001).

Os estudos de um novo medicamento, incluindo os fitoterápicos, costumam ser divididos em etapas seqüenciais. A primeira etapa do estudo é a seleção do material a ser testado. É essencial garantir a uniformidade química e a estabilidade do produto a ser utilizado durante todo o ensaio. Nesse sentido, os estudos envolvendo as plantas medicinais oferecem dificuldades já na fase preliminar. Primeiramente, porque é comum a confusão botânica entre espécies afins; em segundo lugar, porque exemplares de uma mesma espécie, colhidos em épocas diferentes, ou de locais diferentes, não têm necessariamente a mesma atividade biológica e; em terceiro lugar, porque é difícil controlar quimicamente um extrato vegetal em virtude do grande número de substâncias normalmente presentes (LAPA *et al.*, 2000).

Então, a avaliação científica cuidadosa da segurança e eficácia se torna essencial antes que as plantas medicinais ou fitoterápicos possam ser oficialmente incorporados nos sistemas de saúde primário e antes da aceitação global de seus benefícios à saúde (MAHADY, 2001).

Seguindo esse princípio, o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná busca contribuir para o uso seguro de plantas medicinais, através da pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas, para a validação das plantas

medicinais com atividade sobre o trato gastrointestinal. A demonstração da sua eficácia, em conjunto com a determinação da toxicidade e do estudo dos mecanismos de ação destes produtos formam parte importante dos estudos realizados no nosso laboratório.

1.1. ÚLCERA PÉPTICA

1.1.1. Definição

A úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes dos tecidos epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (MILANI & CALABRÒ, 2001).

1.1.2. Etiologia

A lesão celular (reversível ou irreversível) ocorre como resultado de uma ou várias causas, e se desenvolve através de múltiplas etapas. As causas mais comuns de lesão celular são: hipóxia e isquemia (conseqüência da diminuição do suprimento de sangue, da capacidade de transporte de O₂ e de atividade das enzimas antioxidantes do tecido), agentes químicos e drogas (etanol, indometacina), agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos), fatores físicos (força mecânica, temperaturas extremas, choque elétrico, radiações ionizantes) e defeitos genéticos e estresse (BÓDIS *et al.*, 1998).

Sob condições de estresse, o Sistema Nervoso Central é alterado com estimulação do hipotálamo e do centro medular causando alterações na motilidade gastrointestinal, aumento da secreção ácida e de pepsina, alteração da liberação de substâncias endógenas como glicocorticóides, catecolaminas e histamina; e também alterações da microcirculação causando isquemia, que provocam diminuição da vitalidade das células gástricas e de capilares, levando a necrose e ao desenvolvimento de úlceras (PACHALY *et al.*, 1993).

As drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs) permanecem entre os agentes farmacológicos mais utilizados e a sua habilidade de causar ulceração gastrointestinal foi demonstrada há mais de 60 anos (WALLACE, 2001b). As lesões tóxicas iniciam as erosões da mucosa gástrica induzidas pelos AINEs, mas a depleção de prostaglandinas (PGs) é essencial para o desenvolvimento de úlceras gástricas clinicamente significativas (ATAY *et al.*, 2000). Os AINEs interrompem a barreira de muco e bicarbonato da mucosa gástrica normal por

dois mecanismos. O principal mecanismo, independente da via de administração, resulta do distúrbio da síntese de PG pela inibição da isoenzima ciclooxigenase 1 (COX-1). No estômago, as PGs têm um papel vital na proteção, mantendo o fluxo sanguíneo da mucosa, estimulando a secreção de muco e bicarbonato e regulando a renovação celular e reparo da mucosa. Alguns AINEs podem danificar a mucosa gástrica por um segundo efeito direto. Os AINEs ácidos, incluindo a aspirina, tornam-se lipossolúveis em pH baixos e se tomados oralmente, podem atravessar a barreira lipídica das células da mucosa gástrica. No pH intracelular, perdem a solubilidade lipídica e ficam presos, interrompendo funções celulares, talvez por inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial (HAWKINS & HANKS, 2000). A interrupção do fluxo sanguíneo da mucosa é um dos eventos na lesão por AINEs, pois induzem isquemia microvascular, em parte causada pela aderência dos neutrófilos ao endotélio da microcirculação. A toxicidade dos AINEs pode ser devido a radicais livres, oxidação mitocondrial diminuída e produção de óxido nítrico (NO) reduzida (ATAY *et al.*, 2000).

As doenças do trato gastrointestinal relacionadas ao álcool possuem um papel importante na gastroenterologia clínica. A lesão da mucosa gástrica ocorre devido a uma diminuição de função da barreira de muco, a principal proteção contra o ácido gástrico. Altas concentrações de etanol levam a um aumento da permeabilidade epitelial, como consequência de mudanças da diferença de potencial celular que é causado pela re-difusão de íons H^+ através da mucosa lesada, e danos da mucosa principalmente devido aos distúrbios vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo local (SIEGMUND *et al.*, 2003). O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e diminuição dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (REPETTO & LLESUY, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido reportadas como mediadoras dos distúrbios microvasculares que precedem as lesões da mucosa gástrica induzidas por estresse, AINEs e etanol (RASTOGI *et al.*, 1998; REPETTO & LLESUY, 2002). Essas moléculas, como por exemplo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são constantemente geradas nas células através de processos como a fosforilação

oxidativa/transporte de elétron mitocondrial, o metabolismo de xenobióticos e a inflamação. O aumento dos níveis intracelulares de ROS, tais como quando as defesas antioxidantes celular são insuficientes para manter abaixo do limiar tóxico, é comumente referido como estresse oxidativo. Essas moléculas são altamente reativas e interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais como o DNA, proteínas e lipídios (CNUBBEN *et al.*, 2001).

1.1.3. Mecanismos de Defesa da Mucosa Gástrica

A integridade da mucosa gástrica é mantida devido ao balanço entre fatores agressores e mecanismos de defesa (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001). Os mecanismos de defesa da mucosa gastrointestinal podem ser divididos didaticamente em pré-epitelial, epitelial e subepitelial e que funcionam em conjunto para prevenir a lesão da mucosa (FLEMSTRÖM & ISENBERG, 2001).

1.1.3.1. Proteção pré-epitelial

O epitélio gástrico é coberto por uma camada contínua de muco e bicarbonato, os quais constituem os mais importantes fatores protetores pré-epiteliais contra a autodigestão da mucosa gástrica pelo ácido e pela pepsina (MOJŽIŠ *et al.*, 2000).

O muco gástrico consiste de um gel viscoso, elástico, aderente e transparente formado por 95% de água e 5% de glicoproteínas (REPETTO & LLESUY, 2002). O muco gástrico ocorre em 3 formas: mucina solúvel presente no suco gástrico, muco (aderente) insolúvel cobrindo as células da mucosa e o muco presente nas células secretoras de muco (MOJŽIŠ *et al.*, 2000). O muco é secretado por células secretoras de muco encontradas entre as células superficiais por toda a mucosa gástrica (KUTCHAI, 1996; RANG *et al.*, 2001).

Outro elemento chave na prevenção do dano epitelial é o bicarbonato (HCO_3^-) e qualquer fator que diminui a sua disponibilidade pode aumentar a vulnerabilidade da mucosa ao ácido. O HCO_3^- alcança o epitélio via circulação sanguínea bem como da conversão de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ em HCO_3^- pela anidrase

carbônica intracelular. A secreção de HCO_3^- é induzida por estímulo colinérgico, pelas PGs e pela presença de um baixo pH luminal, enquanto que a sua secreção é inibida pelo estímulo simpático (adrenoreceptores α_2) (FLEMSTRÖM & ISENBERG, 2001).

As mucinas ou glicoproteínas de muco são uma família de moléculas polidispersas, que em conjunto com o bicarbonato, estão designadas a realizar múltiplas tarefas na superfície da mucosa do trato gastrointestinal (TGI) (CORFIELD *et al.*, 2001). Dentre elas, podemos citar: a) lubrificação e proteção mecânica da mucosa gástrica; b) barreira misturadora; c) manutenção do fluxo unidirecional de íons H^+ ; d) prevenção da retrodifusão de pepsina e ativação de pepsinogênio; e) reparação de lesão superficial da mucosa; f) atividade antibacteriana; e g) atividade antioxidante (GOEL & BATTACHARYA, 1991; FORSTNER & FORSTNER, 1994).

1.1.3.2. Proteção epitelial

As células epiteliais formam a segunda linha de defesa pois as propriedades físicas da membrana das células apicais e a junções intercelulares são responsáveis pela prevenção da difusão dos íons H^+ na mucosa, promovendo assim uma barreira física (SHORROCK & REES, 1988). Além disso, as células epiteliais são capazes de uma rápida renovação e migração, substituindo as células antigas por outras mais jovens (SHORROCK & REES, 1988; WALLACE & GRANGER, 1996).

Para se defender contra ataques de radicais livres, as células desenvolveram diferentes sistemas antioxidantes: moléculas antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutatona, entre outras; e enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). Em condições fisiológicas, esses mecanismos de defesa mantêm uma concentração constante baixa de radicais livres na célula (MICHIELS *et al.*, 1994).

A forma reduzida do tiol triptídeo, glutatona (GSH) é um dos principais mecanismos endógenos de defesa contra o estresse oxidativo. O GSH atua como um varredor de radicais livres e substâncias tóxicas ingeridas com a comida ou

produzidas diretamente no TGI (SHIRIN *et al.*, 2001). Sob condições de estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas pelo GSH com a concomitante formação de glutathiona oxidada, GSSG. Além da sua ação como um antioxidante químico, o GSH também atua na primeira linha de defesa antioxidante como um cofator da glutathiona peroxidase na redução de peróxidos, também resultando na formação de GSSG. Em circunstâncias fisiológicas normais, o GSSG é reduzido a GSH pela glutathiona redutase às custas de NADPH (CNUBBEN *et al.*, 2001).

As enzimas antioxidantes que proporcionam a primeira linha de defesa contra as ROS, geradas pelo estresse oxidativo, são a SOD, a CAT e a GPx (CNUBBEN *et al.*, 2001). A SOD tem a função de remover ânions superóxidos do ambiente celular pela conversão de dois radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (Figura 1 A) (FATTMAN *et al.*, 2003). Vários tipos de SODs têm sido relatadas: a Cu,ZnSOD, a FeSOD, a MnSOD e a NiSOD (MATÉS, 2000; NOOR *et al.*, 2002; FATTMAN *et al.*, 2003). A CAT é uma enzima onipresente encontrada em todos os organismos conhecidos e contém um grupamento heme no seu sítio ativo responsável pela sua atividade catalítica, onde duas moléculas de H_2O_2 são transformadas em duas de H_2O e O_2 (Figura 1 B) (MICHIELS *et al.*, 1994; MATÉS, 2000). O H_2O_2 também pode ser catabolizado pela GPx, que possui um papel crítico na defesa contra o estresse oxidativo. Existem dois tipos de enzimas: a GPx dependente de selênio (Se) e a GPx independente de Se. A GPx dependente de Se é capaz de reduzir o H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos, enquanto que a GPx independente de Se é inativa com o H_2O_2 e só catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos (Figura 1 C) (MATÉS, 2000; CNUBBEN *et al.*, 2001). Outras enzimas, como a NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e a glutathiona S-transferase (GST), também protegem as células contra o estresse oxidativo (MATÉS, 2000). A NQO1 é uma enzima antioxidante que reduz quinonas endógenas e exógenas formando hidroquinonas, que auxiliam na proteção da membrana celular contra os danos oxidativos (Figura 1 D) (ROSS *et al.*, 2000). Já a GST catalisa a conjugação de compostos eletrofílicos ao GSH (Figura 1 E) e a diversidade de substratos é resultado da natureza relativamente não-específica do sítio de ligação para substratos

hidrofóbicos e da existência de numerosas isoformas de GST (α , μ , π , θ , σ , ζ e κ) (CNUBBEN *et al.*, 2001).

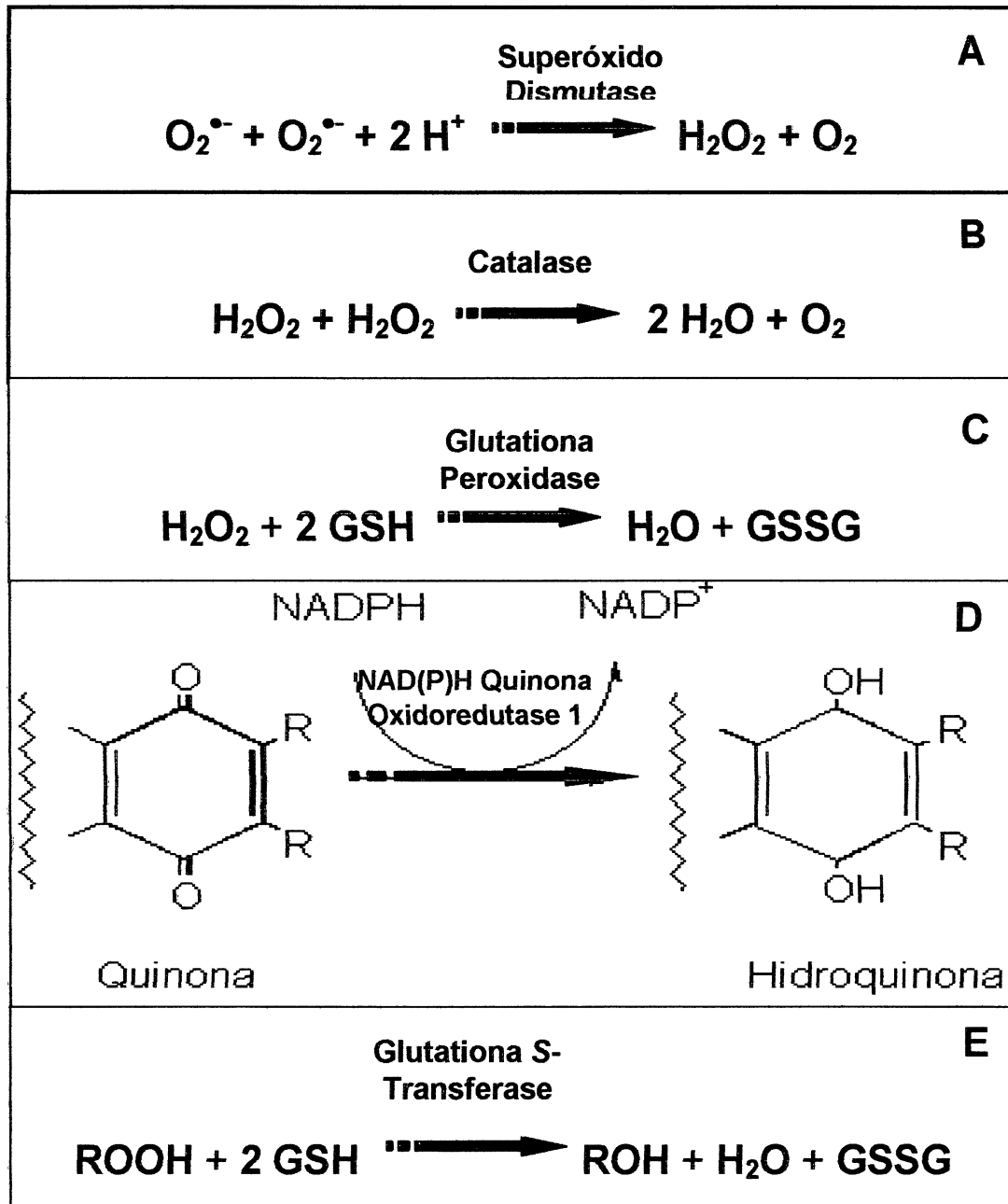


Figura 1: Reações catalisadas pelas enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), glutaciona peroxidase (C), NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (D) e glutaciona S-transferase (E) (adaptado de CNUBBEN *et al.*, 2001).

Outro componente da proteção epitelial são os fatores de crescimento que estimulam importantes elementos celulares de cicatrização da úlcera como a angiogênese, formação de tecido de granulação e re-epitelização, mas sua especificidade e potência variam (SZABO & VINCZE, 2000). O fator de crescimento epidermal (EGF) está intimamente envolvido na manutenção da integridade da mucosa através da estimulação da síntese de DNA e subsequente regulação da proliferação e diferenciação de uma variedade de tipos celulares no TGI. Reconhece-se que o EGF é crítico para a proteção e reparo da mucosa pela diminuição da secreção ácida, aumento do fluxo sangüíneo, aperfeiçoamento da restituição, aumento da síntese e secreção de muco e estabilização do citoesqueleto de actina (ELLIOTT *et al.*, 2000). O EGF inibe a secreção ácida gástrica, no entanto, este efeito não explica sua ação gastroprotetora, porque o peptídeo é efetivo em doses menores do que as necessárias para reduzir a secreção ácida gástrica (SZABO & VINCZE, 2000).

O óxido nítrico (NO) tem sido reconhecido recentemente como um mediador fundamental nos mecanismos de defesa gástrica, devido a sua habilidade de aumentar o fluxo sangüíneo da mucosa gástrica e a produção de muco e de inibir a aderência de neutrófilos às células endoteliais (CORUZZI *et al.*, 2000). O NO endógeno parece estar envolvido na regulação da secreção ácida gástrica pós-prandial. Este efeito pode estar mediado pela mudança na liberação de gastrina e somatostatina. O NO endógeno também retarda o esvaziamento gástrico e a atividade motora antral sem afetar a atividade mioelétrica gástrica (KONTUREK *et al.*, 1999). O NO é sintetizado pela NO sintase (NOS) a partir de oxigênio (O₂) e L-arginina. Existem três isoformas conhecidas da NOS: uma forma induzida - iNOS (expressa em macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasores) e duas dita constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio (eNOS) e nos neurônios (nNOS) (CHO, 2001; UCHIDA *et al.*, 2001).

1.1.3.3. Proteção sub-epitelial

A circulação sanguínea gástrica mantém a estrutura e as funções do estômago, e por isso está associada com a patogênese e cicatrização das lesões gastrointestinais. O fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, regulado por fatores humorais e neurais, também é modificado por fatores metabólicos locais. Os fatores derivados do endotélio, que são produzidos pelas células endoteliais vasculares induzindo o relaxamento ou a contração dos vasos sanguíneos, também são reconhecidos como mediadores básicos que regulam a circulação do estômago (RODRÍGUEZ-TÉLLEZ *et al.*, 2001). O fluxo sanguíneo protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e bicarbonato, por remover íons H^+ que penetram nas barreiras mucobicarbonato e epiteliais, por diluir os produtos do metabolismo celular e por neutralizar substâncias tóxicas (WALLACE & GRANGER, 1996). O fluxo sanguíneo é essencial para muitos mecanismos. A manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa permite a rápida restituição de uma lesão epitelial (SZABO, 1991; ABDEL-SALAM *et al.*, 2001).

As prostaglandinas (PGs) mantêm a integridade da mucosa gástrica pela inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco e bicarbonato, inibição da ativação de mastócitos, diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular, inibição da apoptose, aumento ou manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa, assim prevenindo a isquemia (ATAY *et al.*, 2000).

A enzima ciclooxigenase (COX) converte o ácido araquidônico em prostaglandina G_2 pela inserção de duas moléculas de oxigênio e então reduzindo este intermediário a prostaglandina H_2 (PGH_2). A PGH_2 é um metabólito instável que é convertido em outras espécies de prostaglandinas, incluindo prostaglandina E_2 , prostaciclina e tromboxanos (ATAY *et al.*, 2000). Está bem estabelecido que existe pelo menos duas isoformas distintas da COX, denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos (PESKAR, 2001) e esta isoforma provavelmente promove a produção de PG protetora da mucosa gástrica e que possui um papel importante na manutenção da homeostase (RODRÍGUEZ-TÉLLEZ *et al.*, 2001). Ao contrário, a expressão da COX-2

geralmente é baixa sob condições basais. O aumento da expressão da COX-2 ocorre em certas condições patofisiológicas como a inflamação, dano tecidual e transformação maligna (PESKAR, 2001).

Outro fator importante na proteção sub-epitelial é o tônus muscular, pois o esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal e a mistura ácido-base representam mecanismos de defesa gástrica. A contração do músculo liso da parede do estômago influencia no fluxo sangüíneo local, comprimindo os pequenos vasos sangüíneos que atravessam a *muscularis mucosae*, contribuindo para a lesão celular. A contração do músculo também contribui para o desenvolvimento de congestão e estase local por drogas como o etanol (SZABO & BYNUM, 1988; HOLZER *et al.*, 1994).

Outro fator de proteção sub-epitelial é a resposta inflamatória aguda deflagrada pela entrada de bactérias ou material antigênico na lâmina própria e é uma tentativa de limitar a entrada desse material, prevenindo a sua chegada à circulação sistêmica. Os neutrófilos são recrutados da circulação pelos fatores quimiotáticos liberados por macrófagos e mastócitos (WALLACE & GRANGER, 1996; WALLACE, 2001a).

1.1.4. Secreção Ácida Gástrica

O estômago humano secreta cerca de 2,5 L de suco gástrico diariamente (RANG *et al.*, 2001). A mucosa gástrica pode ser dividida em três regiões histológicas que são caracterizadas pelas suas glândulas: pilórica, da cárdia e oxíntica. A região glandular pilórica possui células secretoras de muco, poucas células pépticas que secretam pepsinogênio e células endócrinas como a célula G, que libera o hormônio gastrina e a célula D liberadora de somatostatina. A região glandular da cárdia possui primariamente células secretoras de muco. A região glandular oxíntica contém as células parietais, que secretam ácido clorídrico e fator intrínseco, as células pépticas, células secretoras de muco, células endócrinas como a célula do tipo enterocromafin (ECL) liberadora de histamina e a célula D, e células indiferenciadas (HERSEY & SACHS; 1995; KUTCHAI, 1996; GUYTON & HALL, 1997; AZERKAN *et al.*, 2001).

Os pepsinogênios são proteínas digestivas secretadas pelas células principais como proenzimas e então convertidas, no lúmen do estômago, em pepsinas (enzima ativa) pelo ácido clorídrico do suco gástrico. Supõe-se que a estimulação da secreção de pepsinogênio pelas células principais seja mediada por dois caminhos diferentes, um envolvendo o aumento intracelular de adenosina monofosfato cíclica (AMPC), enquanto que o outro envolve uma elevação do cálcio intracelular (GRITTI *et al.*, 2000).

As células parietais possuem um sistema de canalículos ramificados secretórios, que cursam através do citoplasma e estão conectados a uma saída comum para a superfície luminal da célula (KUTCHAI, 1996). A célula parietal gástrica tem dois sistemas de membranas características. Um é constituído pelos canalículos intracelulares e o outro, pelas membranas tubulovesiculares. O compartimento tubulovesicular é drasticamente depletado durante a secreção ácida gástrica máxima e isto é coincidente com um aumento da superfície da membrana canalicular da célula (OGATA & YAMASAKI, 2000).

O mecanismo da secreção de H^+ e Cl^- pelas células parietais é o seguinte: H^+ e HCO_3^- são derivados do CO_2 produzido pelo metabolismo da célula. H^+ é secretado para o lúmen do canalículo secretório pela H^+/K^+ -adenosina trifosfatase (ATPase) em troca de K^+ . o Cl^- flui do citosol para o lúmen do canalículo através de um canal eletrogênico de Cl^- . A alcalinidade citosólica gerada pela secreção de H^+ é dissipada por HCO_3^- e OH^- , deixando a célula pela membrana basolateral via trocador de ânions na troca por Cl^- . Os íons HCO_3^- e OH^- deixam a célula ao longo do gradiente de potenciais eletroquímicos, potenciando a captação ativa de Cl^- contra seu gradiente de potencial eletroquímico pela membrana basolateral (KUTCHAI, 1996).

A H^+/K^+ -ATPase gástrica, a bomba de prótons da célula parietal, é uma importante enzima do passo final da secreção ácida no estômago (ONO *et al.*, 2000). A H^+/K^+ ATPase catalisa uma troca eletroneutra de H^+ para o lúmen gástrico por K^+ , às custas de adenosina trifosfato (ATP). A H^+/K^+ -ATPase gástrica é composta por duas subunidades, uma α -subunidade catalítica e uma β -subunidade excessivamente glicosilada, as quais interagem para dar estabilidade conformacional para a enzima (LACAPÈRE *et al.*, 2000).

1.1.4.1. Regulação da secreção ácida a nível celular

A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo e complexo controlado por múltiplos mecanismos centrais (neurais) e periféricos (endócrino e parácrino). Os mecanismos neuronais são regidos pela acetilcolina (ACh), os parácrinos pela histamina e os endócrinos pela gastrina e desempenham papéis importantes na regulação da secreção ácida (HOOGERWERF & PASRICHA, 2003).

Fatores estimulantes da secreção ácida

↳ Acetilcolina (ACh)

A liberação de acetilcolina pelas fibras vagais pós-ganglionares estimula diretamente a secreção de ácido gástrico por meio de um receptor colinérgico muscarínico do subtipo M_3 , localizado na membrana basolateral das células parietais. A ACh também age indiretamente através da interação com receptores muscarínicos M_1 das células do tipo enterocromafin, promovendo a liberação de histamina, que estimula diretamente a célula parietal (SHAMBUREK & SCHUBERT, 1993). A ativação do receptor colinérgico resulta na liberação de cálcio dos estoques mediada pela formação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) pela fosfolipase C, bem como da entrada de cálcio extracelular que é modulada por várias substâncias ativadas pela fosfolipase A_2 (HIRSCHOWITZ *et al.*, 1995). O cálcio se une a proteínas fixadoras de cálcio, como a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina que fosforila proteínas em cascata e ativa as proteínas quinases cálcio dependentes (PKC). A ativação da PKC permite a fosforilação de proteínas que irão ativar a H^+/K^+ -ATPase (a bomba de próton) (SHAMBUREK & SCHUBERT, 1993).

↳ Histamina

A histamina é secretada pelas células do tipo enterocromafins (ECL) em resposta à gastrina circulante, estimulando os receptores H₂ cuja função principal é disparar a secreção de ácido gástrico (OGURI & YONEYA, 2002). As células ECL são estimuladas pela ACh, gastrina e pelo peptídeo ativador da adenilato ciclase da pituitária (PACAP) e suprimida pela somatostatina e galanina (LINDSTRÖM & HÅKANSON, 2001). A histamina mobilizada das células ECL alcança a célula parietal por difusão ou por transporte capilar e une-se aos receptores H₂ da membrana da célula parietal e ativa a enzima adenilato ciclase presente na membrana plasmática, aumentando o nível de AMPc que estimula uma proteinoquinase dependente de AMPc (PKA), fosforilando as proteínas reguladoras da secreção ácida (KUTCHAI, 1996; LINDSTRÖM *et al.*, 2001).

↳ Gastrina

A gastrina é o principal peptídeo endócrino estimulatório da liberação de histamina pelas células ECL. É liberada na corrente sangüínea pelas células G do antro (LINDSTRÖM *et al.*, 2001) em resposta à aminoácidos aromáticos e aminas no lúmen gástrico ou em resposta ao peptídeo liberador de gastrina das fibras pós-ganglionares do vago (ATHMANN *et al.*, 2000). A gastrina se liga a receptores CCK-B presentes nas células ECL e parietal, liberando histamina das células ECL através da cascata de cálcio. A ligação ao receptor CCK-B na célula parietal também habilita uma cascata de cálcio, mas esse caminho de sinalização na célula parietal e suas conseqüências também dependem de uma elevação concomitantemente de AMPc (ATHMANN *et al.*, 2000). Parece que o mecanismo hormonal da ação da gastrina é igual ou talvez mais importante que o do nervo vago na produção e controle da secreção gástrica. Quando há atuação de ambos os mecanismos simultaneamente produz-se um sinergismo com efeito multiplicador na produção do suco gástrico (SANIOTO & AIRES, 1999). E segundo KONTUREK & DOMSCHKE (1999), infecção por *Helicobacter pylori* do

antro gástrico aumenta a liberação de gastrina e conseqüentemente a produção de ácido.

Fatores inibidores da secreção ácida

↳ Somatostatina

A somatostatina é um peptídeo inibitório liberado pelas células D localizadas nas áreas do antro e do fundo do estômago. Dois mecanismos do efeito antissecretor da somatostatina têm sido reportados: o primeiro é devido a uma interação direta sobre as células parietais, o outro é devido a inibição da liberação de histamina das células ECL. Ambos mecanismos ocorrem através da ativação de receptores de somatostatina SST₂ localizados nas células ECL e parietal (KOMASAKA *et al.*, 2002). O receptor SST₂ está acoplado à proteína G inibitória (G_i) (ATHMANN *et al.*, 2000) e também pode inibir a secreção ácida provocada pelos agonistas de Ca²⁺ e a liberação de histamina pelas células ECL (KUTCHAI, 1996). KOMASAKA *et al.* (2002) observaram que a inibição da liberação de histamina pelas células ECL tem o papel mais importante na inibição da secreção ácida gástrica pela somatostatina do que o efeito inibitório direto sobre as células parietais.

↳ Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) exercem efeitos inibitórios sobre a célula parietal, com o que a inibição da sua síntese pode resultar em um aumento da secreção ácida gástrica (WALLACE, 2001b). As PGs unem-se ao receptor de PGE₂ na célula parietal e ativam uma proteína G inibitória (G_i), que inibe a enzima adenilato ciclase (KUTCHAI, 1996). As PGs endógenas modulam a secreção ácida pelo bloqueio do aumento de AMPc estimulado por histamina dentro da célula parietal (ATAY *et al.*, 2000).

1.1.5. Terapêutica atual

A formação da úlcera péptica é atribuída a um desequilíbrio entre fatores agressivos (ácido e pepsina) e fatores protetores (resistência da mucosa) (YESILADA *et al.*, 2000). Na tentativa de proteger a mucosa gástrica do ácido gástrico, aumentar a cicatrização e prevenir a recorrência da úlcera, o controle farmacológico da secreção ácida gástrica tem representado um alvo desejável. Vários fármacos, como os antagonistas dos receptores histaminérgicos e colinérgicos, inibidores da H^+/K^+ -ATPase e agentes citoprotetores têm sido desenvolvidos, e muito deles ativamente utilizados para o tratamento de doenças gástricas (AIHARA *et al.*, 2003).

O primeiro antagonista dos receptores H_2 foi desenvolvido por BLACK *et al.* (1972) e com pequenas alterações BRIMBLECOMBE *et al.* (1975) desenvolveram a cimetidina, a qual foi amplamente prescrita para o tratamento de úlceras pépticas no mundo inteiro. Através da modificação da estrutura química da cimetidina, foram desenvolvidos a ranitidina, a famotidina e a nizatidina (AIHARA *et al.*, 2003). Estas drogas inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores na membrana basolateral das células parietais (HOOGERWERF & PASRICHA, 2003). Recentemente, os antagonistas dos receptores H_2 têm se tornado a primeira linha de terapia para doenças pépticas relacionadas ao ácido, levando a uma marcada melhora na qualidade de vida para um grande número de pacientes, bem como a uma redução dramática no uso de intervenção cirúrgica para o tratamento da úlcera (AIHARA *et al.*, 2003).

Os compostos anticolinérgicos pirenzepina e telenzepina, podem reduzir a produção basal de ácido em cerca de 40-50%, mas devido a sua eficácia relativamente pobre, assim como pelos seus acentuados efeitos colaterais anticolinérgicos, a sua utilização está diminuindo (HOOGERWERF & PASRICHA, 2003).

A identificação da bomba de ácido, H^+/K^+ -ATPase, como o passo final da secreção ácida gástrica proporcionou uma oportunidade única para desenvolver uma nova classe de drogas que hoje são os supressores da secreção ácida

gástrica mais eficazes. FELLENIUS *et al.* (1981) descobriram que os derivados benzimidazóis inibiam fortemente a secreção ácida gástrica. Depois da triagem de um vasto número de derivados, o primeiro inibidor da bomba (omeprazol) foi descoberto. Atualmente, existem vários inibidores da bomba de próton disponíveis para o uso clínico: omeprazol, lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol (AIHARA *et al.*, 2003; HOOGERWERF & PASRICHA, 2003). Estudos animais e clínicos demonstraram que o efeito antissecretor do omeprazol persiste por um longo período devido à ligação covalente da droga a H⁺/K⁺-ATPase. Portanto, o omeprazol aumenta a cicatrização da úlcera devido ao seu potente e persistente efeito antissecretor (AIHARA *et al.*, 2003).

Os antiácidos, como o bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio ou preparações combinadas, proporcionam imediatamente o alívio efetivo da dor pela neutralização do ácido intraluminal. Porém, como as drogas antissecretoras mais potentes e seguras, como os antagonistas dos receptores H₂ e inibidores da bomba de ácido, estão disponíveis, os antiácidos neutralizadores não são comumente utilizados na clínica médica para o tratamento da úlcera péptica (AIHARA *et al.*, 2003).

Um dos maiores problemas relativo à úlcera gastroduodenal é que, embora a taxa de cicatrização com antagonistas H₂ e inibidor da bomba de prótons seja de 80-100% depois de uma terapia de 4 semanas, a recorrência da úlcera dentro de 1 ano depois do término do tratamento está entre 40-80% na maioria dos estudos. Dados na literatura indicam que as úlceras cicatrizadas espontaneamente ou depois do uso de cimetidina (antagonista H₂) são precariamente vascularizadas e têm de 2-3 vezes menos densidade de vasos sanguíneos novos do que no tecido normal ao redor, acreditando-se ser uma das razões da recorrência (SZABO & VINCZE, 2000).

Então, a busca de outros mecanismos de ação, além da inibição da secreção ácida gástrica, para a cicatrização da úlcera tem aumentado. Os agentes citoprotetores são capazes de potencializar os mecanismos de proteção da mucosa e/ou proporcionar uma barreira física sobre a superfície da úlcera (RANG *et al.*, 2001).

Dentre os agentes citoprotetores mais conhecidos está o Misoprostol, um análogo estável da prostaglandina E₁ (PGE₁) que inibe a secreção ácida gástrica, tanto basal quanto a que ocorre em resposta aos alimentos, à histamina, pentagastrina e cafeína através de uma ação direta sobre a célula parietal (RANG *et al.*, 2001). Mantém a barreira da mucosa gástrica e o fluxo sangüíneo da mucosa (HAWKINS & HANKS, 2000), mas apresenta efeitos colaterais como diarreia e cólicas abdominais, além disso, é um abortivo em potencial (HOOPERWERF & PASRICHA, 2003).

Outro agente citoprotetor é o sucralfato que consiste em octassulfato de sacarose e em ambiente ácido sofre um amplo encadeamento cruzado e polimerização para produzir um gel viscoso e pegajoso que adere firmemente às células epiteliais. Além da inibição da hidrólise das proteínas da mucosa pela pepsina, o sucralfato estimula a produção local de prostaglandinas e do fator de crescimento epidermal (HOOPERWERF & PASRICHA, 2003).

O alto custo dos medicamentos é um fator de fundamental importância, que muitas vezes limita a utilização destes produtos e que justifica a busca por novas alternativas eficazes e seguras com plantas medicinais para o tratamento das dispepsias e outras lesões gástricas. Relatos científicos mostram a existência de uma grande variedade dessas plantas com atividade gastroprotetora, com diferentes mecanismos de ação, indicando que as plantas medicinais constituem-se em uma fonte de novas drogas.

Dentre as plantas estudadas com potencial ação terapêutica antiúlcera estão as flores de *Spartium junceum* L. (Fabaceae) originária da Anatólia meridional que foi efetiva na prevenção da formação de lesão gástrica induzida por estresse quando administrada oralmente (YESILADA *et al.*, 2000); o óleo de *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), de países do Mar Mediterrâneo, Paquistão e Índia que possui um efeito citoprotetor, antioxidante e um efeito inibitório sobre a peroxidação dos lipídios (EL-DAKHAKHNY *et al.*, 2000); o extrato aquoso de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), de países do Caribe, que apresentou um efeito antiúlcera gástrico quando as lesões foram induzidas por etanol acidificado (PERERA *et al.*, 2001). Da flora brasileira, a *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), conhecida como espinheira santa; a *Baccharis illinita* DC

(Asteraceae), conhecida como erva milagrosa, e a *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), conhecida como paratudo, são plantas que já têm estudos científicos que sugerem propriedades antiulcerogênicas (SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991; BAGGIO *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2004).

Em estudos anteriores com uma espécie silvestre das folhas da *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), foi observada ação antiulcerogênica e antissecretora ácida gástrica (BAGGIO *et al.*, 2002). Então, este trabalho visa dar continuidade aos estudos das ações das folhas de *Achillea millefolium* L. sobre o trato gastrointestinal.

1.2. *Achillea millefolium* L.

1.2.1. Descrição botânica

A *Achillea millefolium* L. pertence à família Asteraceae e caracteriza-se por ser uma planta herbácea, perene e rústica, rizomatosa e estolonífera, glabra ou pouco lanuginosa, com caules eretos, ramosos na parte superior, alcançando de 20-60 cm de altura. Suas folhas são alternas, oblongo-lanceoladas, aromáticas, verde-acinzentadas escuras, profundamente bi ou tripinatissetas, com segmentos lineares, de 60-100 mm de comprimento total, por 20-40 mm de largura (Figura 2) (PIO CORREIA, 1979; PACIORNIK, 1989).

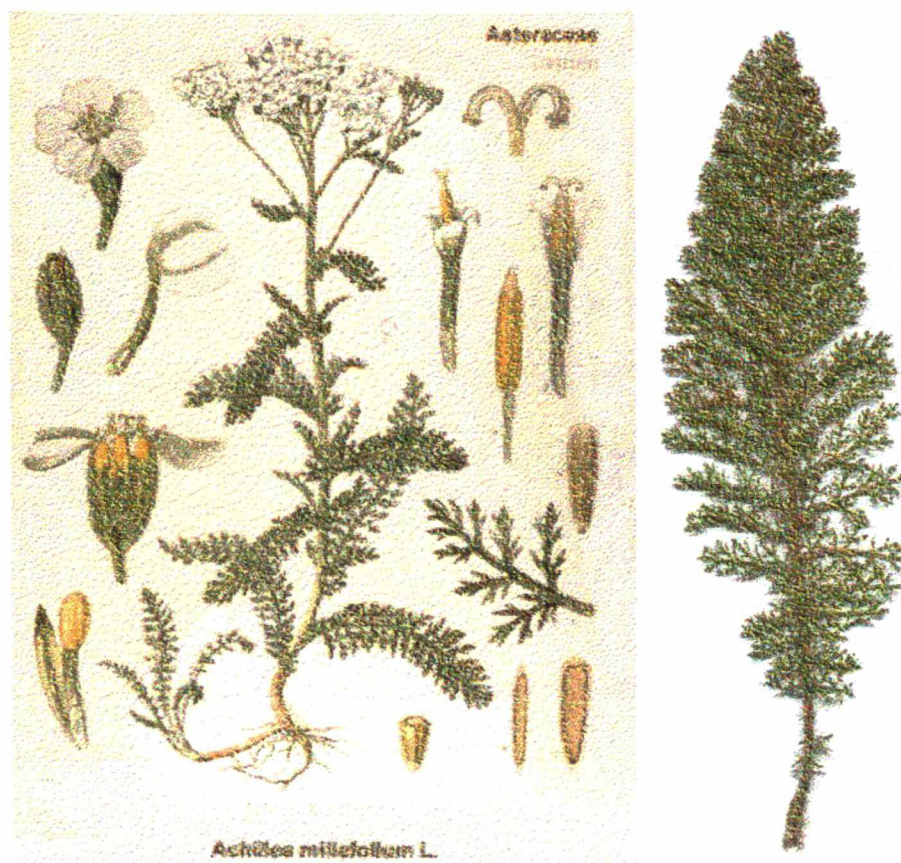


Figura 2: Detalhes da *A. millefolium* L. e de sua folha (Ilustração: KÖHLER, 1887; foto: YATSKIEVYCH, MBG, *on line*, 2000).

As flores são pequenas e dimorfas; as marginais brancas, femininas; liguladas, as do disco são hermafroditas, amarelas, tubulosas; aquênios compridos, oblongos, glabros, de 1,5-2 mm de comprimento, desprovidos de pappus e apresentam coloração branca, rosada, magenta ou vermelha (Figura 3) (PIO CORREIA, 1979; PACIORNIK, 1989).

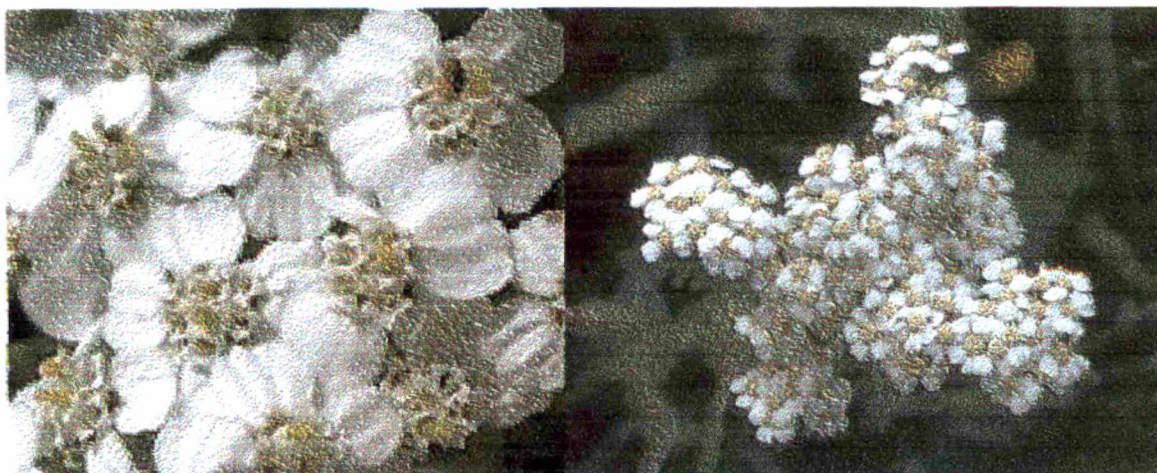


Figura 3: As flores da *A. millefolium*. (foto: A.VOGEL, *on line*, 2004)

1.2.2. Distribuição

A *A. millefolium* como a maior parte das 85 espécies conhecidas do gênero é encontrada principalmente na Europa e Ásia e um pouco na América do Norte. Só na Turquia são encontradas 40 espécies de *Achilleas* (CANDAN *et al.*, 2003). As *Achilleas* crescem em climas temperados a subtropicais, tolerando condições climáticas extremas como o sol pleno, geadas, frio intenso (até -15 °C) e seca (CHANDLER, 1989; CORRÊA JR. *et al.*, 1994). A *A. millefolium* é uma planta perene e invasora, que se adapta bem em solo drenado, permeável e ensolarado, progredindo também em solos pobres. Quando cultivada floresce na primavera, quando nativa floresce duas vezes ao ano, nos meses de Maio e Setembro. Na Europa e nos EUA floresce nos meses de Maio e Junho (OKA, 1998). Em Curitiba, floresce geralmente de Novembro a Janeiro (CORRÊA JR. *et al.*, 1994).

1.2.3. Sinonímia

A *A. millefolium* é a espécie mais conhecida entre os membros da *Achillea* (CANDAN *et al.*, 2003). O nome do gênero, *Achillea*, provavelmente deriva do herói grego, Achilles, que utilizava as folhas para tratar os ferimentos durante a Guerra de Tróia (1200 a.C.) (GOLDBERG *et al.*, 1969; CHANDLER, 1989; TORRES & CHÁVEZ, 2001). O nome da espécie, *millefolium*, refere-se ao tipo das folhas, as quais são delicadamente divididas fazendo com que a planta aparente ter mil folhas (CHANDLER, 1989).

Esta espécie é conhecida popularmente por vários nomes diferentes, dentre eles pode-se citar: milefólia, erva de cortaduras, mil-folhas, erva dos carreteiros, pronto alívio, mil-em-rama, mil-folhada, erva-do-carpinteiro, schafgarbe (alemão), milenrama (espanhol), millefeuille (francês), yarrow e milfoil (inglês), millefoglie (italiano) (PIO CORREIA, 1979; TERAPIA FLORAL, 2001).

Existem algumas sinonímias desta espécie como: *Achillea millefolium* subsp. *lanulosa* (Nutt.) Piper, *Achillea millefolium* var. *alpicola* (Rydb.) Garrett, *Achillea millefolium* var. *arenicola* (A. Heller) Nobs, *Achillea millefolium* var. *californica* (Pollard) Jeps., *Achillea millefolium* var. *gigantea* (Pollard) Nobs, *Achillea millefolium* var. *lanulosa* (Nutt.) Piper, *Achillea millefolium* var. *litoralis* Ehrend. ex Nobs, *Achillea millefolium* var. *pacifica* (Rydb.) G.N. Jones, *Achillea millefolium* var. *puberula* (Rydb.) Nobs (W3TROPICOS Database, Missouri Botanical Garden, *on line*, 2004).

1.2.4. Etnomedicina

O uso medicinal da *A. millefolium* é relatado no manual de medicina encontrado na Mesopotâmia (~2200 a.C.) (THORWALD, 1990). CHANDLER (1989) cita o seu emprego pelo herói da mitologia grega Aquiles para estancar a hemorragia dos ferimentos dos soldados na Guerra de Tróia (~1200 a.C.).

Com os mesmos fins, a planta já foi usada durante a guerra civil americana (CHANDLER, 1989; ALONSO, 1998), onde o emprego das folhas e flores secas era preconizado oficialmente como tônico, estimulante e emenagogo

segundo a farmacopéia dos Estados Unidos (1836-1882) (CHANDLER, 1989). Várias comunidades aborígenes norte-americanas (Mohegan, Cherokee, Gosiute e Iroquois) a empregavam para tratar quadros gastrointestinais, enquanto outras comunidades (Micmac, Algonquin e Quebec) utilizavam o chá para o tratamento de resfriados, febre e quadros respiratórios e a aplicação local da planta para a cura de feridas e inflamações (TANTAQUIDGEON, 1974; HAMEL & CHILTOSKEY, 1975; HERRICK, 1977; CHANDLER *et al.*, 1982; BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

Na Alemanha, a *A. millefolium* compõe vários medicamentos para o tratamento de dispepsias e sintomas gastrointestinais, sendo indicada como colerética, antiespasmódica, adstringente e bactericida pela Comissão E alemã (BLUMENTHAL *et al.*, 2000). O *British Herbal Compendium* também ressalta ações espasmolíticas, emenagoga e colerética da planta (BRADLEY, 1992).

Outros usos populares da *A. millefolium* citados por vários autores são: antiséptica, anestésica, diurética, carminativa, reguladora menstrual, para dor de dente, reumatismo, cálculos renais, gastrite, úlcera gástrica, dispepsia nervosa e diarreia (NEGRI, 1979; PIO CORREIA, 1979; OKA, 1998; TORRES & CHÁVEZ, 2001; CANDAN *et al.*, 2003).

Além dos usos medicinais, a *A. millefolium* também é empregada para realçar o sabor de cervejas, vinhos e outras bebidas. Tanto as folhas como as flores são utilizadas como tempero; com as folhas também são feitas saladas (TORRES & CHÁVEZ, 2001).

1.2.5. Composição química

As investigações sobre o conteúdo químico da planta têm sido numerosas, estendendo-se por mais de 200 anos e foi com a destilação de um óleo volátil azul em 1719 por Hoffman, que teve início as análises químicas da *A. millefolium* (FALK *et al.*, 1975; CHANDLER, 1989).

O óleo volátil da *A. millefolium* é composto majoritariamente pelo óleo essencial (monoterpenos) (30-80%), sesquiterpenos (8-62%) e em menor quantidade por outros compostos (1-3%), como álcoois, ésteres, aldeídos e nor-

carotenóides (HOFMANN *et al.*, 1992). Os principais constituintes do óleo essencial da *A. millefolium* são: sabineno, β -pineno, eucaliptol, cânfora, borneol, 1,8-cineol, α -terpineol, óxido de bisabolol, azuleno, cariofileno, linalool, eugenol, entre outros (HAGGAC *et al.*, 1975; HOFMANN *et al.*, 1992; KOKKALOU *et al.*, 1992; CANDAN *et al.*, 2003). LOURENÇO *et al.* (1999) determinou um rendimento de 0,05-10% de óleo nas raízes, apesar de não serem consideradas fontes de óleo essencial. Os sesquiterpenos do tipo hidrocarbonetos são os mais abundantes (até 64%), com pequenas quantidades de outros tipos de sesquiterpenos (HOFMANN *et al.*, 1992). As lactonas sesquiterpênicas da *A. millefolium* são do tipo proazulenos e não azulenogênicas. As lactonas sesquiterpênicas têm sido pesquisadas ativamente porque são estruturas novas que podem possibilitar a identificação de cada subespécie e são precursoras do azuleno (CHANDLER, 1989; KUBELKA *et al.*, 1999). O primeiro e principal proazuleno natural do gênero *Achillea* a ser isolado e elucidado foi a aquilicina e foi identificada como 8-acetoxiartabsina (CUONG *et al.*, 1979). Alguns exemplos de proazulenos isolados da planta são: 8 α -angeloxi-artabsina, 8 α -tigloxi-artabsina, 7,8-guaianolides, 8-desacetil-4-epi-matricina, 8-desacetil-8-tiogloil-4-epi-matricina, 8-desacetil-8-tigloil-matricina, entre outros; e de sesquiterpenos não azulenogênicos são: arglanina, matricarina, tauremisina, santamarina, 8 α -angeloxiartabsina-1,4-endoperóxido, 8 α -tigloxiartabsina-1,4-endoperóxido, derivado de germacrane, entre outros (GLASL *et al.*, 1999; KUBELKA *et al.*, 1999; GLASL *et al.*, 2002). Além disso, outros três sesquiterpenos foram isolados na forma de metil ésters da *A. millefolium* e foram identificados como ácidos aquimílicos A, B e C (TOZYO *et al.* 1994).

A cor azul do óleo é devido à presença de azuleno e compostos relacionados, como o camazuleno e muitos estudos se focam sobre os azulenos e proazulenos (lactonas sesquiterpênicas) da *A. millefolium*. A maior quantidade de proazuleno tem sido encontrada nas inflorescências no início da floração. As folhas produzem uma grande quantidade de proazuleno no mesmo estágio, mas é mais baixa do que nas flores (CHANDLER, 1989; MOCKUTE & JUDZENTIENE, 2003). Além da parte da planta usada, outros fatores influenciam na concentração e composição do óleo essencial e dos proazulenos, como a estação e o estágio

de desenvolvimento em que foi coletada, as condições ambientais e o período de estocagem e o subtipo da planta (VERZÁR-PETRI & CUONG, 1977; CHANDLER, 1989). São conhecidos ao menos cinco ou seis subespécies com formas diplóide ($2n=18$) a octaplóide ($2n=72$). A tetraplóide ($2n=36$) é considerada como produtora de procamazuleno e a hexa e a octaplóide, como livres de procamazuleno (VERZÁR-PETRI & CUONG, 1977; HOFMANN *et al.* 1992).

Outra classe de componentes que recebeu considerável atenção foram os flavonóides, que são compostos polifenólicos e são classificados em flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides (FALK *et al.*, 1975; GUÉDON *et al.*, 1993; GUARDIA *et al.*, 2001). Os primeiros flavonóides da *A. millefolium*, encontrados por Horhammer em 1961, foram a apigenina 7-O-glucosídeo (cosmosiina) e a luteolina 7-O-glucosídeo (cinarosídeo) (FALK *et al.*, 1975; GUÉDON *et al.*, 1993). FALK *et al.* (1975), descobriram mais três flavonóides da classe das flavonas, o 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona, a artemetina e a casticina. Outros flavonóides citados como presentes na *A. millefolium* são: isorhamnetina, rutina, quercetina, centaureidina, pectolinarigenina, 3-metilbetuletol (VALANT-VETSCHERA & WOLLENWEBER, 1988; GUÉDON *et al.*, 1993).

Vários compostos básicos foram isolados da *A. millefolium*. Zanon (1846), foi o primeiro a isolar um alcalóide, a aquileína (CHANDLER, 1989) e BLUMENTHAL *et al.* (2000), ainda cita a aqueceína.

CHANDLER *et al.* (1982), relataram a presença de esteróis, triterpenos e saponinas na *A. millefolium*. Entre os esteróis estão o β -sitosterol (o principal), estigmasterol, campesterol e colesterol; e entre os triterpenos, a α -amirina (a principal), β -amirina, taraxasterol e pseudotaraxasterol.

Outros componentes também foram isolados como alcaloides (prolina, estaquidrina, betonicina, betaina, colina) (MEHLFÜHRER *et al.*, 1997), aminoácidos (alanina, histidina, leucina, lisina), ácidos graxos (ácidos linoléico, palmítico, oléico), ácidos fenólicos (ácidos caféico, salicílico), açúcares (dextrose, glucose, manitol, sucrose) e cumarinas (BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

1.2.6. Toxicidade

A *A. millefolium* é considerada uma planta de baixa toxicidade, ainda que já existam relatos de respostas alérgicas em alguns usuários da planta. As lactonas sesquiterpênicas foram até hoje os únicos compostos da *A. millefolium* reportados com capacidade de induzir reações alérgicas de contato (CHANDLER, 1989; BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

ALONSO (1998) e CÁCERES (1999), relataram que tanto o uso prolongado quanto doses elevadas da planta foram relacionados a queixas de tontura e cefaléia.

As alcanidas, betonicina e estaquidrina, produziram uma ação uterotônica em ratas prenhas, indicando que o uso da planta não é recomendável durante a gestação (ALONSO, 1998; BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

Na continuação dos estudos realizados no Departamento de Farmacologia da UFPR, foi determinada a dose letal 50 (DL₅₀) do extrato aquoso das folhas em ratos e camundongos. Em camundongos, a DL₅₀ foi de 6,5 g/kg (vo) e de 2,25 g/kg, por via intraperitoneal (ip) e verificou-se que a *A. millefolium* induzia dificuldade respiratória e de coordenação motora e convulsões (SANSANA, 1999). Em ratos, a DL₅₀ foi superior a 10 g/kg - vo e superior a 3 g/kg - ip (CAVALCANTI, 2002). Estudos realizados por CAVALCANTI (2002), ratos tratados com o extrato aquoso das folhas de *A. millefolium* em caráter agudo, subcrônico e crônico, não promoveram comprometimento hematológico e nem das funções hepática, renal ou pancreática nesses animais, não indicando toxicidade em doses até 1200 mg/kg - vo em nenhum dos tratamentos (14, 28 e 90 dias). Também não houve alteração do aparelho reprodutor masculino após tratamento crônico (90 dias).

1.2.7. Atividades biológicas

As investigações sobre as ações da *A. millefolium* teve início através do interesse pelas atividades biológicas/farmacológicas atribuídas ao óleo essencial. Pesquisas demonstraram que o óleo apresenta ação fungistática principalmente

contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* e ação antibacteriana (*Staphylococcus aureus*) (KEDZIA *et al.*, 1990; POPOVICI *et al.*, 1990). CANDAN *et al.* (2003), também demonstrou a atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter lwoffii* e *Candida krusei*, e atividade antioxidante. DELLA LOGGIA *et al.* (1992), demonstraram a atividade antiinflamatória da fração clorofórmica (rica em proazuleno), inibindo o edema induzido por óleo de *Cróton*. Os ácidos aquimílicos A, B e C do extrato metanólico das flores da *A. millefolium* exibiram atividade antitumoral (TOZYO *et al.*, 1994).

Os flavonóides encontrados nas folhas e flores, a apigenina 7-O-glucosídeo e a luteolina 7-O-glucosídeo, foram relacionados à atividade espasmolítica (FALK *et al.*, 1975). GUARDIA *et al.* (2001), determinaram a atividade antiinflamatória da quercetina e da rutina num modelo experimental de artrite. Foi demonstrado também o efeito protetor gástrico da rutina (200 mg/kg) contra lesões induzidas por etanol 50% (LA CASA *et al.*, 2000).

A ação hemostática da *A. millefolium* é atribuída ao alcalóide aquileína que reduziu o tempo de coagulação do sangue em coelhos por 45 minutos (MILLER & CHOW, 1954).

GADGOLI & MISHRA (1995), demonstraram a atividade antihepatotóxica do extrato aquoso e frações clorofórmica, metanólica e aquosa da *A. millefolium* no modelo de lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono e por paracetamol.

Estudos realizados no nosso Laboratório do Departamento de Farmacologia da UFPR, utilizando uma espécie silvestre, permitiu determinar atividade antiulcerogênica em modelos experimentais de indução de lesões gástricas agudas por inibição da síntese de prostaglandinas (indometacina) e por agente necrotizante (etanol) (SANSANA, 1999; NHADUCUE, 2000). Neste último modelo, verificamos que o extrato aquoso das folhas da *A. millefolium* manteve os níveis de muco e de grupos sulfidrílicos não protéicos (glutathiona) na mucosa gástrica dos animais, indicando ativação de fatores citoprotetores da mucosa gástrica (NHADUCUE, 2000). O extrato também mostrou atividade antissecretora de ácido e pepsina no modelo de ligadura pilórica (4 h). Estudos complementares

evidenciaram que o extrato promoveu aumento da velocidade do trânsito intestinal em camundongos quando utilizado em altas doses (NHADUCUE, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Validar os efeitos farmacológicos do extrato aquoso das folhas de *Achillea millefolium* L. (EABA) no trato gastrointestinal como gastroprotetor, com uma espécie cultivada, coletada e armazenada com controle de qualidade.

2.2. Objetivos específicos

Caracterizar os mecanismos envolvidos nesta ação:

- a. Participação da atividade antissecretora ácida;
- b. Participação da motilidade gastrointestinal;
- c. Participação da atividade antioxidante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material Botânico

3.1.1.1. Origem

A *A. millefolium* foi fornecida pela Fazenda Solidariedade, da Fundação de Ação Social (FAS). A área para cultivo e as plantas matrizes foram selecionadas pela farmacêutica industrial Jorgeth A. G. Xavier. As partes aéreas isentas de inflorescências, coletadas a partir de dezembro de 2000 logo após a coleta das flores, foram secas em estufa e submetidas à catação do material e envase em sacos plásticos e de papel. Os sacos, devidamente identificados, foram armazenados em galpão apropriado, no laboratório da própria fazenda e posteriormente enviados ao nosso laboratório.

A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Olavo Guimarães e um exemplar está depositado no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR, sob registro UPCB n° 45106.

3.1.1.2. Preparação do extrato

O extrato bruto aquoso das folhas foi obtido por extração a quente (70 °C) durante 30 minutos a 10% (100 g da planta/1 L de água). Após 3 extrações sucessivas, foi calculado o rendimento (28,6%). O extrato foi concentrado em rotaevaporador (60°C), determinada sua concentração através do peso seco, acondicionado em alíquotas de cerca de 5 ml em frascos âmbar e armazenado em *freezer* (- 20 °C) até o momento do uso.

3.1.1.3. Determinação do peso seco

Foram pesados e marcados 6 béqueres de 1 ml. Em cada béquer foi colocado 0,2 ml do extrato aquoso da *A. millefolium*. Os béqueres foram pesados e levados para evaporação, pesados em intervalos de tempo até não existir mais

variação entre a última e a penúltima pesagem, sendo assim determinada a quantidade de resíduo seco em cada amostra e calculada a concentração de resíduo por mililitro do extrato bruto.

3.1.2. Animais

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*), variedade Wistar albino, fêmeas adultas pesando de 180 a 250 g, e camundongos (*Mus musculus*), variedade Swiss, fêmeas adultas pesando de 25 a 30 g, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Foi utilizado o estômago de um cachorro (*Cannis familiaris*) sem raça definida, fêmea adulta pesando de 6-8 kg, fornecido pelo Canil Municipal e mantido no Biotério do Setor de Ciências Biológicas.

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação, tendo livre acesso a água e ração.

3.1.3. Drogas e Reagentes

As drogas e os reagentes utilizados foram: reagente de Bradford (BioRad, New York, EUA), éter etílico P.A. (Biotec, São José dos Pinhais, Brasil), cloreto de potássio (Carlo Erba, Rodano, Itália), álcool metílico (Ecibra, Santo Amaro, Brasil), fenolftaleína (FarmanilQuima, Curitiba, Brasil), acetato de sódio cristalizado, ácido clorídrico fumegante, ácido sulfúrico bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, fosfato de potássio secundário trihidratado (Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), óleo de rícino (Multilab, São Jerônimo, Brasil), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), água oxigenada 10 vol., álcool iodado 1% (Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), adenosina 5-trifosfato (ATP), albumina bovina, alcian blue, atropina, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) forma reduzida, betanecol, citocromo C, 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB), *cocktail* de inibidores de protease (AEBSF 104 mM, aprotinina 0,08 mM, leupeptina 2 mM, bestatina 4 mM, pepstatina A 1,5 mM e E-64 1,4 mM), ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB), fosfato de potássio, glutatona forma reduzida, histamina, indometacina, loperamida, menadiona, molibdato de amônio, neostigmina, omeprazol, ouabaína,

pentagastrina, peróxido de hidrogênio, trizma base, trizma sal (Sigma, Saint Louis, EUA), ácido acético glacial, ácido L-ascórbico, carbonato de sódio anidro, sacarose (Synth, Diadema, Brasil), cloridrato de ranitidina (União Química, Embu-Guaçu, Brasil), ácido tricloroacético P.A., álcool etílico P.A. 95%, cloreto de magnésio hexahidratado; hidróxido de sódio, triton X-100, vermelho de fenol (Vetec, Duque de Caxias, Brasil).

A quercetina, a rutina e o óleo volátil foram isolados pelo Laboratório de Fitoquímica, Setor de Ciências da Saúde da UFPR.

3.1.4. Materiais laboratoriais e equipamentos

Os materiais laboratoriais utilizados foram: agulhas, algodão, béqueres, câmara para anestesia, cânulas de gavagem, estantes, gaiola metabólica, gaze, luvas e materiais cirúrgicos, placas de petri, ponteiras, provetas, seringas, tubos de ensaio.

Os equipamentos utilizados foram: agitador de tubos (AP56 Phoenix, Araraquara, Brasil), agitador magnético (Fisatom, São Paulo, Brasil), balanças analíticas (AL500 Marte, São Paulo, Brasil; AS200 Ohaus, New Jersey, EUA; AC210S Sartorius, Goettingen, Alemanha), balança eletrônica para animais (FX-6000 A&D, Milpitas, EUA), banho-maria com agitação interna (Thermomix B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemanha), centrífugas refrigeradas (Christ, Alemanha; 2K15 Sigma, EUA), concentrador rotatório (Centrivap 78100-00 Labconco, Kansas, EUA), dispensador (Boeco, Hamburg, Alemanha), espectrofotômetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra), estereoscópio (SZ40 Olympus, Tóquio, Japão), homogeneizador (MA 102 Marconi, Piracicaba, Brasil), leitor de placas (Tecsán), pHmetro digital (PG2000 Gehaka, São Paulo, Brasil), pipetas automáticas (Eppendorf, Hamburg, Alemanha; Labmate, Warsaw, Polônia), rotaevaporador (SK5684 Eberle, Caxias do Sul, Brasil), titulador automático (Hirschmann Laborgate, Alemanha), ultra-som (Unique, Santo Amaro, Brasil).

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Avaliação da atividade antiulcerogênica

3.2.1.1. Lesões gástricas induzidas por estresse (SENAY & LEVINE, 1967)

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água contendo 5% de glicose. Grupos de 6 animais foram tratados oralmente com o veículo (água - 0,1 ml/100 g), a ranitidina (60 mg/kg) e o extrato (125, 1500 e 2000 mg/kg). Uma hora após desses tratamentos, os animais foram levemente sedados com éter para serem imobilizados em contêntores apropriados. Foram colocados em câmara fria a 4 °C durante três horas e após este período, os animais foram mortos através de deslocamento cervical, os estômagos removidos, distendidos e fixados com alfinetes para a análise das lesões gástricas conforme descrito no item 3.2.1.4.

3.2.1.2. Lesões gástricas induzidas por indometacina (DJAHANGUIRI, 1969)

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água contendo 5% de glicose. As lesões gástricas foram induzidas com injeção subcutânea de indometacina (20 mg/kg). Uma hora antes da indução, grupos de 6 animais foram tratados pela via oral com o veículo (água - 0,1 ml/100 g), a ranitidina (60 mg/kg) e o extrato (125, 1500 e 2000 mg/kg). Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram mortos através de deslocamento cervical e os estômagos processados como descrito nos itens 3.2.1.1. e 3.2.1.4.

3.2.1.3. Lesões gástricas induzidas por etanol (ROBERT *et al.*, 1979)

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água contendo 5% de glicose. Grupos de 6 animais foram tratados oralmente com o veículo (água - 0,1 ml/100 g), a ranitidina (60 mg/kg) e o extrato (125, 1500 e

2000 mg/kg) ou substâncias de teste (Rutina - 50, 100 e 200 mg/kg; Quercetina - 50, 100 e 200 mg/kg; Óleo volátil - 5, 10 e 50 mg/kg). Sessenta minutos após estes tratamentos, foi administrado etanol (70%, 0,5 ml/200 g - vo). Uma hora após a administração do agente necrotizante, os animais foram mortos através de deslocamento cervical e os estômagos processados como descrito nos itens 3.2.1.1. e 3.2.1.4.

3.2.1.4. Avaliação das lesões gástricas nos modelos agudos

Determinação do índice de lesões

O índice de lesões foi calculado pela soma do total de pontos obtidos na observação da mucosa, considerando os seguintes parâmetros: descoloração da mucosa ou hiperemia, perda de pregas, presença de petéquias, presença de edema, hemorragias e perda do muco. As pontuações também foram dadas segundo o grau de lesão produzido: leve (1 ponto), moderado (2 pontos) ou intenso (3 pontos) (Tabela 1).

Determinação do índice de úlceras

O índice de úlceras foi determinado pela contagem direta das lesões menores ou iguais a 1 mm (1 ponto). Quando maiores, o comprimento de cada lesão na mucosa glandular foi medido e quantificado atribuindo-se 1,5 pontos para cada mm. No caso de úlceras perfuradas, estas também foram medidas e cada mm de lesão foi multiplicado por 5 pontos (5 pontos/mm).

O índice total é a soma dos índices de lesões e de úlceras.

3.2.2. Quantificação do muco gástrico (CORNE *et al.*, 1974)

Após a avaliação das lesões induzidas por etanol 70 %, o fundo e o antro do estômago foram retirados e a parte glandular foi dividida em duas. Uma parte da mucosa gástrica (exatamente pesada) foi incubada em 10 ml de solução de Alcian Blue 0,1%, onde permaneceu corando por 2 horas. O excesso de Alcian Blue foi removido com sacarose 0,25 mol/l (duas lavadas sucessivamente, a

Tabela 1: Tabela de quantificação para lesões agudas (MESIA, 1998 modificada).

Características da mucosa	Pontuação
Índice de Lesões:	
Mucosa descorada	1
Mucosa hiperêmica	1
Perda de pregas	1
Petéquias – Leve	1
Petéquias – Moderada	2
Petéquias – Intensa	3
Edema – Leve	1
Edema – Moderado	2
Edema – Intenso	3
Hemorragia – Leve	1
Hemorragia – Moderada	2
Hemorragia – Intensa	3
Perda de muco – Leve	1
Perda de muco – Moderado	2
Perda de muco – Intenso	3
Índice de úlceras:	
Úlceras até 1 mm	1
Úlceras > 1 mm	1,5 pontos x mm
Úlceras perfuradas	5 pontos x mm

primeira por 15 minutos e a segunda durante 45 minutos). O corante complexado com o muco da parede glandular foi extraído com 5 ml de cloreto de magnésio (0,5 mol/l), agitando-se intermitentemente, cada segmento, por 1 minuto a cada

30 minutos durante 2 horas. Foi misturado 3 ml da solução sobrenadante azul obtida com 3 ml de éter etílico e agitou-se vigorosamente até a formação de uma emulsão. Centrifugou-se a 3600 rpm x 10 minutos para separar a fase aquosa, descartando o resíduo. A concentração de Alcian Blue nas amostras, foi determinada por leitura espectrofotométrica a 598 nm.

A concentração de Alcian Blue ligado ao muco foi determinada por interpolação na curva padrão do corante e expressa em μg de Alcian Blue/ml/g de tecido.

3.2.3. Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos (SEDLAK & LINDSAY, 1988)

A outra parte glandular do estômago foi homogeneizada em 5 ml de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,02 mol/l gelado. Alíquotas de 4 ml do homogenato foram misturadas com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético (ATC) 50%. Os tubos foram agitados intermitentemente por 10-15 minutos e centrifugados a aproximadamente 3000 rpm x 15 minutos. Alíquotas de 2 ml do sobrenadante foram misturadas com 4 ml de tampão TRIS 0,4 mol/l com pH 8,9 e 0,1 ml de 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) 0,01 mol/l e agitou-se para homogeneizar. As absorbâncias foram lidas no espectrofotômetro a 412 nm, dentro de 5 minutos após a adição do DTNB.

A concentração de GSH da mucosa gástrica foi determinada por interpolação na curva padrão de glutathiona e expressa em μg de GSH/ml/g de tecido.

3.2.4. Avaliação da atividade antissecretora ácida

3.2.4.1. Ligadura de Píloro (SHAY *et al.*, 1945)

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água contendo 5% de glicose. Ratas foram anestesiadas com éter e colocadas em decúbito dorsal em uma placa de isopor. Através de uma incisão de cerca de

2 cm no abdômen, foi localizado o estômago e procedido a ligadura do piloro com linha. Por via intraduodenal, os animais receberam o veículo (água - 0,1 ml/100 g), a ranitidina (60 mg/kg) e o extrato (125, 1500 e 2000 mg/kg) ou substâncias de teste (Rutina - 50, 100 e 200 mg/kg; Quercetina - 50, 100 e 200 mg/kg; Óleo volátil - 5, 10 e 50 mg/kg). A seguir, foi suturada a parede abdominal. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos com anestesia etérea profunda e seus estômagos removidos após pinçamento do esôfago para evitar perda do material secretado. O órgão foi lavado com água, secado em gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 ml de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaios para a centrifugação (1500 rpm durante 30 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico foi quantificado em proveta, o conteúdo completado com água destilada para um volume final de 15 ml e colocado em béqueres. A acidez livre (pH) foi determinada no pHmetro. A acidez total (mEq[H⁺]/ml/4 h) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

A secreção gástrica foi estimulada com a administração subcutânea de betanecol (2,5 mg/kg), um agonista de receptores muscarínicos; histamina (10 mg/kg), um agonista dos receptores histaminérgicos; e pentagastrina (400 µg/kg), um agonista do receptor CCKB.

3.2.4.2. Avaliação da Atividade da H⁺/K⁺-ATPase

Isolamento dos microsomas gástricos: Os microsomas gástricos contendo H⁺/K⁺-ATPase foram isolados da mucosa gástrica de cachorro por centrifugação diferencial. O animal foi anestesiado com tiopental e morto com injeção intravenosa de uma solução saturada de cloreto de potássio. O estômago foi removido para o gelo, aberto pela curvatura maior, lavado e descartadas as regiões antral e do fundo. A mucosa do corpo gástrico foi então rapidamente raspada e separada das camadas muscular e submucosa. Os raspados gástricos foram picados em pedaços menores e transferidos para o tampão de homogeneização Tris.HCl 50 mM (pH 7,4) contendo sacarose 250 mM, MgCl₂ 10

mM, KCl 5 mM, EDTA 1 mM e coquetel de inibidores de protease 0,01% e homogeneizados (5 volumes/g de tecido) em tubo de vidro com pistão de teflon. O homogenato foi centrifugado a 20 000 x g durante 20 minutos, o precipitado descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a 100 000 x g durante 1 hora. O precipitado contendo vesículas da membrana apical continha a H⁺/K⁺-ATPase não purificada (KUBO *et al.*, 1995).

Purificação da H⁺/K⁺-ATPase: Foi realizada por centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose. O precipitado obtido da centrifugação de 100 000 x g contendo as vesículas com H⁺/K⁺-ATPase foi ressuspensão em 3 ml de sacarose 250 mM, cuidadosamente transferido para um tubo com sacarose 30% e centrifugado novamente a 100 000 x g por 1 hora. Duas bandas pequenas e um precipitado foram obtidos. As membranas sedimentadas na superfície da solução de sacarose 30% foram coletadas e lavadas para eliminação do excesso de sacarose obtendo-se, assim, os microsossomos purificados contendo a enzima H⁺/K⁺-ATPase gástrica. Todos os procedimentos foram realizados a 4 °C (KUBO *et al.*, 1995). O material enzimático foi, então, congelado e guardado a -70 °C até serem utilizados.

O conteúdo de proteína foi determinado em placa de 96 poços com o reagente de Bradford, utilizando-se a albumina como padrão.

Caracterização da H⁺/K⁺-ATPase: Foram realizados a) curvas tempo-atividade com 0,1 até 20 µg de proteína enzimática e 1 mM de ATP, b) determinação da velocidade de reação enzimática frente a concentrações de 0,1 a 1 mM de ATP na presença de cloreto de magnésio 2,5 mM e cloreto de potássio 20 mM, c) o bloqueio específico da bomba de prótons pelo inibidor omeprazol (0,05 a 1 mM), d) descarte da presença de Na⁺/K⁺-ATPase como impureza utilizando-se o inibidor específico ouabaína (0,05 a 1 mM).

Ensaio de atividade enzimática: A atividade ATPásica foi determinada mediante quantificação do fósforo inorgânico (Pi) liberado da hidrólise de ATP exógeno, na presença de K⁺, pela enzima. A reação foi iniciada pela adição de 500 µg de

proteína enzimática a 500 µl de tampão Tris.HCl (pH 7,4) contendo cloreto de magnésio 2,5 mM, cloreto de potássio 20 mM e ATP 1 mM, na ausência e na presença das drogas a serem testadas. A reação foi terminada após 20 minutos de incubação a 37 °C pela adição de 50 µl de ATC 50% e esfriamento rápido em banho de gelo (MURAKAMI *et al.*, 1992). As amostras foram ensaiadas para a determinação de fosfato inorgânico produzido.

Determinação do fosfato inorgânico: Às amostras foram adicionados 1,5 ml da solução reagente contendo molibdato de amônio (4,7 ml de água + 0,7 ml de ácido sulfúrico 10 N + 0,6 ml de molibdato de amônio 2,4% + 3 ml de ácido ascórbico 10%). As amostras foram incubadas por 20 minutos em banho-maria a 37 °C e a cor obtida, quantificada por espectrofotometria a 820 nm. O reagente foi preparado no momento do uso (FISKE & SUBBAROW, 1925; TERSARIOL, 1989). A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção do Pi ($\epsilon = 11\ 000/M/cm$).

3.2.5. Avaliação da atividade sobre a motilidade gastrointestinal

3.2.5.1. Esvaziamento gástrico (SCARPIGNATO *et al.*, 1980)

Os animais permaneceram em jejum de sólidos por 6 horas, com fornecimento livre de água glicosada 5%. Grupos de 6 animais foram tratados oralmente com o veículo (água, 0,1 ml/100 g), a atropina (3,0 mg/kg) e o extrato (125, 1500 e 2000 mg/kg). Três horas após os tratamentos, os animais receberam 1,5 ml da solução de vermelho de fenol (0,5 mg/ml) disperso em água. Transcorridos 20 minutos, os animais foram mortos por anestesia, a cavidade abdominal exposta, retirado e lavado o estômago, que foi aberto ao longo da curvatura menor para a coleta do conteúdo gástrico em uma placa de petri. A superfície interna do estômago foi lavada com 7 ml de água destilada e o conteúdo coletado centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. Foi adicionado 1 ml de NaOH 1 N a 1 ml do sobrenadante e a solução obtida lida em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram interpolados em uma curva

padrão de vermelho de fenol para calcular a concentração de corante retido no estômago.

3.2.5.2. Trânsito intestinal (STICKNEY & NORTHUP, 1959)

Os animais permaneceram em jejum de sólidos por 6 horas, com fornecimento livre de água glicosada 5%. Grupos de 6 animais foram tratados com o veículo (água, 0,1 ml/10 g - vo), a neostigmina (20 µg/kg - sc) e o extrato (100, 1000 e 2000 mg/kg - vo). Decorridos 30 minutos dos tratamentos, foi administrado o carvão ativado 5% (0,1 ml/10 g - vo). Após 30 minutos, os animais foram mortos por deslocamento cervical, o estômago e o intestino delgado removidos. Com auxílio de uma régua, o comprimento total do intestino delgado (piloro à válvula íleo-cecal) e a distância percorrida pelo carvão ativado (última porção que contenha pelo menos 1 cm contínuo do marcador) foram medidos. Foi calculada a porcentagem do percurso do carvão em função do comprimento total do intestino.

3.2.5.3. Diarréia induzida pelo óleo de rícino (AWOUTERS *et al.*, 1978 modificado)

Os animais permaneceram em jejum de sólidos por 6 horas, com fornecimento livre de água glicosada 5%. Grupos de 6 animais foram tratados oralmente com o veículo (água, 0,1 ml/10 g), loperamida (5 mg/kg) e o extrato (100, 500 e 1000 mg/kg). Após uma hora, foi administrado o óleo de rícino (0,3 ml/animal) pela via oral e os animais foram colocados separadamente em caixas forradas com papel. Foi observada a severidade da diarréia durante uma hora e meia, analisando os seguintes parâmetros: tempo de indução da diarréia e o número de episódios líquidos.

Na padronização do método, foram testados diferentes doses do óleo (0,1; 0,3; 0,5 e 0,8 ml/animal) e a observação dos parâmetros: tempo de defecação do primeiro sólido, número de episódios sólidos, tempo de indução da diarréia e o número de episódios líquidos durante quatro horas.

3.2.6. Atividade das enzimas antioxidantes gástricas

Após o tratamento subcrônico (7 dias) dos animais com o extrato, os animais foram mortos através de deslocamento cervical e os seguintes órgãos retirados e pesados: fígado, estômago, pâncreas, rins, adrenais, timo e útero (sem ovários). Foi calculado o peso relativo de cada órgão.

3.2.6.1. Preparação das frações subcelulares de estômago

O estômago foi aberto pela curvatura menor sob gelo e lavado com salina gelada. As regiões do estômago glandular (corpo) e não-glandular (fundo) foram separadas e pesadas. Os tecidos foram homogeneizados em tampão pH 7,5 (Tris 50 mM, KCl 1,15%) e centrifugados a 9000 x *g* durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de uma gaze, para ser novamente centrifugado a 105 000 x *g* por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante (citosol) foi congelado e guardado a -70 °C antes de ser utilizado. O conteúdo de proteína citosólica foi determinado pelo reagente de Bradford utilizando-se albumina como padrão.

3.2.6.1.1. Determinação da atividade da enzima NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1)

A atividade da NQO1 foi medida segundo o método de JAISWAL *et al.* (1988) com pequenas modificações. A redução do citocromo C (50 μM) na presença de citosol de estômago (1 μg/ml de proteína), menadiona 10 μM e NADPH 1 mM foi monitorada no espectrofotômetro UV-VIS a 550 nm por 2 minutos. As reações foram realizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM em pH 7,7, contendo Triton X-100 0,04% a temperatura ambiente. A atividade específica da NQO1 foi determinada usando um coeficiente de extinção do citocromo C de 21/mM/cm.

3.2.6.1.2. Determinação da atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida segundo o método de HABIG *et al.* (1974). As reações foram realizadas na presença de 25 µg/ml de citosol de estômago, CDNB 1 mM, glutathiona reduzida 1 mM, em tampão fosfato de potássio 100 mM em pH 6,5, a 25 °C. A conjugação do CDNB com glutathiona foi monitorada a 340 nm no espectrofotômetro UV-VIS por 2 minutos. A atividade específica da GST foi calculada usando um coeficiente de extinção da glutathiona de 9,5/mM/cm.

3.2.6.1.3. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida segundo o método de AEBI (1984). As reações foram realizadas na presença de 25 µg/ml de proteína citosólica, peróxido de hidrogênio 5 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM em pH 7,0. A reação foi monitorada por 20 segundos a 240 nm no espectrofotômetro UV-VIS. A atividade específica da CAT foi calculada usando um coeficiente de extinção do peróxido de hidrogênio de 41/mM/cm.

3.2.7. Determinação da dose inibitória 50 (DI₅₀) e da concentração inibitória 50 (CI₅₀)

As DI₅₀ e as CI₅₀ foram calculadas plotando os dados obtidos na equação $V_i/V_o = 1/(1 - [I]/DI_{50})$ usando o Programa para Windows, *Kaleida Graph* (Synergy Software, PA, EUA), onde V_i representa a atividade inibitória e V_o representa a atividade total.

3.2.8. Expressão dos dados e análise estatística

Os dados são representados como as médias ± erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni. Quando apropriado foi utilizado o teste t de Student não pareado. As análises foram

realizadas usando o Programa para *Windows*, *GraphPad Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

4.1.1. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por estresse (imobilização a 4 °C) em ratas

O estresse por imobilização a 4 °C produziu um índice de lesões gástricas de $8,8 \pm 0,5$; um índice de úlceras de $24,0 \pm 5,5$ e um índice total de $32,8 \pm 5,2$ em ratas (Figura 4, Tabela 2 - Anexo).

O pré-tratamento dos animais com o EABA em todas as doses testadas (125, 1500 e 2000 mg/kg) pela via oral, 1 hora antes do estímulo estressante, reduziu somente o índice de lesões em 27, 37 e 40%, respectivamente (Figura 4 A, Tabela 2 - Anexo).

A ranitidina, controle positivo do teste, reduziu os índices de lesões, de úlceras e o total em 42, 78 e 68%, respectivamente (Figura 4, Tabela 2 - Anexo).

4.1.2. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por indometacina (20 mg/kg - sc) em ratas

A administração subcutânea de indometacina (20 mg/kg) produziu um índice de lesões gástricas de $7,8 \pm 0,4$; índice de úlceras de $105,7 \pm 9,1$ e índice total de $113,6 \pm 9,3$ (Figura 5, Tabela 3 - Anexo).

O pré-tratamento dos animais com as doses de 125 e 1500 mg/kg do EABA pela via oral, 1 hora antes da administração da indometacina, não alteraram nenhum dos índices determinados (Figura 5, Tabela 3 - Anexo). A dose de 2000 mg/kg do EABA reduziu a incidência de úlceras e o índice total em 52 e 49%, respectivamente (Figura 5 B e C, Tabela 3 - Anexo).

A ranitidina, controle positivo do teste, reduziu os índices de lesões, de úlceras e o total em 23, 96 e 92%, respectivamente quando comparado com o grupo controle (Figura 5, Tabela 3 - Anexo).

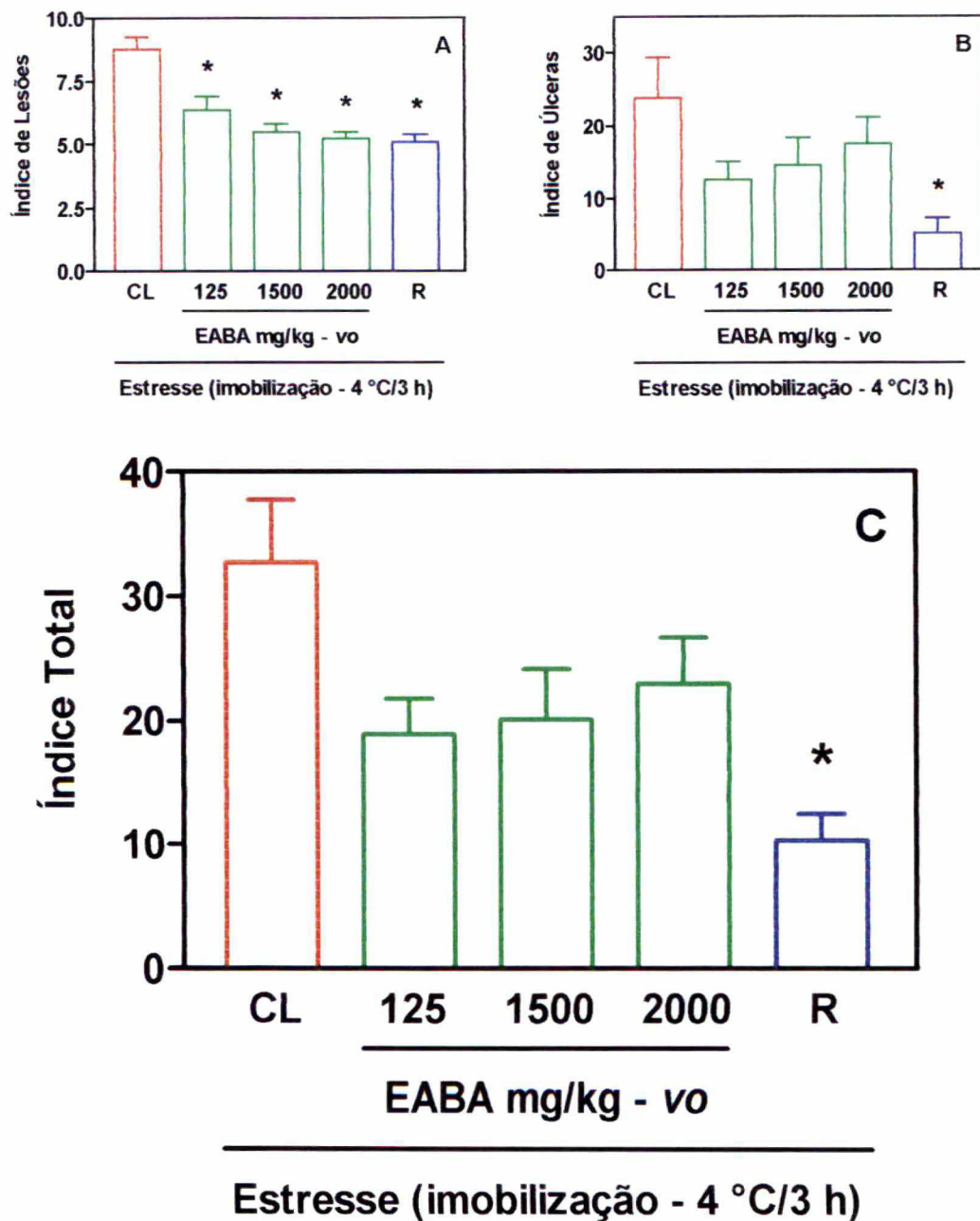


Figura 4: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - vo), do veículo (CL: água 0,1 ml/100 g - vo) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - vo) sobre o índice de lesões (A), o índice de úlceras (B) e o índice total (C) de lesões gástricas agudas induzidas por estresse (imobilização a 4 °C/3 h) em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado com $p < 0,05$.

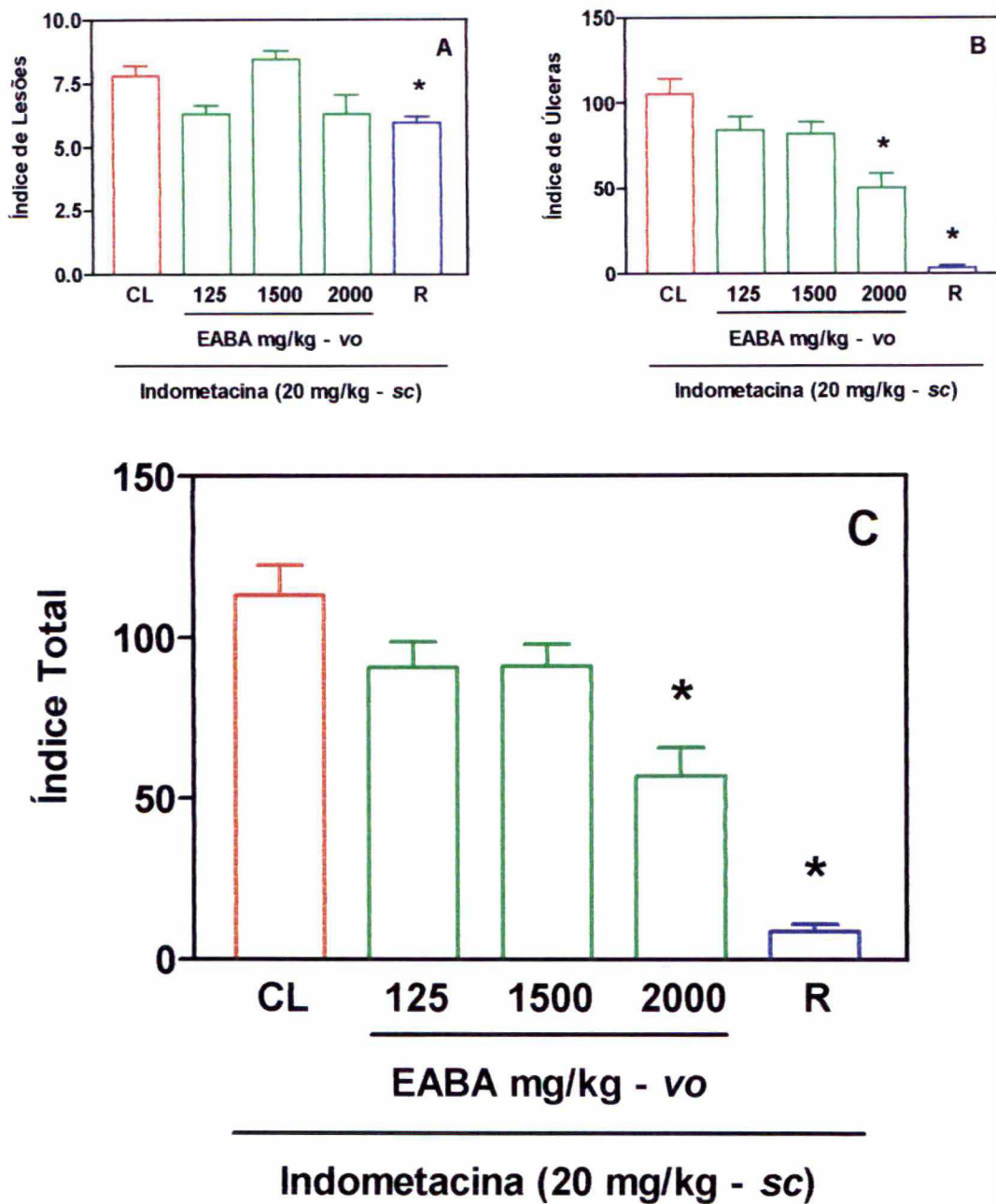


Figura 5: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - vo), do veículo (CL: água 0,1 ml/100 g - vo) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - vo) sobre o índice de lesões (A), o índice de úlceras (B) e o índice total (C) de lesões gástricas agudas induzidas por indometacina (20 mg/kg - sc) em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para $p < 0,05$.

4.1.3. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas

A administração oral de etanol 70% produziu lesões gástricas com um índice de lesões de $9,4 \pm 0,4$; um índice de úlceras de $103,2 \pm 6,8$ e um índice total de $112,6 \pm 7,0$ (Figura 6, Tabela 4 - Anexo).

O pré-tratamento dos animais com o EABA na dose de 2000 mg/kg, via oral, 1 hora antes da administração do etanol, reduziu o aparecimento de lesões na mucosa gástrica em 31%. A administração do EABA nas doses de 125, 1500 e 2000 mg/kg diminuíram o índice de úlceras em 32, 85 e 91%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle e o índice total em 31, 79 e 86% (Figura 6, Tabela 4 - Anexo). A DI_{50} calculada para a proteção gástrica pelo EABA, utilizando o índice total, foi de 936 mg/kg.

A ranitidina, controle positivo do teste, reduziu os índices de lesões, de úlceras e o total em 25, 60 e 57%, respectivamente (Figura 6, Tabela 4 - Anexo).

4.1.4. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a quantidade de muco gástrico e a concentração dos grupos sulfidrílicos não-protéicos após as lesões gástricas induzidas por etanol 70% em ratas

A lesão induzida pelo etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) não alterou a quantidade de muco da mucosa gástrica quando comparada com a mucosa não lesionada (NL: $93,4 \pm 6,1$ μ g de Alcian Blue/ml/g de tecido). O pré-tratamento dos animais com o EABA (2000 mg/kg - vo) aumentou a concentração de muco em 46% quando comparado com o grupo lesado (Figura 7 A, Tabela 5 - Anexo).

O etanol 70% reduziu a concentração de grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH) em 39% quando comparado com a mucosa gástrica não lesionada (NL: $92,1 \pm 3,4$ μ g de GSH/ml/g de tecido). O tratamento dos animais com o EABA, dose de 2000 mg/kg pela via oral, 1 hora antes da indução de lesões com etanol 70%, aumentou a concentração de GSH presente na mucosa gástrica glandular

em 71% (CL: $56,4 \pm 4,3$ μg de GSH/ml/g de tecido) (Figura 7 B, Tabela 5 - Anexo). Doses menores não alteraram os níveis de GSH em relação ao grupo controle.

A ranitidina, controle positivo do teste, não alterou a concentração de muco nem a de GSH (Figura 7, Tabela 5 - Anexo).

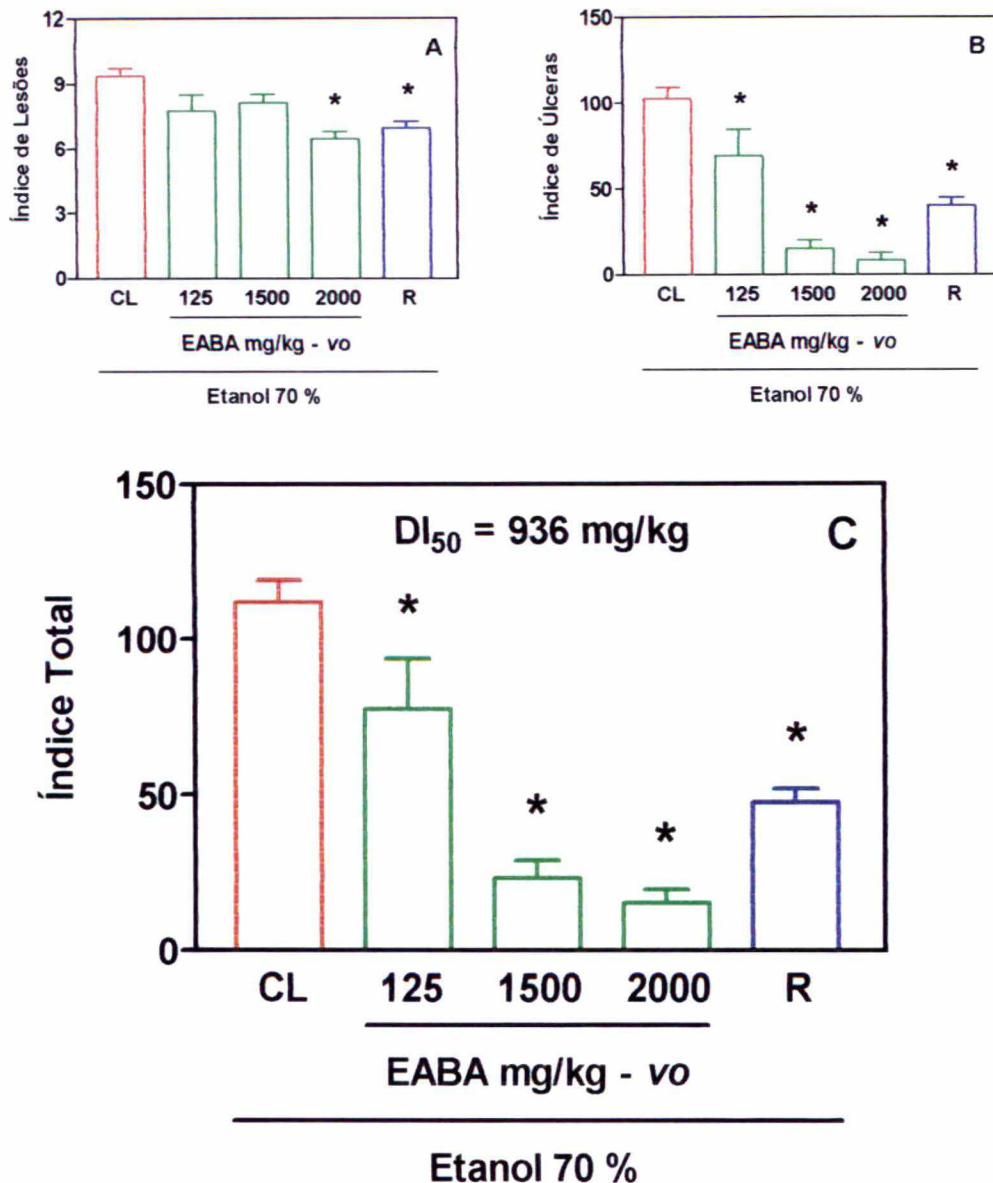


Figura 6: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - vo), do veículo (CL: água 0,1 ml/100 g - vo) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - vo) sobre o índice de lesões (A), o índice de úlceras (B) e o índice total (C) de lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

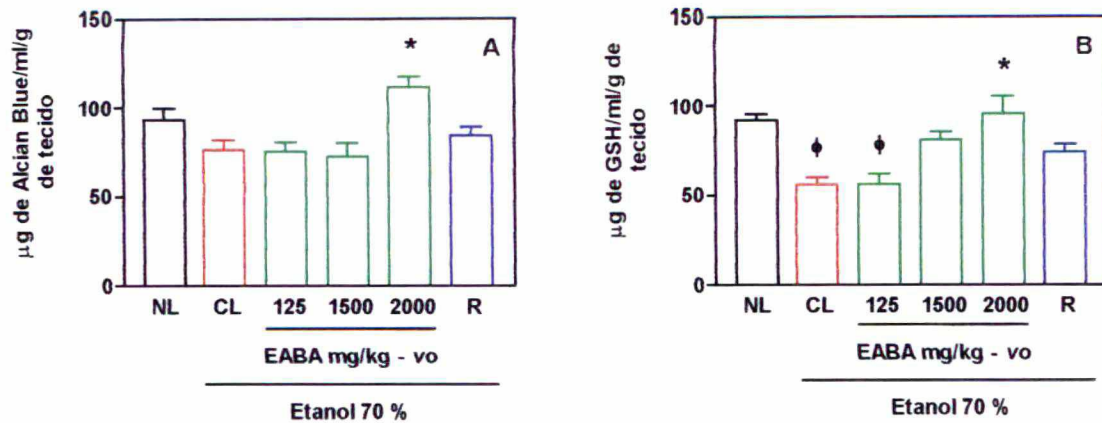


Figura 7: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - vo), do veículo (NL e CL: água 0,1 ml/100 g - vo) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - vo), sobre a quantidade de muco (A) e a concentração dos grupos sulfidrílicos (B) da mucosa gástrica glandular de ratas, dosados após a indução de lesões com etanol 70% (NL: grupo controle normal sem tratamento com agente lesivo). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) em μg de Alcian Blue/ml/g de tecido e em μg de GSH/ml/g de tecido. A correlação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

* Diferente do grupo controle lesado.

φ Diferente do grupo não lesionado.

4.1.5. Efeito da rutina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas

A administração oral de etanol 70% produziu lesões gástricas com um índice de lesões de $10,6 \pm 0,2$; um índice de úlceras de $92,0 \pm 8,0$ e um índice total de $102,5 \pm 8,3$ (Figura 8, Tabela 6 - Anexo).

O tratamento dos animais com a rutina na dose de 100 mg/kg, via oral, 2 horas antes da administração do etanol 70%, reduziu o aparecimento de lesões na mucosa gástrica em 20%, o índice de úlceras em 53% e o índice total em 49%. Doses maiores (200 mg/kg) e menores (50 mg/kg) não mostraram o mesmo efeito (Figura 8, Tabela 6 - Anexo).

A administração da ranitidina, controle positivo do teste, diminuiu a incidência de lesões em 19% quando comparado com o grupo controle (Figura 8 A, Tabela 6 - Anexo).

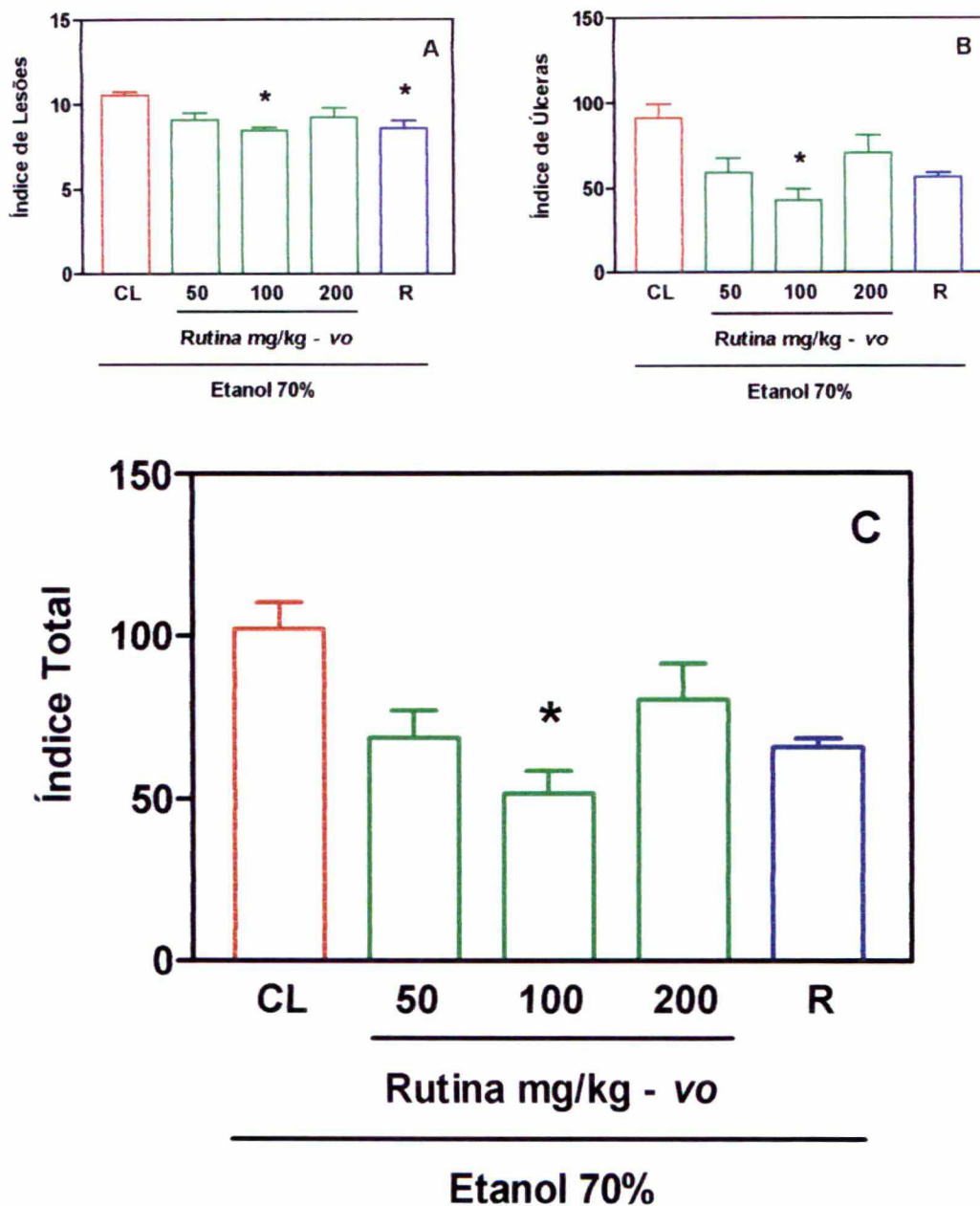


Figura 8: Efeito da rutina (50, 100 e 200 mg/kg - vo), do veículo (CL: água 0,1 ml/100 g - vo) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - vo) sobre o índice de lesões (A), o índice de úlceras (B) e o índice total (C) de lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para $p < 0,05$.

4.1.6. Efeito da quercetina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas

A administração oral de etanol 70% produziu lesões gástricas com um índice de lesões de $11,2 \pm 0,4$; um índice de úlceras de $85,1 \pm 6,3$ e um índice total de $96,2 \pm 6,6$ (Figura 9, Tabela 7 - Anexo).

A administração da quercetina nas doses de 100 e 200 mg/kg, via oral, 2 horas antes do etanol 70%, reduziram o aparecimento de lesões na mucosa gástrica em 18 e 27%, o índice de úlceras em 75 e 79% e o índice total em 68 e 73%, respectivamente (Figura 9, Tabela 7 - Anexo). A DI_{50} calculada para a proteção gástrica pela quercetina usando o índice total foi de 93 mg/kg.

O tratamento dos animais com a ranitidina, controle positivo do teste, diminuiu a incidência de lesões em 22% quando comparado com o grupo controle (Figura 9 A, Tabela 7 - Anexo).

4.1.7. Efeito do óleo volátil das folhas da *A. millefolium* sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas

A administração oral de etanol 70% produziu lesões gástricas com um índice de lesões de $10,8 \pm 0,4$; um índice de úlceras de $117,6 \pm 6,8$ e um índice total de $128,5 \pm 7,0$ (Figura 10, Tabela 8 - Anexo).

O tratamento dos animais com o óleo volátil na dose de 10 mg/kg, via oral, 1 hora antes da administração do etanol 70%, reduziu o índice total em 18% quando comparado com o grupo controle (Figura 10 C, Tabela 8 - Anexo). O óleo volátil nas doses de 5 e 50 mg/kg não preveniu o aparecimento de lesões ou úlceras na mucosa gástrica (Figura 10, Tabela 8 - Anexo).

A administração do EABA (2000 mg/kg), usado como controle positivo do teste, diminuiu a incidência de lesões em 52%, o índice de úlceras em 97% e o índice total em 93% (Figura 10, Tabela 8 - Anexo).

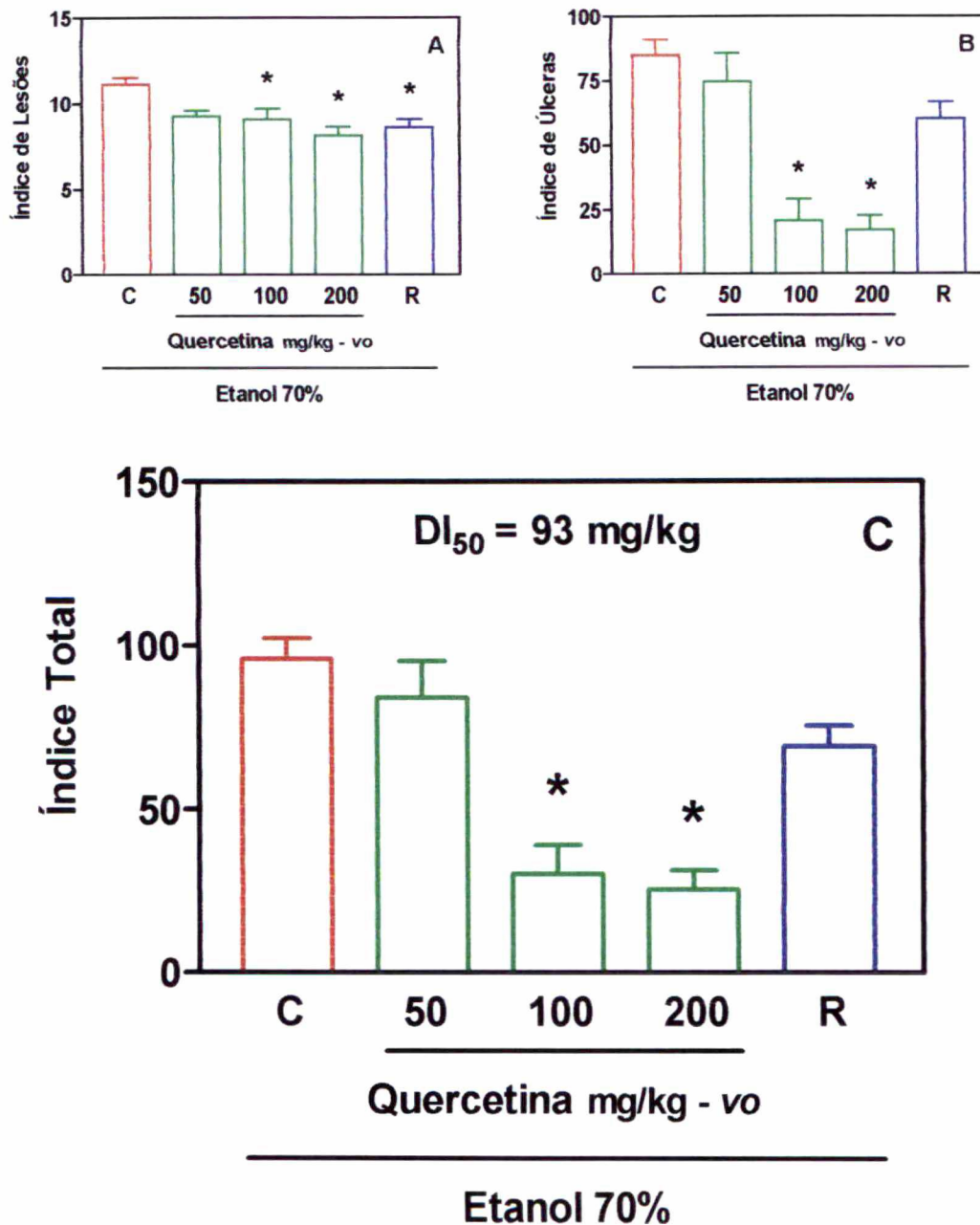


Figura 9: Efeito da quercetina (50, 100 e 200 mg/kg - vo), do veículo (CL: água 0,1 ml/100 g - vo) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - vo) sobre o índice de lesões (A), o índice de úlceras (B) e o índice total (C) de lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para $p < 0,05$.

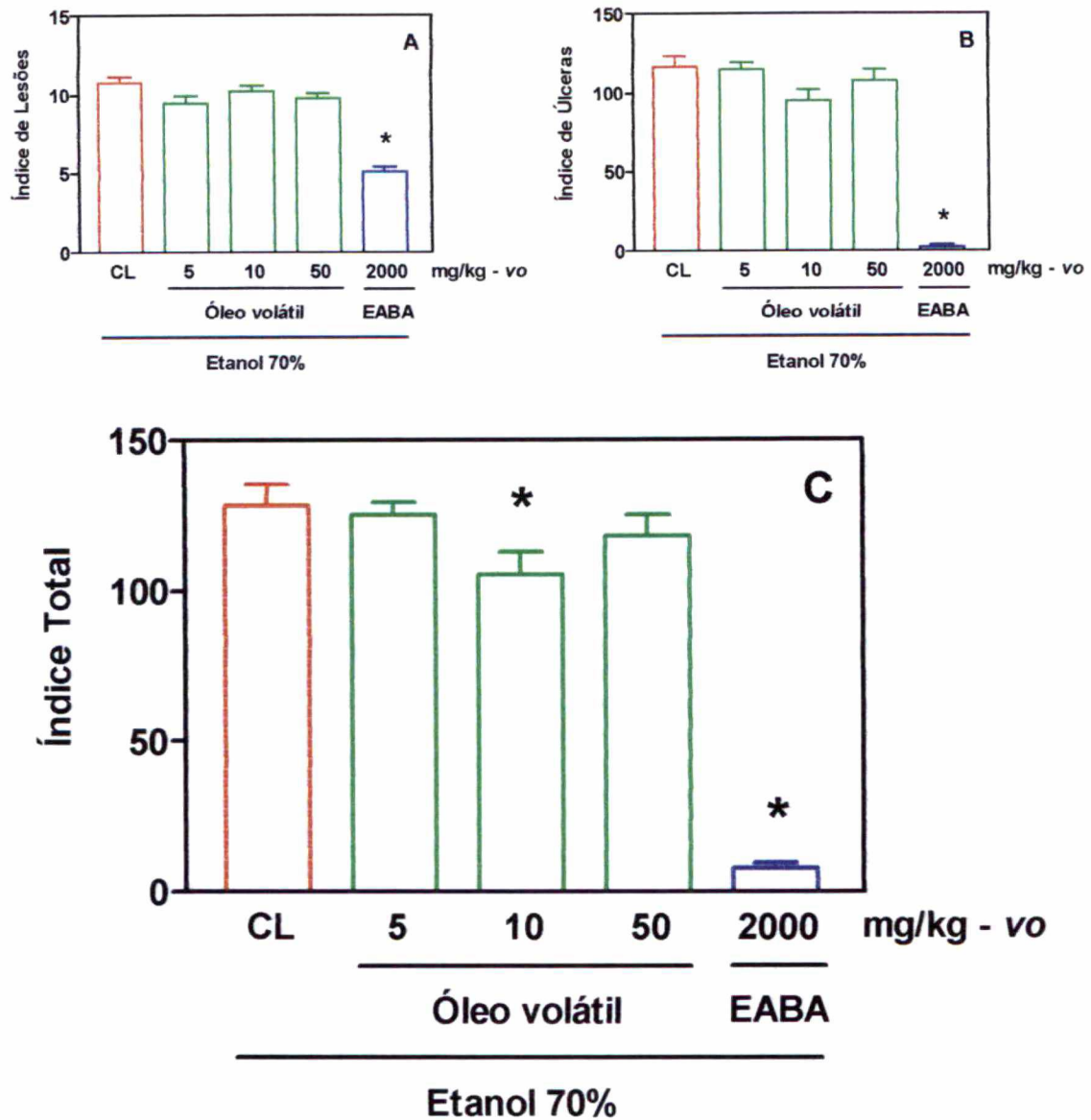


Figura 10: Efeito do óleo volátil das folhas da *A. millefolium* (5, 10 e 50 mg/kg - vo), do veículo (C: água 0,1 ml/100 g - vo) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - vo) sobre o índice de lesões (A), o índice de úlceras (B) e o índice total (C) de lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para $p < 0,05$.

4.1.8. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a atividade da enzima antioxidante NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) na mucosa gástrica de ratas com lesões gástricas induzidas pelo etanol (70%, 0,5 ml/200 g - vo)

A administração de etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) causou lesões gástricas extensivas, mas não alterou os níveis de NQO1 na mucosa glandular desses animais (Figura 11, Tabela 9 - Anexo).

O pré-tratamento dos animais com o EABA na dose de 2000 mg/kg pela via oral, 1 hora antes da administração do etanol 70%, não alterou a atividade da NQO1 quando comparado com o grupo não lesionado e com o grupo controle lesado (8940 ± 838 e 9542 ± 2355 nmoles/mg/min, respectivamente) (Figura 11, Tabela 9 - Anexo).

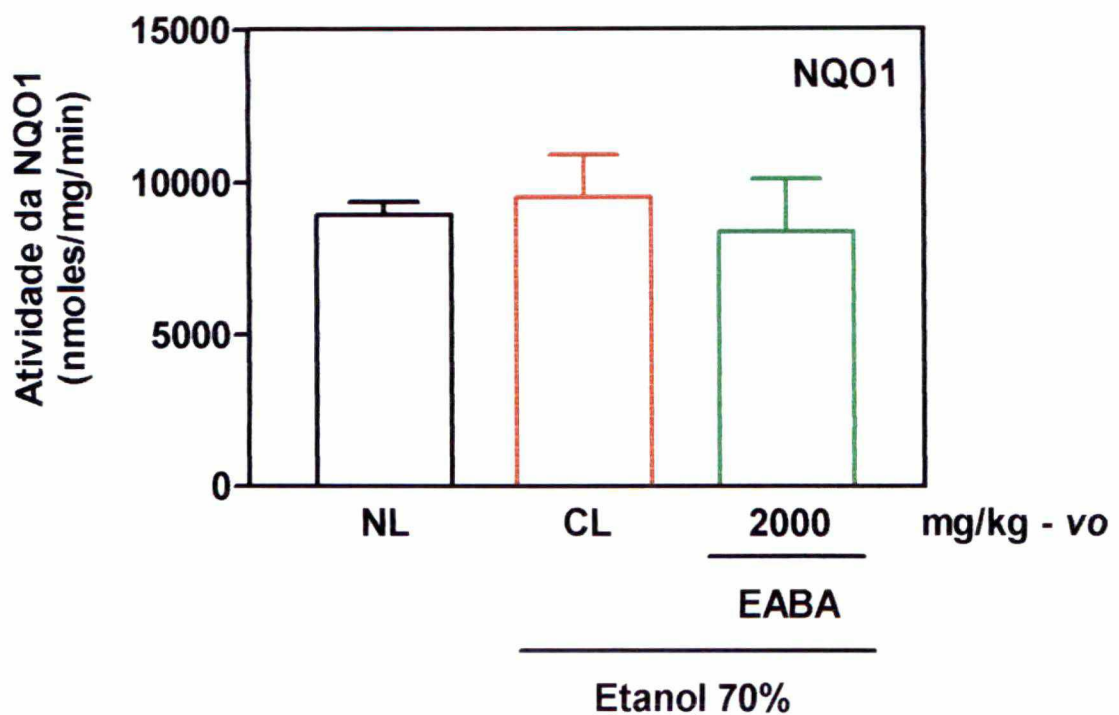


Figura 11: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) e do veículo (NL e CL: 0,1 ml/100 g - vo) sobre a atividade da enzima antioxidante NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) da mucosa gástrica glandular de ratas, dosada após a indução de lesões com etanol 70% (NL: atividade da NQO1 na ausência de lesão gástrica). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) em nmoles/mg/min. A correlação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

4.1.9. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a atividade da enzima antioxidante glutathiona S-transferase (GST) na mucosa gástrica de ratas com lesões gástricas induzidas pelo etanol (70%, 0,5 ml/200 g - vo)

A administração de etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) causou lesões gástricas extensivas, mas não alterou os níveis de GST na mucosa glandular desses animais (Figura 12, Tabela 10 - Anexo).

O pré-tratamento dos animais com o EABA na dose de 2000 mg/kg pela via oral, 1 hora antes da administração do etanol 70%, reduziu a atividade da GST em 47% quando comparado com o grupo controle (626 ± 57 nmoles/mg/min) (Figura 12, Tabela 10 - Anexo).

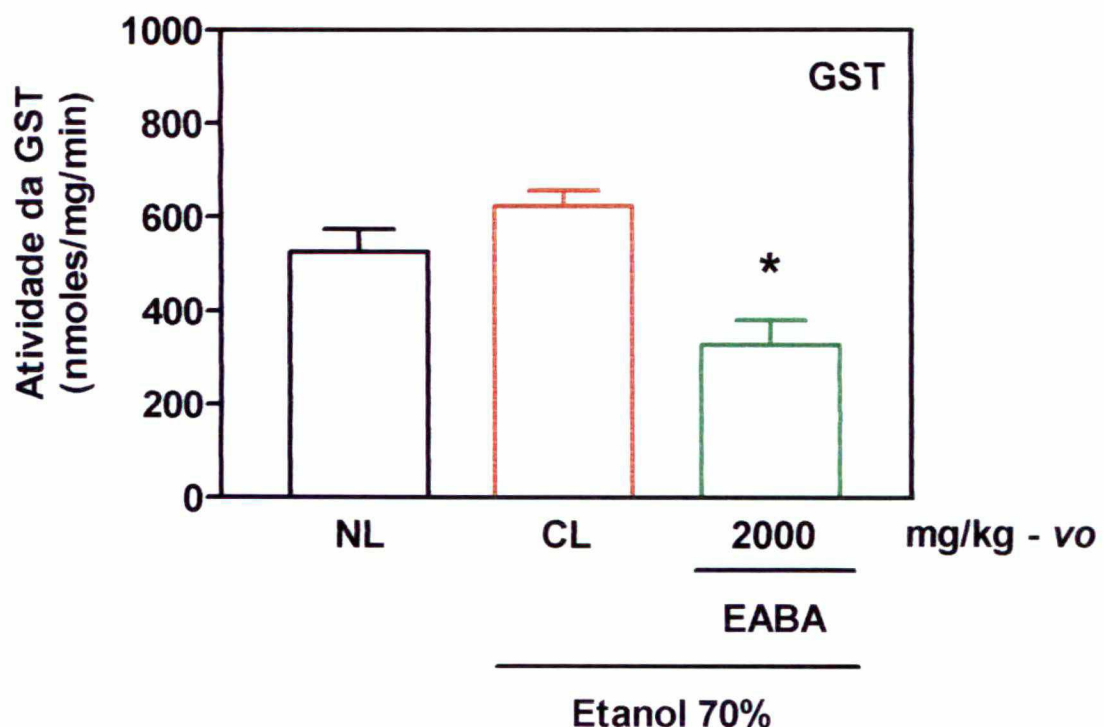


Figura 12: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) e do veículo (NL e CL: água 0,1 ml/100 g - vo) sobre a atividade da enzima antioxidante glutathiona S-transferase (GST) da mucosa gástrica glandular de ratas, dosada após a indução de lesões com etanol 70% (NL: atividade da GST na ausência de lesão gástrica). Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 6) em nmoles/mg/min. A correlação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para $p < 0,05$

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTISECRETORA ÁCIDA GÁSTRICA

4.2.1. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro

Nos animais controles, a ligadura do piloro por 4 horas produziu uma secreção gástrica com volume de $8,1 \pm 0,9$ ml, acidez total de $0,069 \pm 0,007$ mEq[H⁺]/ml/4 h e pH de $1,5 \pm 0,1$ (Figura 13, Tabela 11 - Anexo).

A dose de 2000 mg/kg do EABA, quando administrada pela via intraduodenal (*id*) imediatamente após a ligadura do piloro, reduziu o volume do conteúdo gástrico e a acidez total em 40 e 36%, respectivamente, e aumentou o pH em 0,7 unidades em comparação com o grupo controle (Figura 13, Tabela 11 - Anexo). A administração de doses menores não alterou a secreção ácida gástrica desses animais.

A ranitidina, controle positivo do teste, reduziu o volume total secretado e a acidez total da secreção gástrica em 36 e 61%, respectivamente e aumentou o pH em 1,4 unidades (Figura 13, Tabela 11 - Anexo).

4.2.2. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol (2,5 mg/kg - *sc*) em ratas com ligadura do piloro

Nos animais controle, a ligadura do piloro por 4 horas produziu uma secreção gástrica com volume de $8,3 \pm 0,3$ ml, acidez total de $0,077 \pm 0,003$ mEq[H⁺]/ml/4 h e pH de $1,6 \pm 0,1$ (Figura 14, Tabela 12 - Anexo).

A administração subcutânea do betanecol (2,5 mg/kg), 1 hora depois da ligadura pilórica, aumentou o volume de secreção em 54% ($12,8 \pm 0,4$ ml) e a acidez total em 16% ($0,089 \pm 0,002$ mEq[H⁺]/ml/4 h) e reduziu o pH em 0,3 unidades ($1,3 \pm 0,1$) (Figura 14, Tabela 12 - Anexo).

O tratamento dos animais com o EABA na dose de 2000 mg/kg via intraduodenal, reduziu o volume e a acidez total induzida pelo betanecol em 25 e 27% e aumentou o pH em 0,3 unidades (Figura 14, Tabela 12 - Anexo). Doses menores não alteraram a secreção gástrica induzida pelo betanecol.

A administração da atropina 1 mg/kg via subcutânea imediatamente após a ligadura do piloro reduziu o volume e a acidez total induzida pelo betanecol em 66 e 63%, respectivamente, e aumentou o pH em 1,4 unidades (Figura 14, Tabela 12 - Anexo). O efeito inibitório da atropina foi suficientemente potente para também reduzir os valores de secreção em comparação ao grupo controle não estimulado.

4.2.3. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina (400 µg/kg - sc) em ratas com ligadura do piloro

Nos animais controle, a ligadura do piloro por 4 horas produziu uma secreção gástrica com volume de $8,2 \pm 0,7$ ml, acidez total de $0,068 \pm 0,007$ mEq[H⁺]/ml e pH de $1,5 \pm 0,1$ (Figura 15, Tabela 13 - Anexo).

A administração subcutânea de pentagastrina 400 µg/kg, 1 hora após a ligadura do piloro aumentou o volume em 55% ($12,7 \pm 0,6$ ml) e a acidez total em 49% ($0,101 \pm 0,004$ mEq[H⁺]/ml/4 h) e reduziu o pH em 0,5 unidades ($1,0 \pm 0,1$) (Figura 15, Tabela 13 - Anexo).

O tratamento dos animais com o EABA em todas as doses testadas (125, 1500 e 2000 mg/kg - *id*) não preveniu o aumento do volume e da acidez total do conteúdo gástrico, e a redução do pH quando comparados com o grupo de animais estimulados com pentagastrina (Figura 15, Tabela 13 - Anexo).

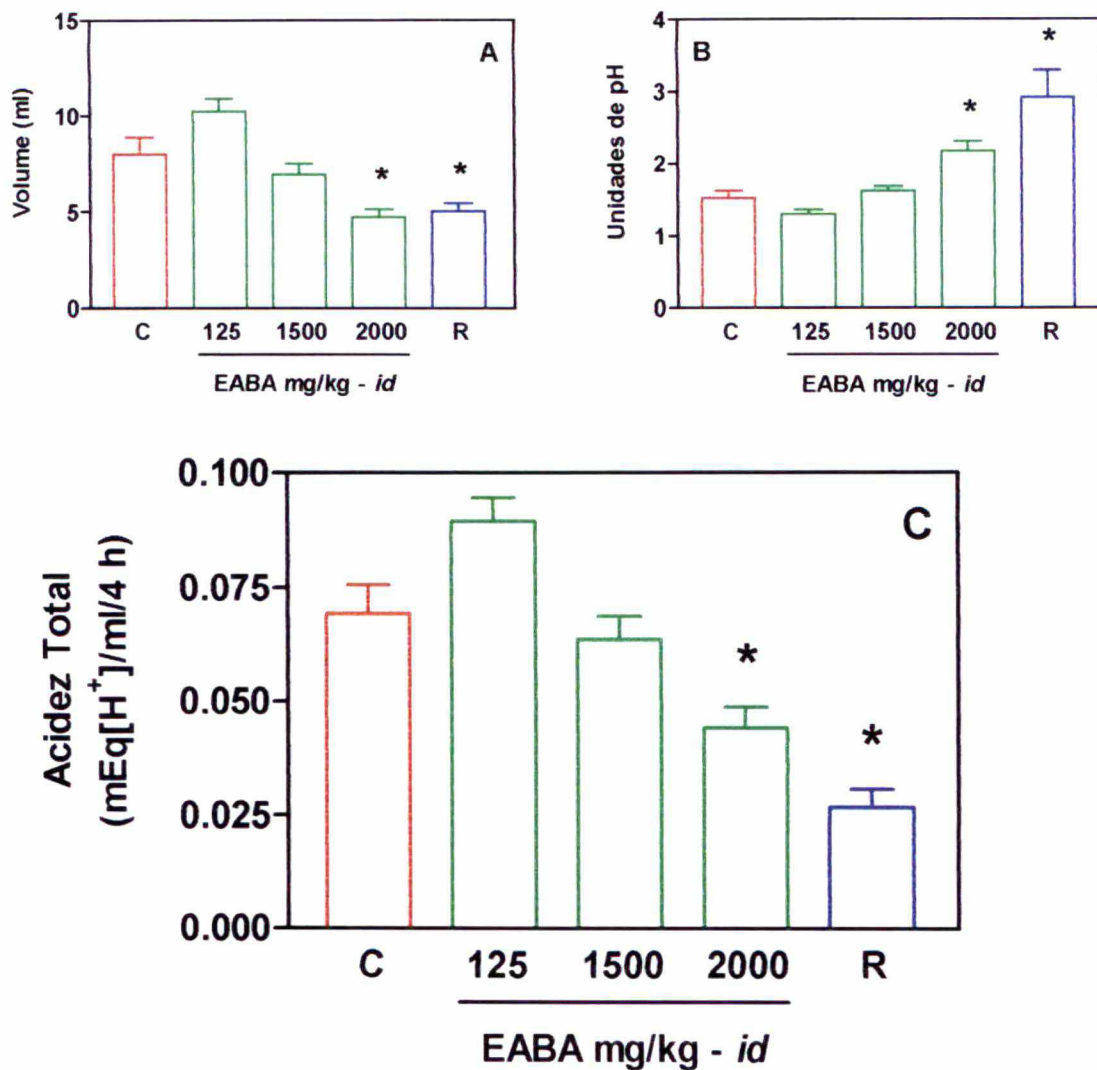


Figura 13: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - *id*), do veículo (C: água 0,1 ml/100 g - *id*) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - *id*), sobre o volume (A), o pH (B) e a acidez total (C) da secreção ácida gástrica basal, após 4 horas de ligadura pilórica em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

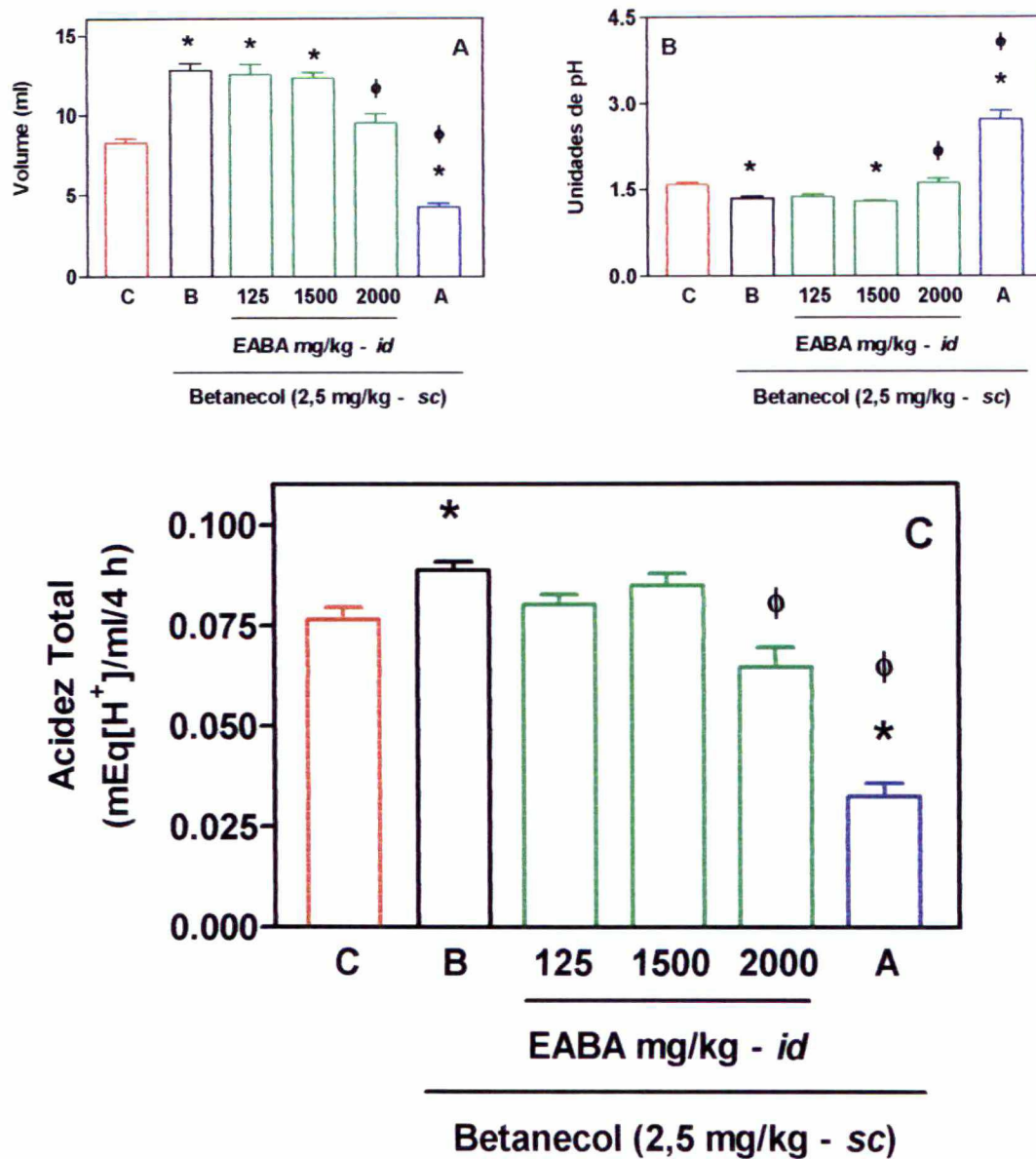


Figura 14: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - *id*), do veículo (C: água 0,1 ml/100 g - *id*) e da atropina (A: 1,0 mg/kg - *sc*), sobre o volume (A), o pH (B) e a acidez total (C) da secreção ácida gástrica estimulada com betanecol 2,5 mg/kg - *sc*, após 4 horas de ligadura pilórica em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

* Diferente do grupo controle.

ϕ Diferente do grupo betanecol.

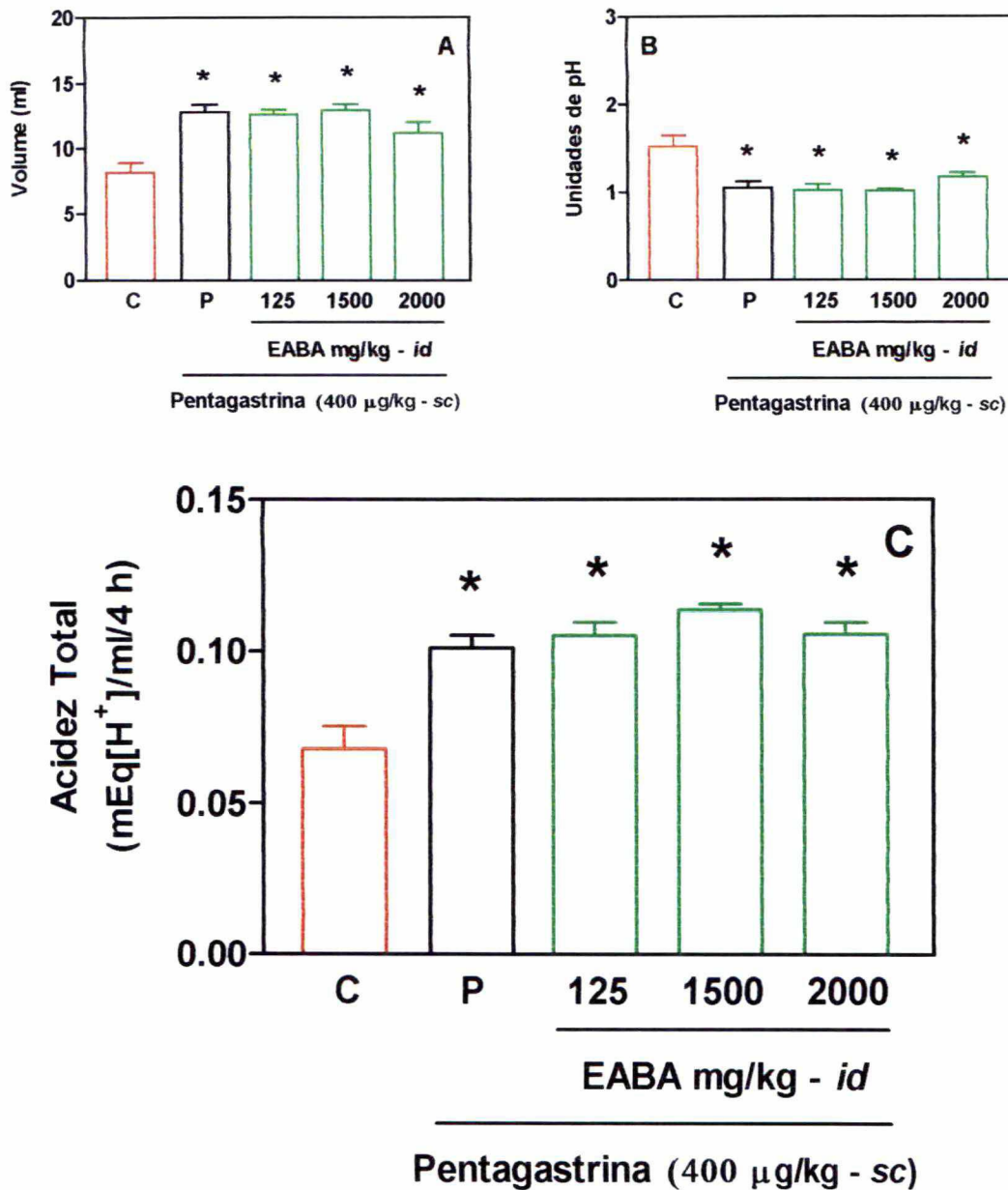


Figura 15: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - *id*) e do veículo (C: água 0,1 ml/100 g - *id*), sobre o volume (A), o pH (B) e a acidez total (C) da secreção ácida gástrica estimulada com pentagastrina 400 µg/kg - *sc*, após 4 horas de ligadura pilórica em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.2.4. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por histamina em ratas com ligadura do piloro

Nos animais controle, a ligadura do piloro por 4 horas produziu uma secreção gástrica com volume de $7,7 \pm 0,8$ ml, acidez total de $0,063 \pm 0,006$ mEq[H⁺]/ml e pH de $1,6 \pm 0,1$ (Figura 16, Tabela 14 - Anexo).

A administração subcutânea de histamina 10 mg/kg, 1 hora após a ligadura do piloro aumentou o volume em 69% ($13,0 \pm 0,3$ ml) e a acidez total em 71% ($0,108 \pm 0,002$ mEq[H⁺]/ml/4 h) e reduziu o pH em 0,5 unidades ($1,1 \pm 0,1$) (Figura 16, Tabela 14 - Anexo).

O tratamento dos animais com o EABA com a dose de 2000 mg/kg - *id* reduziu a acidez total em 37% quando comparado com o grupo controle. A dose de 2000 mg/kg também preveniu o aumento do volume e da acidez total em 44 e 20%, respectivamente, e a redução do pH do conteúdo gástrico em 0,4 unidades, quando comparado com o grupo de animais estimulados com histamina (Figura 16, Tabela 14 - Anexo).

A administração da ranitidina 60 mg/kg - *id*, controle positivo do teste, imediatamente após a ligadura do piloro, preveniu o aumento do volume e a acidez total do conteúdo gástrico, e a redução do pH quando comparada com o grupo estimulado pela histamina (Figura 16, Tabela 14 - Anexo). O efeito inibitório da ranitidina foi suficientemente potente para também reduzir os valores de secreção em comparação ao grupo controle não estimulado.

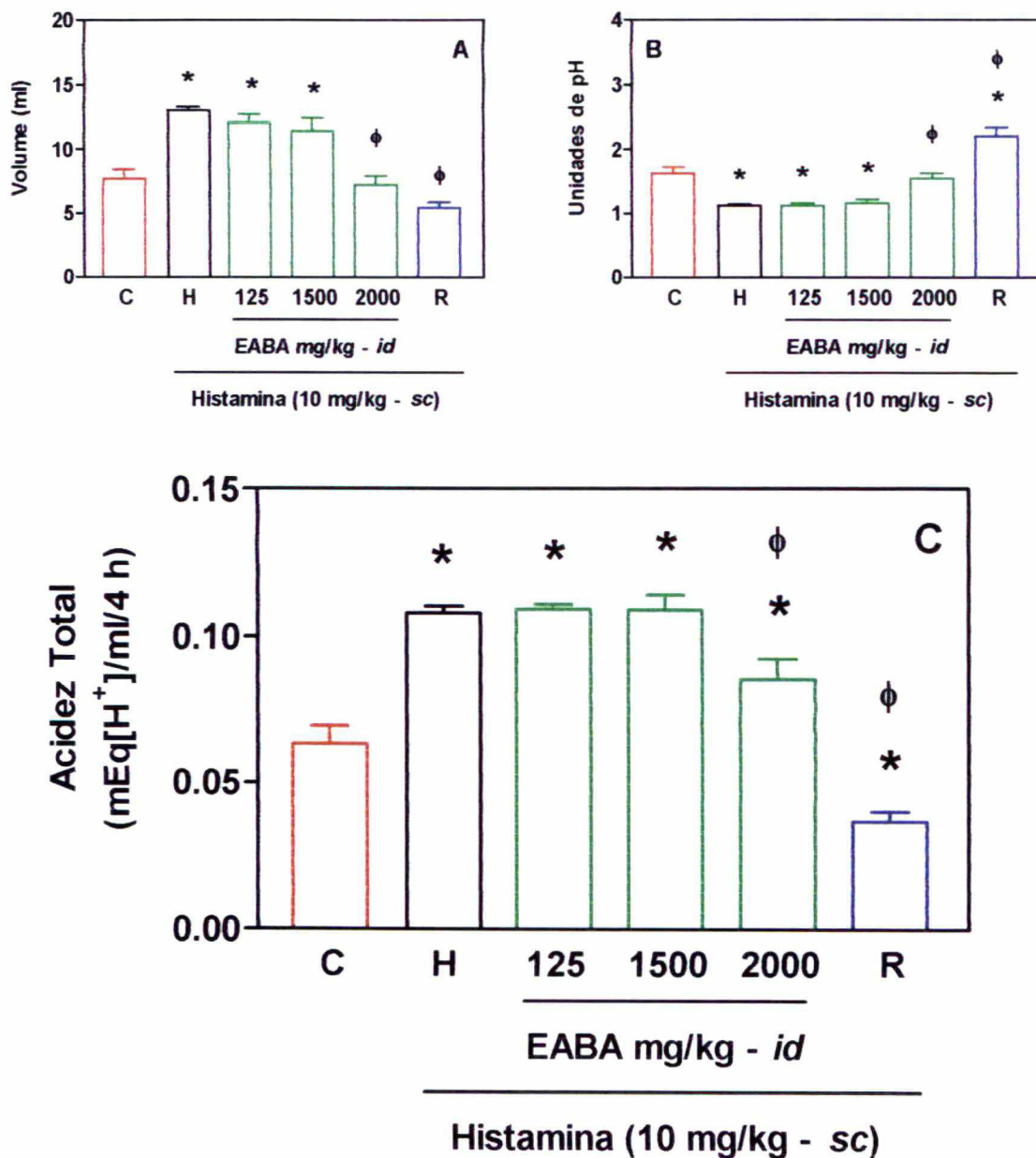


Figura 16: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - *id*), do veículo (C: água 0,1 ml/100 g - *id*) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - *id*), sobre o volume (A), o pH (B) e a acidez total (C) da secreção ácida gástrica estimulada com histamina 10 mg/kg - *sc*, após 4 horas de ligadura pilórica em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do Teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

* Diferente do grupo controle.

ϕ Diferente do grupo histamina.

4.2.5. Caracterização da atividade da enzima H^+/K^+ -ATPase

Para a caracterização da atividade da H^+/K^+ -ATPase obtida de mucosa gástrica de cachorro, foi realizada uma curva proteína-atividade (0,1-20 mg/ml) incubando-se com ATP (1 mM), a qual foi linear até 1,8 mg/ml de proteína. A hidrólise de ATP em P_i variou de 0,30 a 8,79 μ MPi/mg (Figura 17 A, Tabela 15 - Anexo). Uma segunda curva de relação tempo-atividade (2,5-25 minutos) foi realizada, a qual foi linear até 20 minutos, com hidrólise de ATP em P_i variando de 0,1 a 6,9 μ MPi/min (Figura 17 B, Tabela 16 - Anexo). A determinação dos parâmetros cinéticos da atividade enzimática dependente de ATP foi realizada com concentrações de 0,1 a 1,0 mM de ATP (1 mg/ml de proteína enzimática), onde se obteve a hidrólise do ATP de 0,22 a 0,38 μ MPi/mg/min. O K_m da reação foi de $86,7 \pm 4,6 \mu$ M e o $V_{m\acute{a}x}$ foi de $412,2 \pm 4,6 \mu$ MPi formado/mg/min (Figura 17 C, Tabela 17).

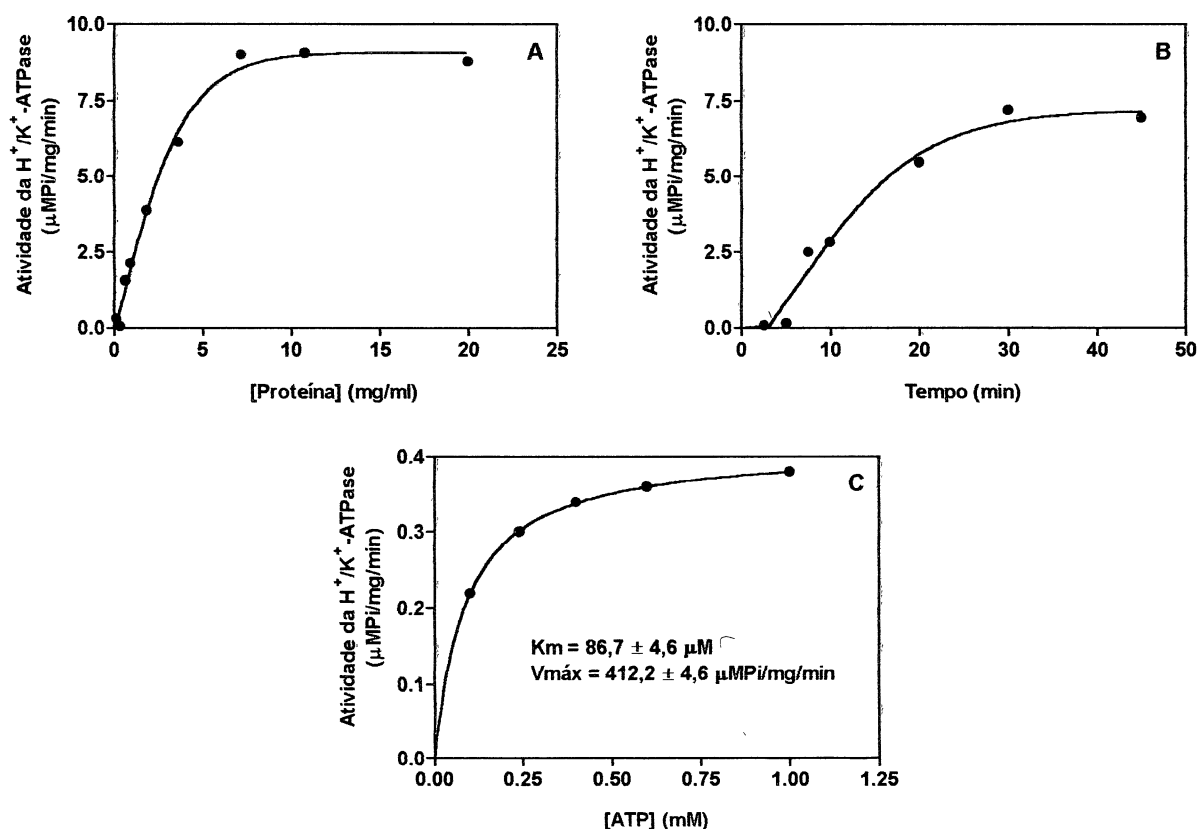


Figura 17: Caracterização da atividade da H^+/K^+ -ATPase. Curvas concentração de proteína (A), de tempo (B) e concentração de ATP (C) foram determinadas. Os pontos representam o promédio de determinações realizadas em triplicata.

A atividade da H^+/K^+ -ATPase ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), incubada com ATP (1 mM) por 20 minutos na presença do omeprazol ($0,1$ a $1,0 \text{ mM}$), foi reduzida com um CI_{50} de $420 \mu\text{M}$. Para verificar a especificidade de ação e eliminar a possibilidade de contaminação da fração celular com outras ATPases, a H^+/K^+ -ATPase foi incubada com ATP (1 mM) por 20 minutos na presença de ouabaina ($0,1$ a $1,0 \text{ mM}$) e a atividade da enzima não foi alterada (Figura 18, Tabela 18 - Anexo).

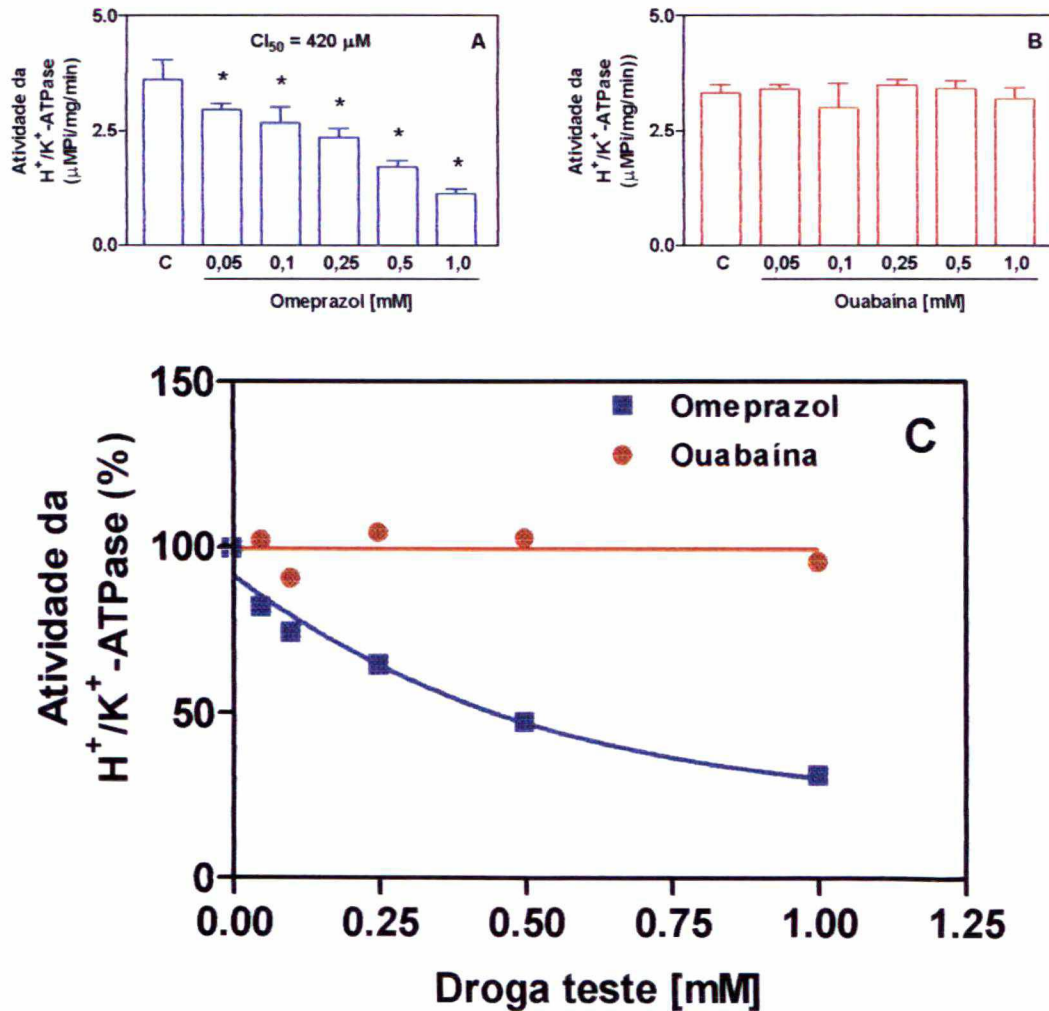


Figura 18: Efeito do omeprazol ($0,05$ - $1,0 \text{ mM}$) (A) e ouabaina ($0,05$ - $1,0 \text{ mM}$) (B). Em (C), comparação dos efeitos de ambas as drogas na atividade da H^+/K^+ -ATPase. Cada ponto representa o promédio de determinações realizadas em triplicata. As barras/pontos estão expressas como médias \pm erro padrão das médias e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.2.6. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a atividade da H⁺/K⁺-ATPase

O EABA reduziu a hidrólise de ATP da H⁺/K⁺-ATPase com CI₅₀ de 382 µg/ml. (Figura 19, Tabela 19 - Anexo).

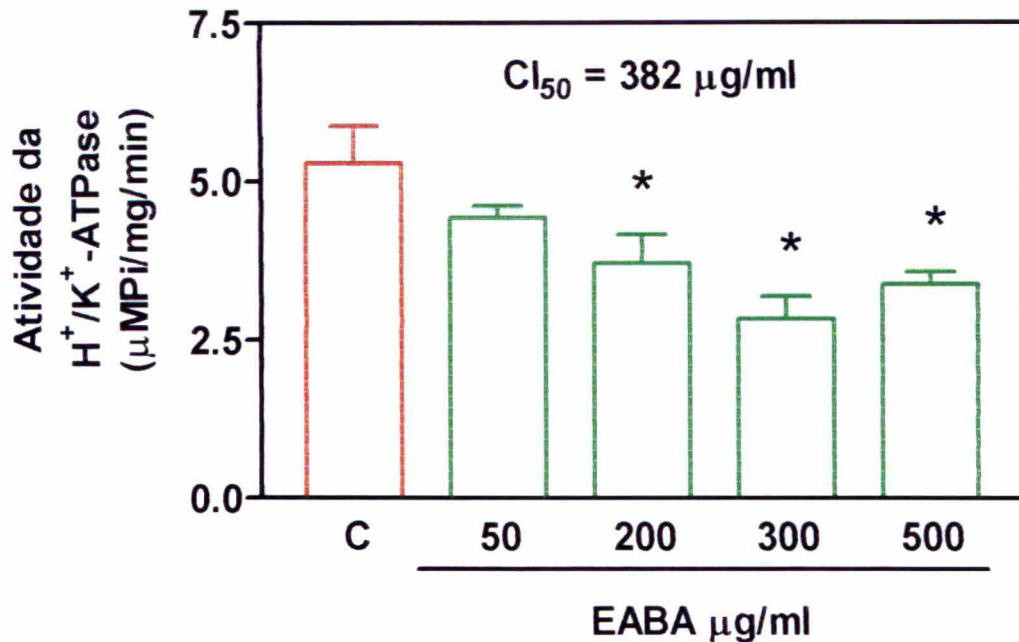


Figura 19: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (50, 100, 200, 300 e 500 µg/ml) na atividade da H⁺/K⁺-ATPase. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias de determinações em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.2.7. Efeito da rutina sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro

Nos animais controle, a ligadura do piloro por 4 horas produziu uma secreção gástrica com volume de $6,9 \pm 0,4$ ml, acidez total de $0,068 \pm 0,004$ mEq[H⁺]/ml e pH de $1,7 \pm 0,1$ (Figura 20, Tabela 20 - Anexo).

A rutina, em todas as doses testadas (50, 100 e 200 mg/kg), quando administrada pela via intraduodenal (*id*), imediatamente após a ligadura do piloro,

não alterou o volume, o pH ou a acidez total do conteúdo gástrico (Figura 20, Tabela 20 - Anexo).

A ranitidina, controle positivo do teste, não alterou o volume do conteúdo gástrico, mas reduziu a acidez total da secreção gástrica em 62% e aumentou o pH em 1,1 unidades em comparação com o grupo controle (Figura 20, Tabela 20 - Anexo).

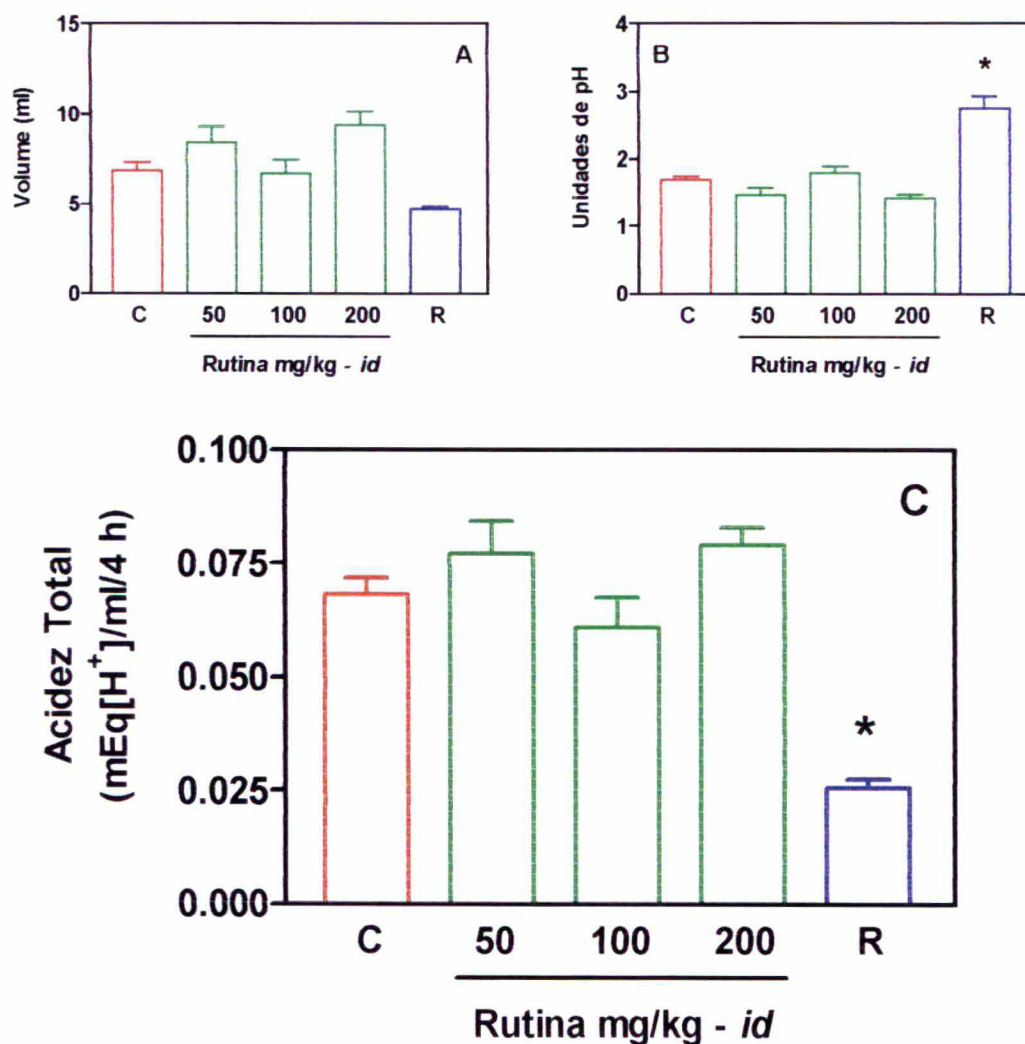


Figura 20: Efeito da rutina (50, 100 e 200 mg/kg - id), do veículo (C: água 0,1 ml/100 g - id) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - id), sobre o volume (A), o pH (B) e a acidez total (C) da secreção ácida gástrica basal, após 4 horas de ligadura pilórica em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.2.8. Efeito da rutina sobre a atividade da H^+/K^+ -ATPase

A rutina reduziu a hidrólise de ATP da H^+/K^+ -ATPase com CI_{50} de $339 \mu M$. (Figura 21, Tabela 21 - Anexo).

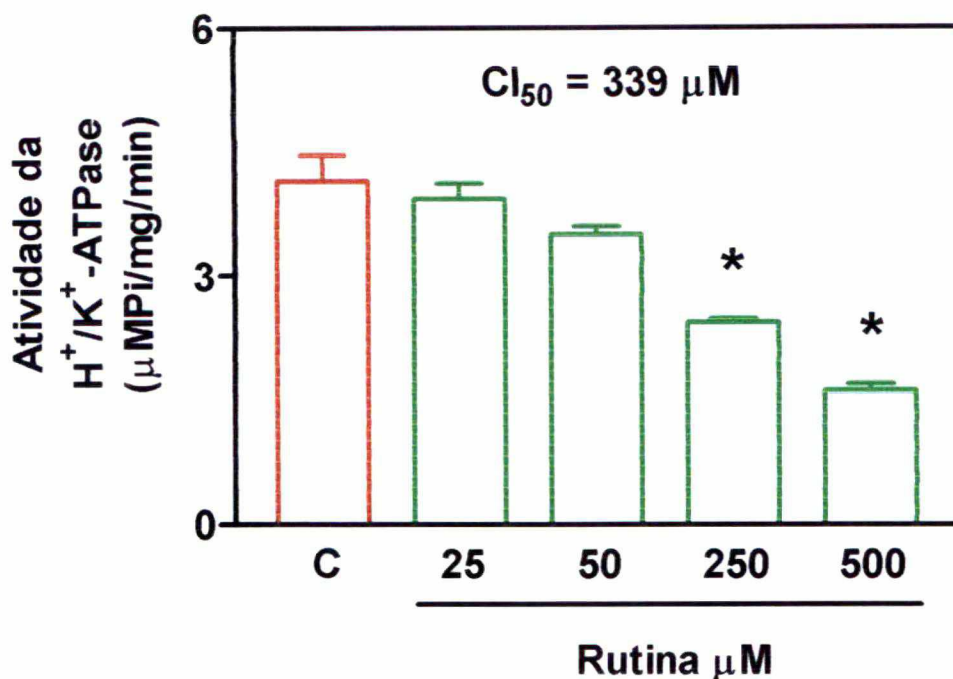


Figura 21: Efeito da rutina (25, 50, 250 e 500 μM) na atividade da H^+/K^+ -ATPase. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de determinações em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.2.9. Efeito da quercetina sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro

Nos animais controle, a ligadura do piloro por 4 horas produziu uma secreção gástrica com volume de $7,4 \pm 0,6$ ml, acidez total de $0,076 \pm 0,005$ mEq[H^+]/ml e pH de $1,6 \pm 0,1$ (Figura 22, Tabela 22 - Anexo).

O tratamento dos animais com a quercetina, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg administradas pela via intraduodenal, imediatamente após a ligadura do

piloro, não alterou o volume, o pH e a acidez total do conteúdo gástrico (Figura 22, Tabela 22 - Anexo).

A administração da ranitidina, controle positivo do teste, reduziu a acidez total da secreção gástrica em 68% e aumentou o pH em 1,1 unidades quando comparado com o grupo controle, mas não alterou o volume (Figura 22, Tabela 22 - Anexo).

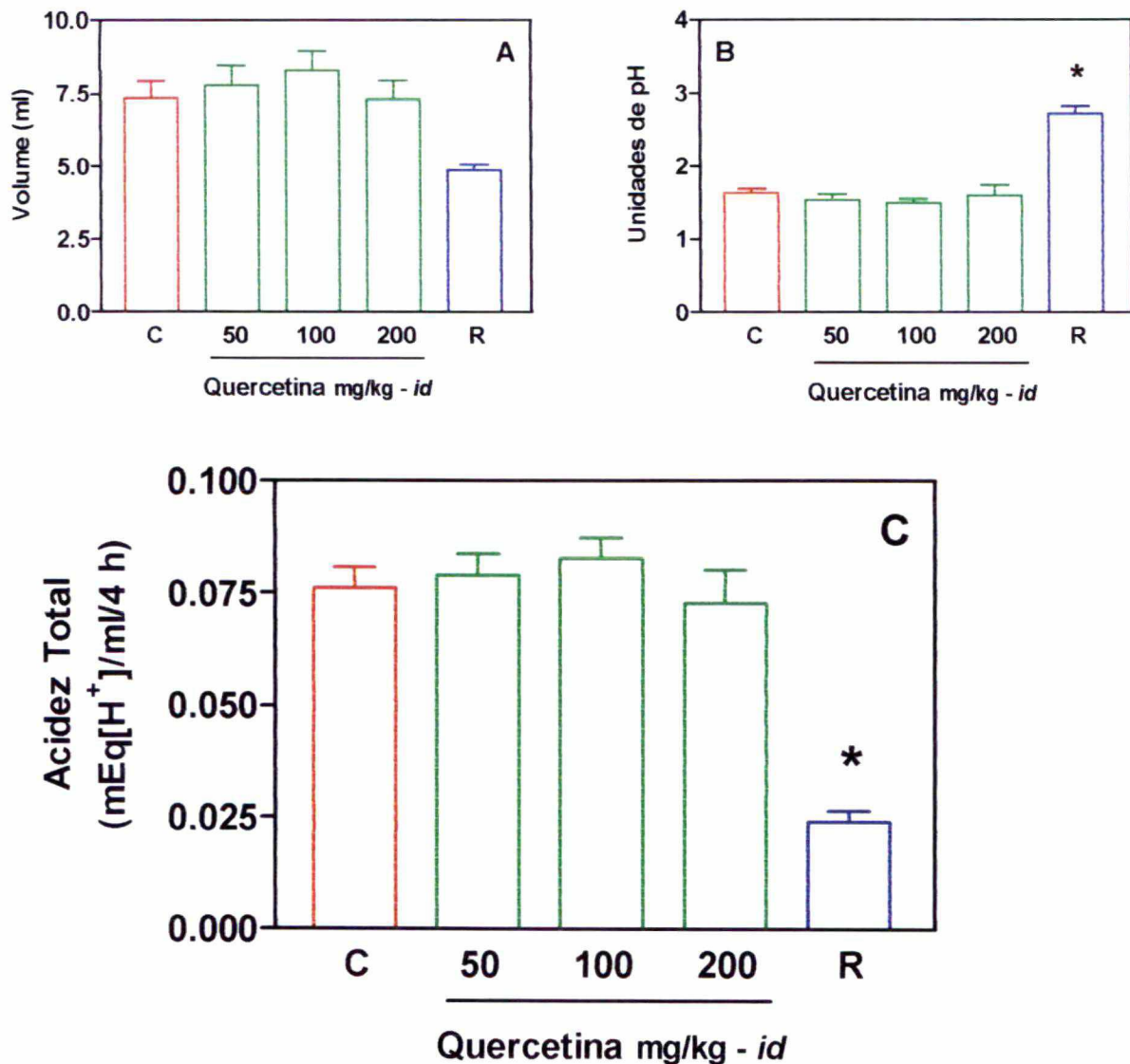


Figura 22: Efeito da quercetina (50, 100 e 200 mg/kg - *id*), do veículo (C: água 0,1 ml/100 g - *id*) e da ranitidina (R: 60 mg/kg - *id*), sobre o volume (A), o pH (B) e a acidez total (C) da secreção ácida gástrica basal, após 4 horas de ligadura pilórica em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.2.10. Efeito da quercetina sobre a atividade da H⁺/K⁺-ATPase

A quercetina reduziu a hidrólise de ATP da H⁺/K⁺-ATPase com CI₅₀ de 231 μM (Figura 23, Tabela 23 - Anexo).

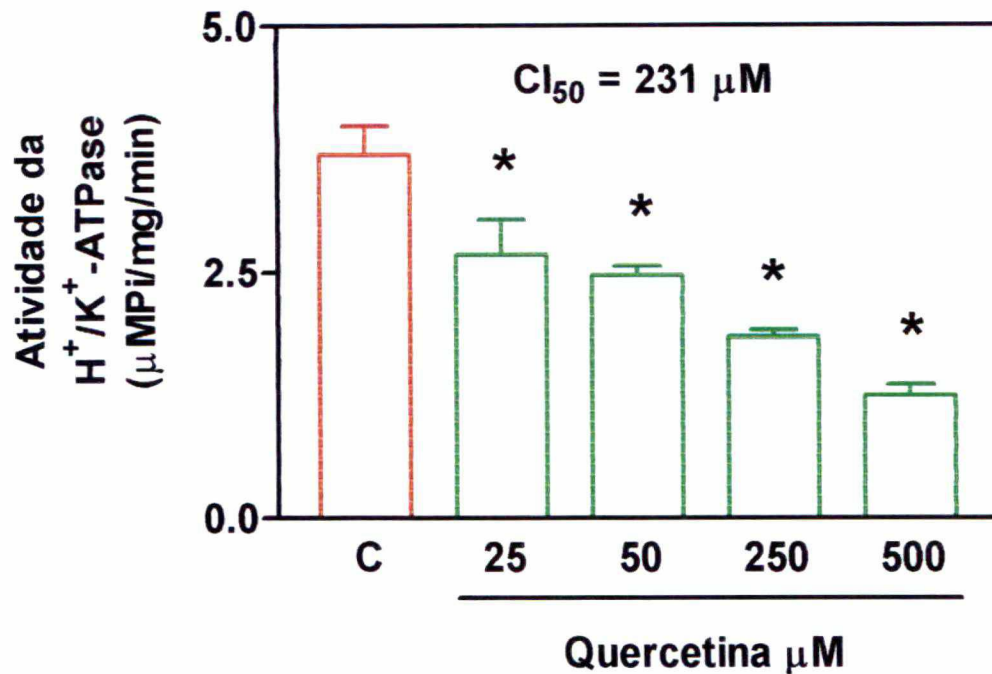


Figura 23: Efeito da quercetina (25, 50, 250 e 500 μM) na atividade da H⁺/K⁺-ATPase. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias de determinações em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.2.11. Efeito do óleo volátil das folhas da *A. millefolium* sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro

Nos animais controle, a ligadura do piloro por 4 horas produziu uma secreção gástrica com volume de $8,4 \pm 0,8$ ml, acidez total de $0,077 \pm 0,009$ mEq[H⁺]/ml e pH de $1,7 \pm 0,1$ (Figura 24, Tabela 24 - Anexo).

A administração do óleo volátil das folhas da *A. millefolium*, nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg pela via intraduodenal, imediatamente após a ligadura do piloro,

não alterou o volume, o pH e a acidez total do conteúdo gástrico (Figura 24, Tabela 24 - Anexo).

O EABA, controle positivo do teste, reduziu o volume e a acidez total em 46% e 46%, respectivamente, e aumentou o pH em 0,5 unidades em comparação com o grupo controle (Figura 24, Tabela 24 - Anexo).

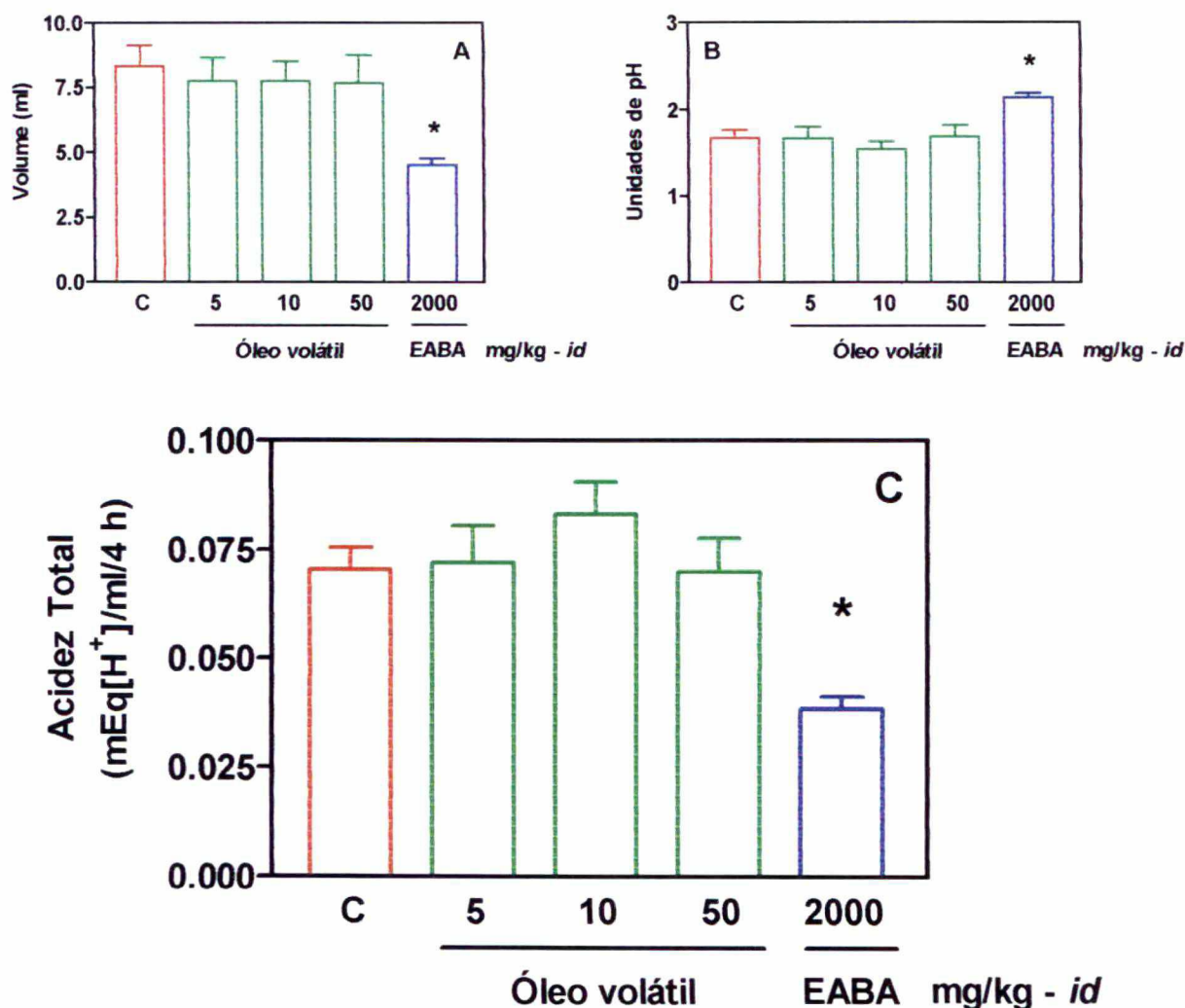


Figura 24: Efeito do óleo volátil das folhas da *A. millefolium* (5, 10 e 50 mg/kg - *id*), do veículo (C: água 0,1 ml/100 g - *id*) e do EABA (2000 mg/kg - *id*), sobre o volume (A), o pH (B) e a acidez total (C) da secreção ácida gástrica basal, após 4 horas de ligadura pilórica em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

4.3.1. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre o esvaziamento gástrico de líquidos em ratas

O pré-tratamento dos animais com o extrato na dose de 125 mg/kg, pela via oral, diminuiu o esvaziamento gástrico do vermelho de fenol em 27%. Porém doses maiores do extrato não alteraram os valores de esvaziamento gástrico do grupo controle (Figura 25, Tabela 25 - Anexo).

A administração da atropina 3,0 mg/kg - vo, controle positivo do teste, também diminuiu o esvaziamento gástrico em 36% em comparação com o grupo controle (Figura 25, Tabela 25 - Anexo).

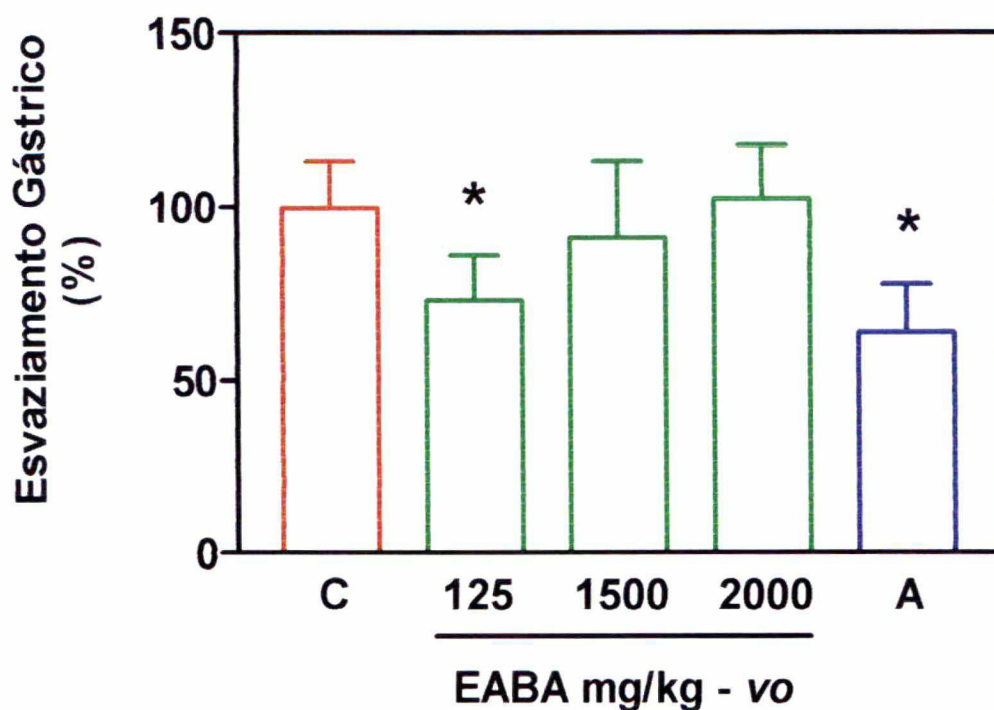


Figura 25: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (125, 1500 e 2000 mg/kg - vo), do veículo (C: água, 0,1 ml/100 g - vo) e da atropina (A: 3,0 mg/kg - vo) sobre o esvaziamento gástrico de líquidos em ratas. Os resultados estão expressos como médias \pm desvio padrão (n=6) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.3.2. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre o trânsito intestinal em camundongos fêmeas

Nos animais controle, o carvão ativado percorreu $71,2 \pm 3,7\%$ do intestino dos animais.

A administração do EABA não alterou o trânsito intestinal dos animais em nenhuma das doses testadas (Figura 26, Tabela 26 - Anexo).

A neostigmina $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ pela via subcutânea, controle positivo do teste, aumentou o trânsito intestinal em 24% quando comparado com o grupo controle (Figura 26, Tabela 26 - Anexo).

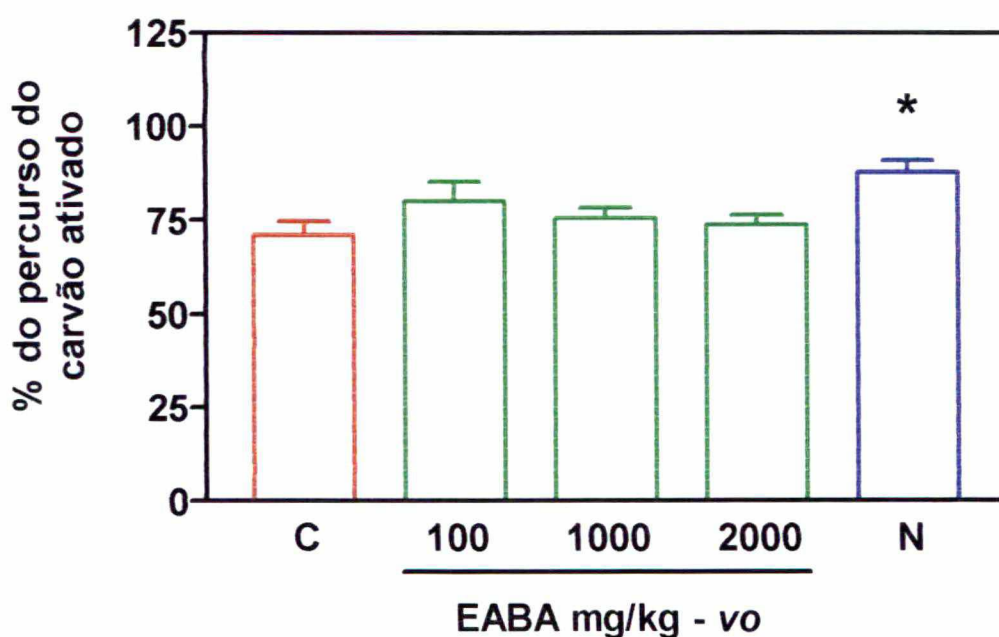


Figura 26: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* L. (EABA), do veículo (C: água, 0,1 ml/10 g - vo) e da neostigmina (N: $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ - sc) sobre o trânsito intestinal em camundongos fêmeas. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n=6$) em porcentagem da distância percorrida pelo carvão e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.3.3. Padronização do método da diarreia induzida pelo óleo de rícino

Os animais tratados com água (0,1 ml/10 g - vo) defecaram o primeiro sólido em 4 ± 1 minutos, não apresentaram diarreia, por isso não se observaram episódios líquidos, o número de episódios sólidos foi de $2,8 \pm 1,2$ e o peso total das fezes foi de $0,034 \pm 0,012$ g em 4 horas (Figura 27, Tabela 27 - Anexo).

O óleo de rícino, administrado nos volumes de 0,1; 0,3; 0,5 e 0,8 ml/30 g de animal, não alterou o tempo de defecação do primeiro sólido e o número de episódios sólidos, induziu diarreia após 27 ± 2 , 34 ± 5 ; 33 ± 4 e 33 ± 3 minutos, respectivamente; e aumentou o número de episódios líquidos para $11,7 \pm 2,0$; $8,5 \pm 2,0$; $12,7 \pm 2,1$ e $10,7 \pm 1,9$, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (C: 0). O óleo de rícino, 0,1 e 0,8 ml/30 g, diminuiu o número de episódios sólidos aumentou o peso total das fezes em 529 e 497%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (Figura 27, Tabela 27 - Anexo).

4.3.4. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino (0,3 ml/30 g - vo) em camundongos fêmeas

O óleo de rícino (0,3 ml/30 g - vo) induziu diarreia após 53 ± 4 minutos da sua administração. O número de episódios líquidos determinados durante 75 minutos após a administração do óleo foi de $8,5 \pm 1,0$ episódios (Figura 28, Tabela 28 - Anexo).

A administração do extrato nas doses de 100, 500 e 1000 mg/kg - vo não alterou o tempo de indução da diarreia e o número de episódios líquidos, quando comparado com o grupo controle (Figura 28, Tabela 28 - Anexo).

O tratamento dos animais com loperamida 5,0 mg/kg - vo, controle positivo do teste, aumentou o tempo de indução da diarreia e reduziu o número de episódios líquidos após a administração do óleo de rícino (Figura 28, Tabela 28 - Anexo).

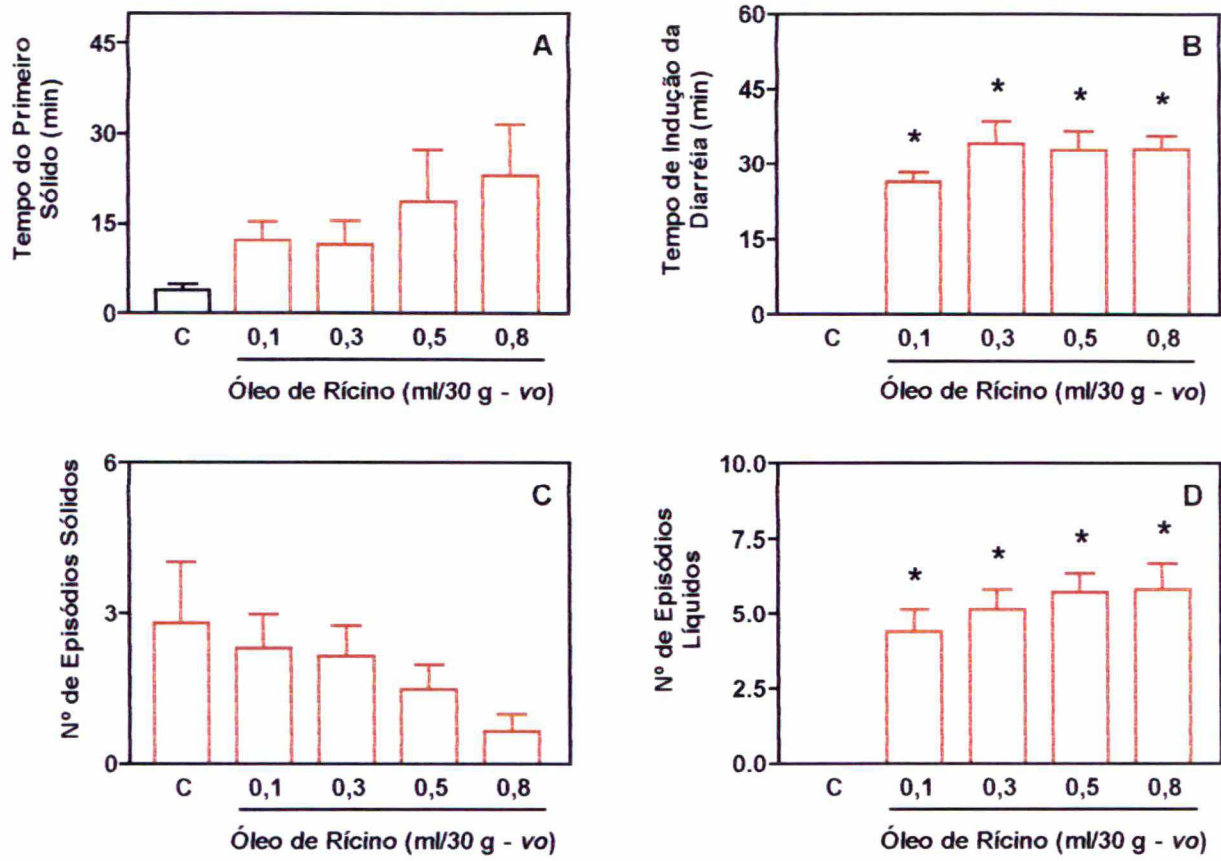


Figura 27: Diarréia induzida pelo óleo de rícino (0,1; 0,3; 0,5 e 0,8 ml/30 g - vo) em camundongos fêmeas. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n=6$) em tempo do primeiro sólido (A), tempo de indução da diarréia (B); número de episódios sólidos (C) e número de episódios líquidos (D) determinados em 4 horas e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

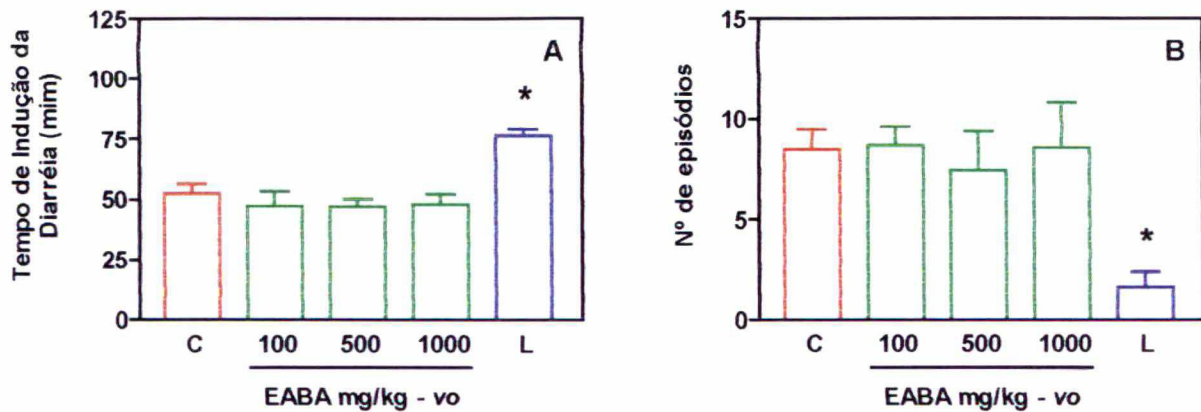


Figura 28: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) (100, 500 e 1000 mg/kg - vo), do veículo (C: água, 0,1 ml/10 g - vo) e da loperamida (L: 5,0 mg/kg - vo) sobre a diarréia induzida pelo óleo de rícino (0,3 ml/30 g - vo) em camundongos fêmeas. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n=6) em tempo de indução da diarréia (A) e número de episódios líquidos (B) determinados em 75 minutos e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre os pesos relativos dos órgãos após tratamento subcrônico de ratas

O tratamento dos animais com o EABA por 7 dias consecutivos e 2 vezes ao dia, aumentou o peso relativo dos rins em 13% quando comparado com o grupo controle (C: $0,62 \pm 0,02\%$), mas não alterou o peso relativo do fígado, do estômago, do pâncreas, das adrenais, do timo e do útero (sem ovários) (Tabela 29).

Tabela 29: Efeito do tratamento subcrônico de ratas com o extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) e do veículo (C: água, 0,1 ml/100 g - vo) sobre o peso relativo dos órgãos.

Órgãos	Peso Relativo (%)	
	Controle (0,1 ml/100 g - vo)	EABA (1 g/kg - vo)
Fígado	3,72 ± 0,14	3,88 ± 0,27
Estômago	0,63 ± 0,02	0,65 ± 0,03
Pâncreas	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,02
Rins	0,62 ± 0,02	0,70 ± 0,03 *
Adrenais	0,028 ± 0,002	0,028 ± 0,001
Timo	0,099 ± 0,009	0,103 ± 0,009
Útero (sem ovários)	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01

Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n=6) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

4.4.2. Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a atividade das enzimas antioxidantes da mucosa gástrica após tratamento subcrônico de ratas

A atividade das enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT foram determinadas na parte glandular (corpo) e no fundo do estômago. As atividades específicas dessas enzimas no citosol dos animais controles mostraram grandes diferenças. A atividade específica da NQO1 no corpo do estômago dos animais controles foi 12 vezes maior do que a da GST e 643 vezes maior do que a da CAT. No fundo do estômago, a atividade específica da NQO1 foi 17 vezes maior do que a da GST e 156 vezes maior do que a da CAT. A atividade específica da GST no corpo e no fundo do estômago foi 54 e 9 vezes maior do que a da CAT, respectivamente (Figura 29, Tabela 30 - Anexo). A atividade específica da GST no corpo foi 2 vezes maior do que no fundo e a atividade específica da CAT foi 3

vezes maior no fundo do que no corpo. Porém, a atividade da NQO1 não foi diferente estatisticamente entre o corpo e o fundo (Figura 30, Tabela 31 - Anexo).

O tratamento dos animais com o EABA na dose de 1000 mg/kg - vo, reduziu a atividade da enzima antioxidante GST presente no corpo do estômago em 32% (C: 756 ± 84 nmoles/mg/min), sem alterar a atividade da GST no fundo e nem as atividades da NQO1 e da CAT no corpo ou no fundo dos estômagos dos animais tratados cronicamente com o EABA (Figura 31, 32 e 33, Tabela 32 - Anexo).

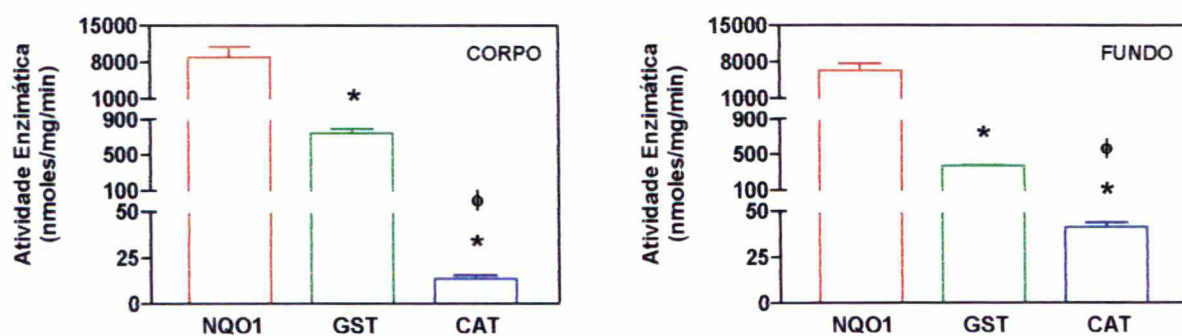


Figura 29: Atividades específicas das enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT no citosol do corpo e do fundo do estômago dos animais controles (C: água, 0,1 ml/100 g - vo) tratados cronicamente. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de determinações realizadas em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

* Diferente do grupo NQO1.

φ Diferente do grupo GST.

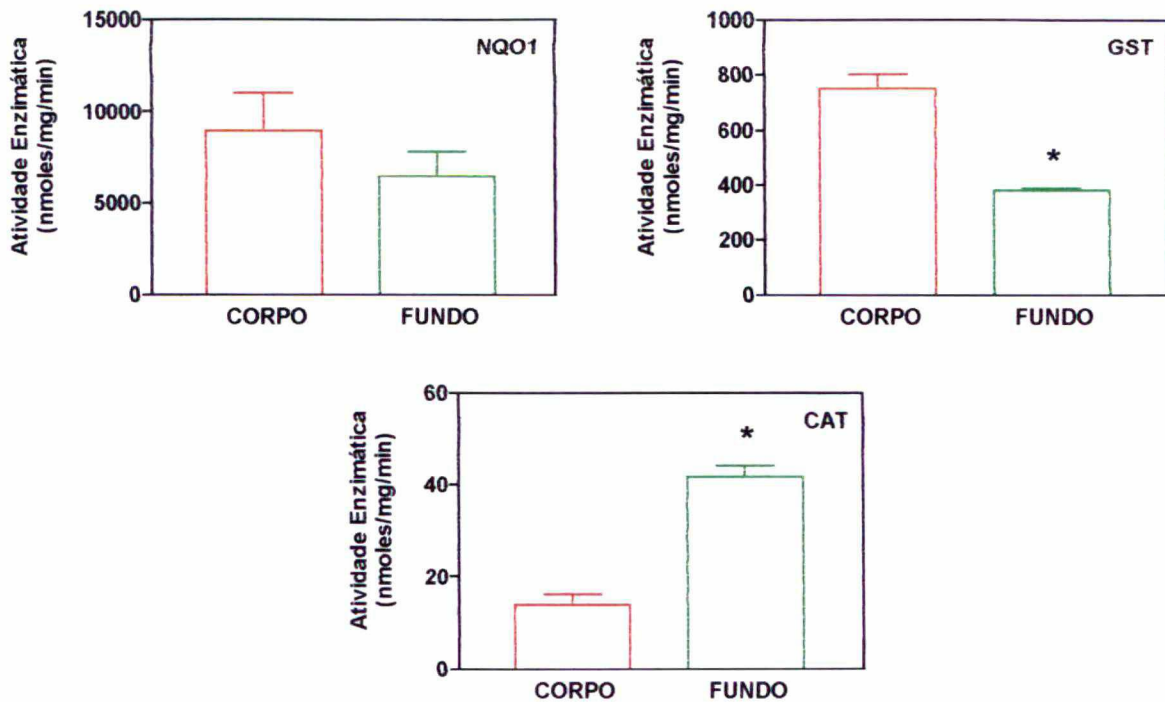


Figura 30: Atividades específicas das enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT no citosol do corpo e do fundo do estômago dos animais controles (C: água, 0,1 ml/100 g - vo) tratados cronicamente. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de determinações realizadas em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student. * Diferente do grupo corpo para $p < 0,05$.

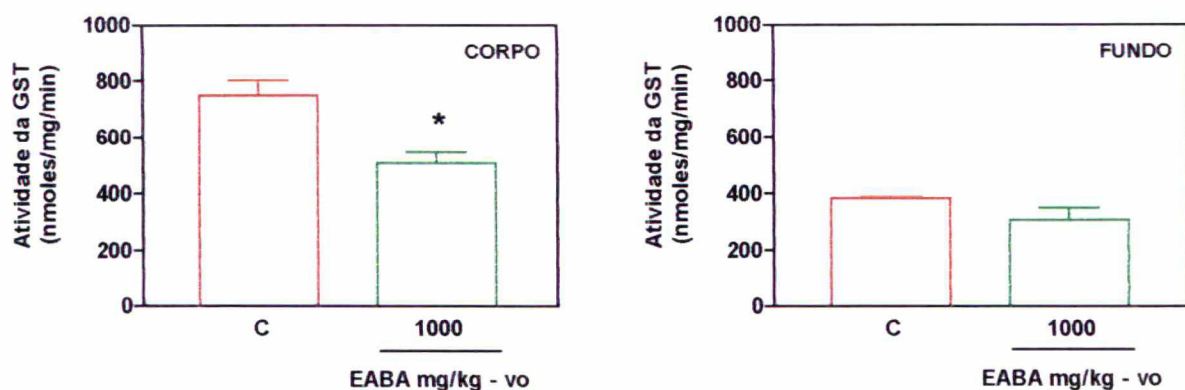


Figura 31: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA: 1000 mg/kg - vo) e do veículo (C: água, 0,1 ml/100 g - vo) sobre a atividade da enzima antioxidante GST presente no corpo e no fundo do estômago. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de determinações realizadas em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student. * Diferente do grupo controle para $p < 0,05$.

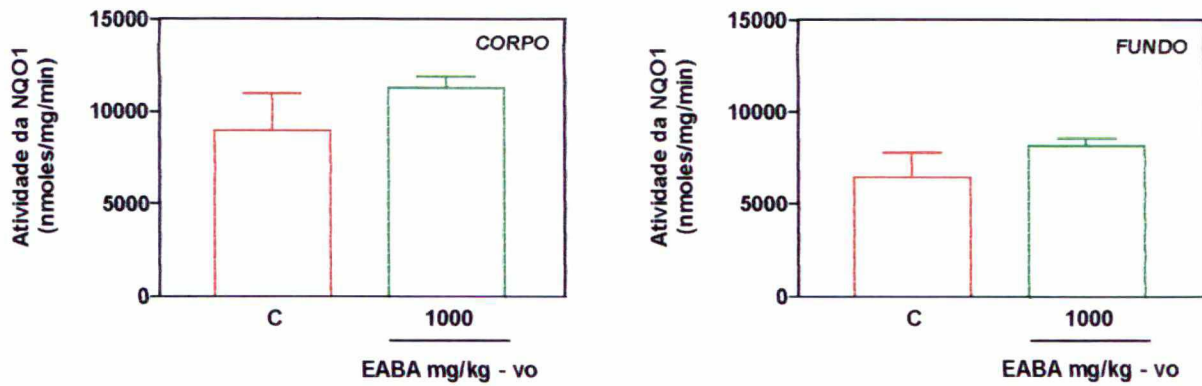


Figura 32: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA: 1000 mg/kg - vo) e do veículo (C: água, 0,1 ml/100 g - vo) sobre a atividade da enzima antioxidante NQO1 presente no corpo e no fundo do estômago. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de determinações realizadas em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student.

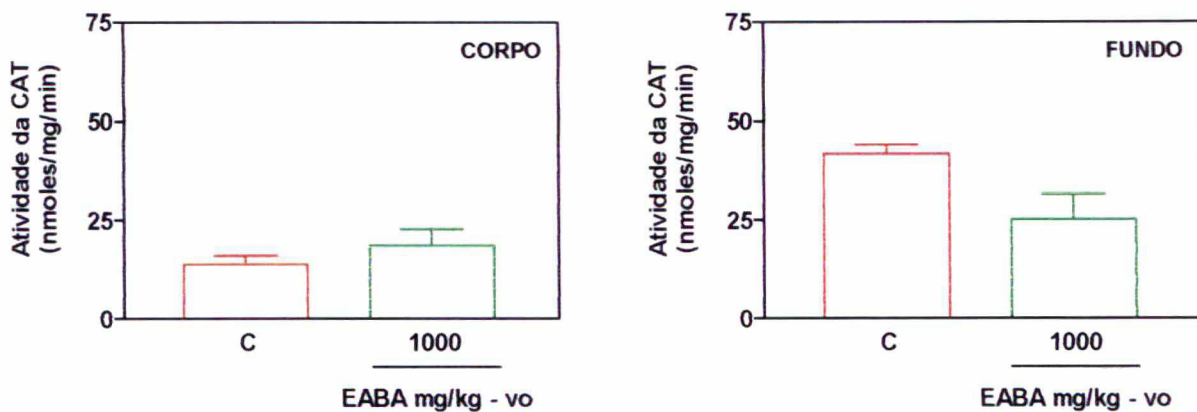


Figura 33: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA: 1000 mg/kg - vo) e do veículo (C: água, 0,1 ml/100 g - vo) sobre a atividade da enzima antioxidante CAT presente no corpo e no fundo do estômago. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias de determinações realizadas em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student.

5. DISCUSSÃO

Por mais de 3000 anos a *A. millefolium* é utilizada em vários continentes e diversas culturas como planta medicinal para o tratamento de numerosas afecções (CHANDLER, 1989; BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

A utilização da *A. millefolium* foi aprovada pela Comissão E alemã para a perda de apetite, indisposição gástrica, dor e cólicas menstruais (BLUMENTHAL *et al.*, 2000). Já o *British Herbal Compendium* lista o seu uso interno para condições febris, gripe e desconforto gastrointestinal; e como uso tópico para feridas e inflamação da pele (BRADLEY, 1992).

Em Curitiba, as flores da *A. millefolium* cultivadas e processadas na Fazenda Solidariedade da Fundação de Ação Social (FAS), órgão da Prefeitura de Curitiba, são distribuídas pelas Unidades de Saúde, sendo recomendada a utilização do seu chá para tratamento da cefaléia tensional, enxaqueca (coadjuvante), epistaxes, algias em geral, cólicas gastrointestinais, feridas abertas (uso tópico), úlcera de estase (tópico) e como emenagogo. Embora existam informações populares abundantes sobre a utilização das folhas da *A. millefolium* para o tratamento de distúrbios gástricos, estas folhas, cultivadas pela Fazenda Solidariedade, não são aproveitadas. Este fato despertou nosso interesse no estudo científico das ações farmacológicas das folhas da planta sobre o trato gastrointestinal. Os dados obtidos por SANSANA (1999) e NHADUCUE (2000) em nosso laboratório, com amostras da planta coletada em Campos Novos (PR) e em canteiro de plantio experimental não padronizado da Fazenda Solidariedade mostrou a atividade gastroprotetora da planta. O material botânico utilizado neste estudo foi obtido após cultivo, coleta, secagem e armazenamento com controle de qualidade em quantidade suficiente (60 kg da planta seca) para a realização dos ensaios de farmacologia e de caracterização química e fitoquímica a serem realizados na UFPR. A análise fitoquímica da planta, realizada pela Prof^a Dr^a Tomoe Nakashima no laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da UFPR, demonstrou a presença de taninos, glicosídeos antociânicos, aminogrupos, heterosídeos flavônicos e ácidos graxos. O rendimento do óleo essencial foi de 0,15% e apresentou coloração azul. Com este mesmo material botânico foram anteriormente realizados estudos de toxicologia pré-clínica por CAVÁLCANTI (2002) para determinar a segurança do seu uso pela população.

Para avaliarmos a efetividade do extrato bruto aquoso das folhas de *A. millefolium* (EABA) no tratamento de distúrbios gástricos, utilizamos técnicas experimentais *in vivo* e *in vitro* que permitem o estudo da atividade protetora gástrica e da atividade antissecretora ácida, assim como da motilidade gastrointestinal.

Para o estudo da atividade gastroprotetora da *A. millefolium*, utilizamos os modelos de indução de lesões gástricas agudas por estresse, por uma droga anti-inflamatória (indometacina) e por um agente necrotizante (etanol). A administração oral do EABA não protegeu a mucosa dos animais contra a formação de lesões gástricas induzidas pelo estresse por imobilização e frio. Este modelo tem sido utilizado para avaliar os papéis de várias estruturas anatômicas, neurotransmissores, hormônios e mudanças fisiológicas no processo ulcerogênico (OVERMIER & MURISON, 2000). A imobilização e o frio são responsáveis por alterações no Sistema Nervoso Central (SNC), causando hiperfuncionamento gástrico dependente do nervo vago e mediado pela liberação do hormônio liberador de tireotropina (TRH) (TAKEUCHI *et al.*, 1999;). A hiperfunção gástrica altera os níveis de bicarbonato da mucosa, a motilidade gástrica, o fluxo sanguíneo gástrico, a secreção ácida e os níveis de substâncias endógenas (prostaglandinas, glicocorticóides, catecolaminas e histamina), provocando a diminuição da vitalidade celular gástrica e de capilares, levando à necrose e ao desenvolvimento de úlceras (PACHALY *et al.*, 1993; OVERMIER & MURISON, 2000).

Nas lesões gástricas induzidas por indometacina, o EABA protegeu a mucosa somente com a dose maior. A inibição da ciclooxigenase pela indometacina, um anti-inflamatório não-esteroidal, promove a diminuição da produção de prostaglandinas, que são responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica através da inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco e bicarbonato, inibição da ativação de mastócitos, diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular, inibição da apoptose, aumento ou manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa e assim prevenindo a isquemia (ATAY *et al.*, 2000). O EABA, em doses altas, parece ter

influência sobre um ou mais fatores envolvidos na patologia da úlcera pela indometacina.

O pré-tratamento dos animais com o EABA também protegeu a mucosa gástrica dos animais contra o aparecimento de lesões induzidas pelo agente necrotizante, etanol 70% ($DI_{50} = 936 \text{ mg/kg - vo}$), indicando atividade citoprotetora do extrato. O etanol provoca uma diminuição da função da barreira muco-bicarbonato e do grupamento sulfidrílico não-protéico (GSH), estresse oxidativo, um aumento da permeabilidade epitelial e danos à mucosa principalmente devido aos danos vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (REPETTO & LLESUY, 2002; SIEGMUND *et al.*, 2003).

Na tentativa de determinar a participação de fatores protetores na proteção da mucosa gástrica contra o etanol, quantificamos a concentração de muco gástrico e grupos sulfidrílicos não-protéicos (GSH), dois fatores importantes de proteção da mucosa gástrica em animais com lesão gástrica induzida pelo etanol. Nesses experimentos, o etanol induziu lesões extensas na mucosa gástrica dos animais com diminuição dos grupos sulfidrílicos não-protéicos da mucosa, porém sem alteração dos níveis de muco da parede gástrica dos mesmos animais. A administração do EABA aos animais aumentou os níveis de GSH da mucosa gástrica reduzida pelo etanol. Normalmente, o GSH atua como um varredor de radicais livres e substâncias tóxicas ingeridas com a comida ou produzidas diretamente no TGI (SHIRIN *et al.*, 2001). Sob condições de estresse oxidativo, como no tratamento com etanol, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas pelo GSH com a concomitante formação de dissulfeto oxidado, GSSG. Além da sua ação como um antioxidante químico, o GSH também atua na primeira linha de defesa antioxidante como um cofator da glutatona peroxidase na redução de peróxidos que também resulta na formação de GSSG. Em circunstâncias fisiológicas normais, o GSSG é reduzido a GSH pela glutatona redutase às custas de NADPH (CNUBBEN *et al.*, 2001). O efeito gastroprotetor do extrato parece estar relacionado ao aumento da quantidade de GSH na mucosa gástrica, impedindo a ação lesiva dos radicais livres sobre as células.

A redução da secreção ácida gástrica também pode ser um mecanismo coadjuvante na proteção gástrica do EABA. Portanto, estudamos os efeitos do

extrato no modelo de hipersecreção ácida na ligadura pilórica *in vivo* e na atividade da H^+/K^+ -ATPase *in vitro*. Somente a maior dose do EABA (2000 mg/kg) administrada intraduodenalmente reduziu a secreção ácida gástrica dos animais com 4 horas de ligadura pilórica. A secreção gástrica é regulada principalmente pelos estimulantes diretos da célula parietal, acetilcolina, gastrina e histamina (HERSEY & SACHS, 1995). Na tentativa de esclarecer as vias envolvidas no efeito inibitório do EABA sobre a secreção ácida gástrica, realizamos a estimulação dos receptores muscarínicos com betanecol, dos receptores do tipo CCKB com pentagastrina e dos receptores H_2 com a histamina. Os resultados mostraram que o EABA reduziu a secreção estimulada pelo betanecol e pela histamina, sem alterar a secreção estimulada pela pentagastrina, sugerindo o envolvimento do bloqueio de receptores muscarínicos ou inibição da via do cálcio (SHAMBUREK & SCHUBERT, 1993), ou bloqueio dos receptores H_2 da membrana da célula parietal e inibição da via adenilil ciclase (LINDSTRÖM *et al.*, 2001). Estes resultados também podem ser explicados pela inativação do processo final comum a ambas vias que é a H^+/K^+ -ATPase (SHAMBUREK & SCHUBERT, 1993).

Demos continuidade aos estudos dos efeitos do EABA sobre a secreção ácida através da determinação *in vitro* dos efeitos do extrato e compostos puros na capacidade de hidrólise de ATP pela H^+/K^+ -ATPase. Para isto, isolamos a enzima da mucosa gástrica de cachorro. Para padronizarmos este modelo experimental em nosso laboratório, procedemos a caracterização da atividade enzimática em relação ao tempo, quantidade de proteína e substrato ATP. Assim, foram determinados os valores cinéticos da reação (K_m e $V_{máx.}$) dependente de ATP bem como o tempo (20 minutos) e a quantidade de proteína ótima para o ensaio (1 $\mu g/\mu l$). Além disso, determinamos a especificidade da atividade H^+/K^+ -ATPásica utilizando o omeprazol ($CI_{50} = 420 \mu M$), inibidor específico da H^+/K^+ -ATPase gástrica. Também confirmamos que a atividade enzimática da preparação é devida à presença desta única H^+/K^+ -ATPase e não a da Na^+/K^+ -ATPase gástrica como mostrado pela não inibição da atividade enzimática pela oubaina, inibidor específico da Na^+/K^+ -ATPase. Só então o efeito do EABA na atividade da H^+/K^+ -ATPase foi testada. Comprovou-se que o EABA inibiu a

atividade de hidrólise de ATP da H^+/K^+ -ATPase com $CI_{50} = 382 \mu\text{g/ml}$, indicando a inibição da bomba de prótons como um provável mecanismo da atividade antissecretora ácida do EABA. A bomba de prótons da célula parietal é uma importante enzima do passo final da secreção ácida no estômago e secreta ácido para o lúmen gástrico por catalisar uma troca eletroneutra de H^+ por K^+ às custas de ATP (LACAPÈRE *et al.*, 2000; ONO *et al.*, 2000).

Na tentativa de identificar quais os prováveis compostos responsáveis pela ação protetora gástrica, avaliamos a atividade de dois flavonóides, rutina e quercetina, e o óleo volátil presentes na *A. millefolium* no modelo de lesão gástrica induzida por etanol e no modelo de hipersecreção ácida induzida pela ligadura pilórica.

Os flavonóides são compostos polifenólicos e já foram descritos mais de 4000 flavonóides diferentes. Possuem uma variedade de efeitos biológicos em numerosos sistemas celulares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, já foi demonstrado que apresentam atividades antimicrobiana, antiviral, antiulcerogênica, citotóxica, antineoplásica, anti-inflamatória, antioxidante, antihepatotóxica, antihipertensiva, hipolipidêmica e antiplaquetária (GUARDIA *et al.*, 2001).

O pré-tratamento dos animais com a rutina (dose intermediária) reduziu o aparecimento de lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol. A administração da rutina não alterou a secreção ácida gástrica em ratos com ligadura pilórica, mas diminuiu a atividade da H^+/K^+ -ATPase *in vitro*. A rutina é conhecida por suas propriedades anti-inflamatória, vasoativa e antiulcerogênica. Existem relatos que a rutina é um importante agente anti-lipoperoxidante e também um forte seqüestrador de radicais hidroxil e superóxidos, os quais estão envolvidos na injúria tecidual (LA CASA *et al.*, 2000). A proteção da mucosa gástrica pela rutina, provavelmente, ocorreu devido aos seus mecanismos antioxidantes, descartando-se a redução da secreção como um dos fatores. Além disso, a rutina apresenta absorção lenta e precisa ser hidrolisada pela microbiota intestinal (SHIMOI *et al.*, 2003). Talvez estes tenham sido os motivos pelos quais seu efeito não tenha sido observado quando utilizamos a maior dose testada. Como nos testes *in vitro* não ocorre o metabolismo da droga, é observada a atividade da rutina sobre a bomba de prótons.

A administração da quercetina aos animais protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol. *In vitro*, a quercetina apresentou atividade inibitória sobre a H^+/K^+ -ATPase, mas não reduziu a secreção ácida gástrica *in vivo* nas doses testadas. A quercetina é derivada da rutina através da hidrólise pela glicosidase presente no trato gastrointestinal e apresenta atividade inibitória sobre a Na^+/K^+ -ATPase, proteína quinase C e tirosina quinase, além da atividade antioxidante (GUARDIA *et al.*, 2001; SHEN *et al.*, 2002). A quercetina também parece proteger a mucosa gástrica através de mecanismos antioxidantes.

Outro composto testado nos modelos de lesão gástrica por etanol e secreção ácida gástrica foi o óleo volátil das folhas da *A. millefolium*. O óleo reduziu levemente as lesões gástricas somente com a dose intermediária e não alterou a secreção ácida gástrica com nenhuma das doses. Já foi demonstrado que o óleo apresenta ação fungistática e antibacteriana, atividade anti-inflamatória e antioxidante (KEDZIA *et al.*, 1990; POPOVICI *et al.*, 1990; DELLA LOGGIA *et al.*, 1992; CANDAN *et al.*, 2003), sugerimos que a proteção gástrica observada com o óleo seja devido a sua atividade antioxidante mas esses ensaios precisam ser realizados.

Para avaliarmos o efeito do EABA sobre a atividade de enzimas antioxidantes da mucosa gástrica, como a NAD(P)H quinona oxidoreductase (NQO1), a glutathione S-transferase (GST) e a catalase (CAT), quantificamos a atividade destas enzimas após a indução de lesões gástricas por etanol (GST e NQO1) e após o tratamento subcrônico com o EABA (GST, NQO1 e CAT).

A NQO1 é responsável pela redução de quinonas endógenas e exógenas formando hidroquinonas, que auxiliam na proteção da membrana celular contra os danos oxidativos (ROSS *et al.*, 2000). Já a GST catalisa a conjugação de compostos eletrofílicos ao GSH (CNUBBEN *et al.*, 2001). O GSH é o maior seqüestrador de radicais livres de baixo peso molecular no citoplasma e um importante inibidor de radicais livres produzidos pela peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1995). Na avaliação do efeito do EABA sobre a atividade das enzimas antioxidantes após a indução das lesões, observamos que o mesmo não alterou a atividade da NQO1, mas que diminuiu a atividade da GST (32%). Os resultados sugerem que no efeito protetor gástrico do EABA não existe o

envolvimento do aumento da atividade da NQO1. O efeito sobre a atividade da GST precisa ser melhor estudado.

Para melhor avaliar a capacidade antioxidante do EABA, estudamos seus efeitos nas enzimas antioxidantes após o tratamento subcrônico (7 dias) com o extrato. Na padronização dos ensaios de enzima antioxidante verificamos que a atividade específica das enzimas foi diferente. A NQO1 foi a enzima com maior atividade específica tanto no corpo como no fundo. A atividade específica da GST foi menor do que a da NQO1, mas maior do que a da catalase (CAT) em ambas as partes do estômago. As atividades específicas da NQO1 e GST foram maiores no corpo que no fundo, no entanto, observou-se maior atividade da CAT no fundo do que no corpo. Estes resultados indicam que a NQO1 é uma das enzimas antioxidantes mais importantes no estômago e que a CAT é a mais importante no fundo do estômago. Nos experimentos de tratamento subcrônico com o EABA, verificamos que este não alterou as atividades específicas da NQO1 e CAT em nenhuma das regiões do estômago. A inesperada redução da atividade da GST gástrica e a não alteração das outras enzimas antioxidantes, indicaria que o EABA não possui atividade antioxidante através destes mecanismos. Não podemos ainda dizer que o extrato não possui atividade antioxidante porque outros sistemas antioxidativos (mediadas ou não por enzimas) não foram estudados. O efeito do EABA reduzindo a atividade da GST, ainda que de forma moderada, implicaria em um efeito que merece ser melhor estudado.

A avaliação dos efeitos do EABA sobre a motilidade gastrointestinal, foi realizada utilizando-se o modelo de esvaziamento gástrico de líquidos em ratos, o de trânsito intestinal em camundongos e o modelo de diarreia induzida pelo óleo de rícino em camundongos.

Nos modelos de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal, o EABA não mostrou atividade importante indicando que não há envolvimento do tônus muscular na atividade antissecretora ácida ou na atividade antiúlcera do extrato da *A. millefolium*.

O óleo de rícino é extraído das sementes da *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) e utilizado na medicina popular como unguento para tratar feridas dérmicas e como laxativo. O ácido ricinoléico (AR) é o principal

componente químico e o responsável pela ação laxativa do óleo (VIEIRA *et al.*, 2001). O AR reduz a absorção de líquido e eletrólitos e estimula o peristaltismo intestinal (BRUNTON, 1996).

O modelo experimental de diarreia induzida pelo óleo de rícino foi padronizado através da determinação do tempo de defecação do primeiro sólido, o tempo de indução da diarreia, o número de episódios líquidos e sólidos e o peso total dos episódios. Foram avaliados volumes diferentes do óleo de rícino e o tempo ideal de observação dos animais. O volume escolhido para ser administrado foi um volume intermediário, que apresentou parâmetros mais uniformes. Como o número de episódios diarreicos foi mais freqüente no período de 1 hora e 15 minutos, este tempo foi escolhido para as observações. A administração do EABA aos animais não alterou o tempo de indução da diarreia nem o número de episódios líquidos. O extrato não interfere na homeostasia gastrointestinal, pois não evita a perda de água e eletrólitos induzida pelo óleo de rícino.

Coletivamente nossos resultados indicam uma ação protetora gástrica do EABA contra lesões induzidas pelo etanol, com participação importante de grupos sulfidrílicos não-protéicos e com pequeno envolvimento da redução da secreção ácida gástrica, já que o extrato não foi tão eficiente nessa atividade. A quercetina pode ser uma das responsáveis pela ação protetora gástrica contra lesões induzidas pelo etanol e no mecanismo antissecretor ácido parece existir o envolvimento da inibição da H^+/K^+ -ATPase.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos resultados permitem sugerir que o EABA possui ação gastroprotetora contra lesões induzidas pelo etanol. O mecanismo pelo qual esse efeito é produzido, provavelmente envolve a ativação de mecanismos citoprotetores como os grupos sulfidrílicos não-protéicos e a inibição da secreção ácida gástrica.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

ABDEL-SALAM, O. M. E.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J. & MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology - Paris**, v. 95, p. 105-127, 2001.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K. & OKABE, S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 98, p. 109-127, 2003.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**. Buenos Aires: Isis, 1998. p. 725-729.

ATHMANN, C.; ZENG, N.; SCOTT, D. R. & SACHS, G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. **American Journal of Physiology (Gastrointestinal and Liver Physiology)**, v. 279, p. G1048-G1058, 2000.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S. & DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & other Lipids Mediators**, v. 61, p. 105-124, 2000.

A.VOGEL. Disponível em < www.avogel.be > Acesso em 09 jan. 2004.

AWOUTERS, F.; NIEMEGEREERS, C. J.; LENAERTS, F. M. & JANSSEN, P. A. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 30, n. 1, p. 41-45, 1978.

AZERKAN, L.; BENGTSSON, P.; TØMMERÅS, K.; LI, Z. Q. & MÅRDH, S. Characterization of oxyntic glands isolated from the rat gastric mucosa. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 128, p. 349-357, 2001.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; NHADUCUE, P. F.; RIECK, L. & MARQUES, M. C. A. Action of crude aqueous extract of leaves of *Achillea millefolium* L. (Compositae) on gastrointestinal tract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 31-33, 2002.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L. & MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 93-98, 2003.

BANH-NHU, C.; GÁCS-BAITZ, E.; RADICS, L.; TAMÁS, J.; UJSZÁSZY, K. & VERZÁR-PETRI, G. Achillicin, the first proazulene from *Achillea millefolium*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 331-332, 1979.

BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A.; DURANT, C. J.; GANELLIN, C. R. & PARSONS, E. M. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. **Nature**, v. 236, p. 385-390, 1972.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A. & BRINCKMANN, J. **The complete german commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines.** Boston: Integrative Medicine Communications, 2000. p. 419-421.

BÓDIS, B.; NÉMETH, P. & MÓZSIK, G. Cytoprotection or organoprotection? In: **Organoprotection and cytoprotection in the stomach.** Budapest: Akadémiai Kiadó, 1998.

BRADLEY, P. R. (ed.). **British herbal compendium.** v. 1. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 1992. p. 190-191.

BRIMBLECOMBE, R. W.; DUNCAN, W. A. M.; DURANT, D. J.; GANELLIN, C. R. & PARSONS, E. M. Cimetidine, a non-thiourea H₂-receptors. **J. Int. Med. Res.**, v. 3, p. 86-92, 1975.

BRUNTON, L. L. Fármacos que afetam a motilidade e o fluxo de água gastrintestinais; êmese e antieméticos; ácidos biliares e enzimas pancreáticas. In: HARDMAN, J. G. e LIMBIRD, L. E. **Goodman & gilman as bases farmacológicas da terapêutica.** 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996.

CÁCERES, A. **Plantas de uso medicinal en Guatemala.** Guatemala: Ed. Universitária, 1999. p. 268-270.

CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A. & AKPULAT, H. A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215-220, 2003.

CAVALCANTI, A. M. **Determinação da toxicidade pré-clínica do extrato aquoso bruto das partes aéreas isentas de inflorescências de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) em ratos.** Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CHANDLER, R. F. **Herbal medicine: yarrow.** Janvier, 1989.

CHANDLER, R. F.; HOOPER, S. N.; HOOPER, D. L.; JAMIESON, W. D.; FLINN, C. G. & SAFE, L. M. Herbal remedies of the maritime indians: sterols and triterpenes of *Achillea millefolium* L. (yarrow). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 6, p. 690-693, 1982.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide on gastrointestinal disorders. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, p. 253-256, 2001.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; van ZANDEN, J. & van BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 141-152, 2001.

CORFIELD, A. P.; CARROLL, D.; MYERSCOUGH, N. & PROBERT, C. S. J. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 1321-1357, 2001.

CORNE, S. J.; MORRISEY, S. M. & WOODS, R. J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol. Lond.**, v. 224, p. 116-117P, 1974.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S. & QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 4. ed. Petrópolis: Vozes, 2001. p. 164-165.

CORRÊA JR, C.; MING, L. C. & SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162 p.

CORUZZI, G.; ADAMI, M.; MORINI, G.; POZZOLI, C.; CENA, C.; BERTINARIA, M. & GASCO, A. Antisecretory and gastroprotective activities of compounds endowed with H₂ antagonistic and nitric oxide (NO) donor properties. **Journal of Physiology-Paris**, v. 94, n. 1, p. 5-10, 2000.

COWEN, D. L. & HELFAND, W. H. **Pharmacy: an illustrated history**. Korea: Harry N. Abrams, 1990. 272 p.

CUONG, B. N.; GÁCZ-BAITZ, E.; RADICS, L.; TAMÁS, J.; UJSZÁSZY, K. & VERZÁR-PETRI, G. Achillicin, the first proazulene from *Achillea millefolium*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 331-332, 1979.

DELLA LOGGIA, R. Anti-inflammatory principles from *Achillea asplenifolia* and *Achillea pratensis*. **Planta Medica**, v. 58, supp. 1, p. A641-A642, 1992.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, p. 265, 1969.

DOMER, F. R. Animal experiments in pharmacological analysis. Charles C. Thomas Publisher, 1971, 669p.

EL-DAKHAKHNY, M.; BARAKAT, M.; EL-HALIM, M. A. & ALY, S. M. Effects of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 299-304, 2000.

ELLIOTT, S. N.; WALLACE, J. L.; McKNIGHT, W.; GALL, D. G.; HARDIN, J. A.; OLSON, M. & BURET, A. Bacterial colonization and healing of gastric ulcers: the effects of epidermal growth factor. **American Journal of Physiology (Gastrointestinal and Liver Physiology)**, v. 278, p. G105-G112, 2000.

FALK, A. J.; SMOLENSKI, S. J.; BAUER, L. & BELL, C. L. Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 11, p. 1838-1842, 1975.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. e SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2000.

FATTMAN, C. L.; SCHAEFER, L. M. & OCRY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 3, p. 236-256, 2003.

FELLENIUS, E.; BERGLINDH, T.; SACHS, G.; OLBE, L.; ELANDER, B.; SJOSTRAND, S. E. & WALLMARK, B. Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H⁺-K⁺)ATPase. **Nature**, v. 290, p. 159-161, 1981.

FISKE, C. H. & SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FLEMSTRÖM, G. & ISENBERG, J. I. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection. **News Physiol. Sci.**, v. 16, p. 23-28, 2001.

FORSTNER, J. F. & FORSTNER, G. G. Gastrointestinal mucus. In: JOHNSON, L. R. **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3. ed., New York: Raven Press, v. 2., 1994, p. 1255-1283.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; RIECK, L.; DE MORAES SANTOS, C. A.; CORRÊA JR., C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G. & MARQUES, M. C. A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, p. 1167-1179, 2004.

GADGOLI, C. & MISHRA, S. H. Preliminary screening of *Achillea millefolium*, *Cichorium intybus* and *Capparis spinosa* for antihepatotoxic activity. **Fitoterapia**, v. 66, n. 4, p. 319-323, 1995.

GLASL, S.; KASTNER, U.; JURENITSCH, J. & KUBELKA, W. Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids in *Achillea* species by reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 729, p. 361-368, 1999.

GLASL, S.; MUCAJI, P.; WERNER, I.; PRESSER, A. & JURENITSCH, J. Sesquiterpenes and flavonoid aglycones from a hungarian taxon of the *Achillea millefolium* group. **Z. Naturforsch.**, v. 57, p. 976-982, 2002.

GOEL, R. K. & BHATTACHARYA, S. K. Gastroduodenal mucosal defence and mucosal protective agents. **Indian. J. Exp. Biol.**, v. 29, p. 701-714, 1991.

GOLDBERG, A. S.; MUELLER, E. C.; EIGEN, E. & DESALVA, S. J. Isolation of the anti-inflammatory principles from *Achillea millefolium* (Compositae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 8, p. 938-941, 1969.

GRANGER, D. L.; HIBBS, J. B.; PERFECT, J. R. & DURACK, D. T. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 264-273, 1990.

GRITTI, I.; BANFI, G. & ROI, G. S. Pepsinogens: physiology, pharmacology, pathophysiology and exercise. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 3, p.265-281, 2000.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O. & PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Farmaco**, v. 56, p. 683-687, 2001.

GUÉDON, D.; ABBE, P. & LAMAISON, J. L. Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. subspecies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 5, p. 607-611, 1993.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p. 715-743.

HABIG, W. H.; PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HAGGAC, M. Y.; SHALABY, S. & VERZAR-PETRI, G. Thin layer and gas-chromatographic studies on the essential oil from *Achillea millefolium*. **Planta Medica**, v. 27, p. 361-366, 1975.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

HAMEL, P. B. & CHILTOSKEY, M. U. **Cherokee plants**. Sylva, N.C.: Herald Publishing, 1975. 62 p.

HAWKINS, C. & HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 20, n. 2, p. 140-151, 2000.

HERRICK, J. W. Iroquois medical botany. MI: University Microfilms International, 1977. 470 p.

HERSEY, S. J. & SACHS, G. Gastric acid secretion. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 155-189, 1995.

HIRSCHOWITZ, B. I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K.; WALLMARK, B. & SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 40, n. 2 suppl.; p. 3S-23S, 1995.

HOFMANN, L.; FRITZ, D.; NITZ, S.; KOLLMANNBERGER, H. & DRAWERT, F. Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* 'complex'. **Phytochemistry**, v. 31, n. 2, p. 537-542, 1992.

HOLZER, P.; LIVINGSTON, E. H. & GUTH, P. H. Neural, metabolic, physical, and endothelial factors in the regulation of the gastric circulation. In: JOHNSON, L. R. **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3. ed. New York: Raven Press, v. 2, 1994, p. 1311-1329.

HOOGERWERF, W.A. & PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: HARDMAN, J. G. e LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

JAISWAL, A. K.; McBRIDE, O. W.; ADESNIK, M. & NEBERT, D. W. Human dioxin inducible cytosolic NADP(H): menadione oxidoreductase. CDNA sequence and localization of gene to chromosome. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 13572-13578, 1988.

KEDZIA, B.; KRZYZANIAK, M. & HOLDERNA, E. Effect of yarrow essential oil (*Ol. Millefolli*) and its components on pathogenic microorganisms. **Herba Polonica**, v. 36, n. 3, p. 117-125, 1990.

KÖHLER, F.E. **Köhler's Medizinal-Pflanzen**. v. 1. Gera: Untermhaus, 1887. Disponível em < www.mobot.org > Acesso em 09 jan. 2004.

KOKKALOU, E.; KOKKINI, S. & HANLIDOU, E. Volatile constituents of *Achillea millefolium* in relation to their intraspecific variation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 7, p. 665-670, 1992.

KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K. & MURAYAMA, T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. **European Journal of Pharmacology**, v. 452, p. 235-243, 2002.

KONTUREK, S. J. & DOMSCHKE, W. *Helicobacter pylori* and gastric acid secretion. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 37, n. 2., p. 187-199, 1999.

KONTUREK, J. W.; FISCHER, H.; GROMOTKA, P. M.; KONTUREK, S. J. & DOMSCHKE, W. Endogenous nitric oxide in the regulation of gastric secretory and motor activity in humans. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, n. 12, p. 1683-1691, 1999.

KONTUREK, S. J. & KONTUREK, P. C. Role of nitric oxide in the digestive system. **Digestion**, v. 56, p. 1-13, 1995.

KUBO, K.; UEHARA, A.; KUBOTA, T.; NOZU, T.; MORIYA, M.; WATANABE, Y.; SHOJI, E.; SANTOS, S. B.; HARADA, K. & KOHGO, Y. Effects of ranitidine on gastric vesicles containing H⁺/K⁺-adenosine triphosphatase in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, p. 944-951, 1995.

KUBELKA, W.; KASTNER, U.; GLASL, S.; SAUKEL, J. & JURENITSCH, J. Chemotaxonomic relevance of sesquiterpenes within the *Achillea millefolium* group. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 437-444, 1999.

KUTCHAI, H. C. Secreções gastrintestinais. In: BERNE, R. M. & LEWI, M. N. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996.

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.

LACAPÈRE, J. J.; ROBERT, J. C. & THOMAS-SOUMARMON, A. Efficient solubilization and purification of the gastric H⁺,K⁺-ATPase for functional and structural studies. **Biochem. J.**, v. 345, p. 239-245, 2000.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V. & CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 45-53, 2000.

LANGMEAD, L. & RAMPTON, D. S. Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease – benefits and dangers. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 15, p. 1239-1252, 2001.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O. & LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2000.

LINDSTRÖM, E.; CHEN, D.; NORLÉN, P.; ANDERSSON, K. & HÅKANSON, R. Control of gastric acid secretion: the gastrin-ECL cell-parietal cell axis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 128, p. 505-514, 2001.

LINDSTRÖM, E. & HÅKANSON, R. Neurohormonal regulation of secretion from isolated rat stomach ECL cells: a critical reappraisal. **Regulatory Peptides**, v. 97, p. 169-180, 2001.

LOURENÇO, P. M. L.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; OLIVEIRA, M. M.; DEANS, S. G. & SCHEFFER, J. J. C. Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 637-642, 1999.

MAHADY, G. B. Global harmonization of herbal health claims. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1120S-1123S, 2001.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MEHLFÜHRER, M.; TROLL, K.; JURENITSCH, J.; AUER, H. e KUBELKA, W. Betaines and free proline within the *Achillea millefolium* group. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1067-1069, 1997.

MESIA, S. V. **Mecanismos das ações anti-secretora ácida e antiúlcera gástrica de princípios isolados do gervão-roxo (*Starchytarpheta cayennensis* Vahl)**. São Paulo, 1998. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Setor de Produtos Naturais, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O. & REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 17, n. 3, p. 235-248, 1994.

MILANI, S. & CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 360-371, 2001.

MILLER, F. M. & CHOW, L. M. Alkaloids of *Achillea millefolium* L. I. Isolation and characterization of achilleine. **Journal of American Chemical Society**, v. 76, p. 1353-1354, 1954.

MOCKUTE, D. & JUDZENTIENE, A. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1033-1045, 2003.

MOJŽIŠ, J.; HEGEDÜŠOVÁ, R. & MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Physiol. Res.**, v. 49, p. 441-446, 2000.

MURAKAMI, S.; ARAI, I.; MURAMATSU, M.; OTOMOS, S.; BABA, K.; KIDO, T. & KOZAWA, M. Inhibition of gastric H⁺/K⁺-ATPase and acid secretion by cassigarol A: a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 33-37, 1992.

NEGRI, G. **Erbario figurato: descrizione e proprietà delle piante medicinali e velenose della flora italiana**. 5. ed. Milano: Ulrico Hoepli, 1979.

NHADUCUE, P. F. **Estudo das ações farmacológicas do extrato bruto das folhas da *Achillea millefolium*, L. (Compostas) sobre o trato gastrointestinal de ratos.** Curitiba, 2000. Monografia (Especialização em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOOR, R.; MITTAL, S. & IQBAL, J. Superoxide dismutase – applications and relevance to human diseases. **Med. Sci. Monit.**, v. 8, n. 9, p. RA210-RA215, 2002.

OGATA, T. & YAMASAKI, Y. Morphological studies on the translocation of tubulovesicular system toward the intracellular canaliculus during stimulation of the gastric parietal cell. **Microsc. Resear. Techn.**, v. 48, n. 5, p. 282-292, 2000.

OGURI, S. & YONEYA, Y. Assay and biological relevance of endogenous histamine and its metabolites: application of microseparation techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 781, p. 165-179, 2002.

OKA, C. **Herbário de plantas medicinais.** Estufa de mudas em Caucaia do Alto-Cotia-São Paulo, 1998.

ONO, K.; SAWADA, T.; MURATA, Y.; SAITO, E.; IWASAKI, E.; ARAKAWA, Y.; KUROKAWA, K. & HASHIMOTO, Y. Pentagalloylglucose, an antisecretory component of *Paeoniae radix*, inhibits gastric H⁺/K⁺-ATPase. **Clinica Chimica Acta**, v. 290, n. 2, p. 159-167, 2000.

OVERMIER, J. B. & MURISON, R. Anxiety and helplessness in the face of stress predisposes, precipitates, and sustains gastric ulceration. **Behavioural Brain Research**, v. 110, p. 161-174, 2000.

PACHALY, J. R.; WERNER, P. R.; SCHIMANSKI, J. C. & CIFFONI, E. M. G. Estresse por captura e contenção em animais selvagens. **A Hora Veterinária**, v. 74, p. 47-52, 1993.

PACIORNIK, E. F. **Plantas medicinais do município de Curitiba, Paraná. Família Asteraceae Dumortier.** Curitiba, 1989. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PERERA, L. M. S.; RUEDAS, D. & GÓMEZ, B. C. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 1-3, 2001.

PESKAR, B. M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, p. 3-9, 2001.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: IBDF, 1979. v. IV.

POPOVICI, A.; PETER, M. & CSEDO, C. Investigations regarding the antimycotic action of volatile oil from *Achillea millefolium*. **Rev. Med. (Tirgu-Mures)**, v. 16, n. 3-4, p. 384-389, 1970.

RANG, H. P.; DALE, M. M. & RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RASTOGI, L.; PATNAIK, G. K. & DIKSHIT, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacological Research**, v. 38, n. 2, p. 125-132, 1998.

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.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C. & HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

RODRÍGUEZ-TÉLLEZ, M.; ARGÜELLES, F.; HERRERÍAS, J. M. Jr.; LEDRO, D.; ESTEBAN, J. & HERRERÍAS, J. M. Antiinflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 951-976, 2001.

ROSS, D.; KEPA, J. K.; WINSKI, S. L.; BEALL, H. D.; ANWAR, A. & SIEGEL, D. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 77-97, 2000.

SANIOTO, D. L. & AIRES, M. M. Sistema digestivo: secreção e digestão. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SANSANA, A. C. R. L. **Estudos das ações do extrato aquoso bruto das folhas de *Achillea millefolium*, L. (Compostas) sobre o trato gastrointestinal - Investigação da possível ação antiulcerogênica em ratos**. Curitiba, 1999. Monografia (Especialização em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCARPIGNATO, S.; CAPOVILLA, T. & BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 246, p. 286-294, 1980.

SEDLAK, J. & LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1988.

SENAY, S. E. & LEVINE, R. J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcer in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 124, p. 1221-1223, 1967.

SHAMBUREK, R. D. & SCHUBERT, M. L. Pharmacology of gastric acid inhibition. **Baillieres Clin. Gastroenterol.**, v. 7, n. 1, p. 23-24, 1993.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M. & SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHEN, S. C.; LEE, W. R.; LIN, H. Y.; HUANG, H. C.; KO, C. H.; YANG, L. L. & CHEN, Y. C. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lypopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production. **European Journal of Pharmacology**, v. 446, p. 187-194, 2002.

SHIMOI, K.; YOSHIKUNI, K.; KIDO, T.; USUI, Y. & YUMOTO, T. Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin, and α G-rutin, a water soluble flavonoid, in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2785-2789, 2003.

SHIRIN, H.; PINTO, J. T.; LIU, L. U.; MERZIANU, M.; SORDILLO, E. M. & MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* decreases gastric mucosal glutathione. **Cancer Letters**, v. 164, p. 127-133, 2001.

SHORROCK, C. J. & REES, W. D. Overview of gastroduodenal mucosal protection. **Am. J. Med.**, v. 84, n. 2A, p. 25-34, 1988.

SIEGMUND, S. Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 4, p. 519-542, 2003.

SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; DA SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S. & CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.

STICKNEY, J. C. & NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. **Exp. Biol. Med.**, v. 101, p. 582, 1959.

SZABO, S. & BYNUM, T. E. Alternatives to the acid-oriented approach to ulcer disease: does 'cytoprotection' exist in man? A new classification of antiulcer agents. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 23, n. 1, p. 1-6, 1988.

SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 13, p. 21S-34S, 1991.

SZABO, S. & VINCZE, Á. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **Journal of Physiology**, v. 94, p. 77-81, 2000.

TAKASE, H.; YAMAMOTO, K.; HIRANO, H.; SAITO, Y. & YAMASHITA, A. Pharmacological profile of gastric mucosal protection by marmim and nobiletin from a traditional herbal medicine, *Aurantii fructus immaratus*. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 66, n. 1, p.139-147, 1994.

TAKEUCHI, K.; SUZUKI, K.; ARAKI, H.; MIZOGUCHI, H.; SUGAMOTO, S. & UMDEDA, M. Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress. **J. Physiol. (Paris)**, v. 93, p. 423-431, 1999.

TANTAQUIDGEON, G. Folk medicine of the Delaware and related algonkian indians. **Pennsylvania Hist. and Mus. Comission Anth. Papers**, v. 3., n. 75., 1972. 128 p.

TERAPIA FLORAL, 2001. Disponível em < www.rsmo.hpg.ig.com.br > Acesso em 13 jun. 2002.

TERSARIOL, I. Bases moleculares da atividade hemorrágica da heparina. Envolvimento do sistema contrátil celular no controle da hemostasia primária. São Paulo, 1989. Dissertação (Mestre), Escola Paulista de Medicina.

THORWALD, J. **O segredo dos médicos antigos**. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 318 p.

TORRES, J. M. & CHÁVEZ, A. G. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva** v. 20, p. 377-387, 2001.

TOZYO, T.; YOSHIMURA, Y.; SAKURAI, K.; UCHIDA, N.; TAKEDA, Y.; NAKAI, H. & ISHII, H. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 42, n. 5, p. 1096-1100, 1994.

UCHIDA, M.; MATSUEDA, K; SHODA, R.; MURAOKA, A. & YAMATO, S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 85, p. 133-138, 2001.

VALANT-VETSCHERA, K. M. & WOLLENWEBER, E. Leaf flavonoids of the *Achillea millefolium* group part II: distribution patterns of free aglycones in leaf exudates. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 7/8, p. 605-614, 1988.

VERZÁR-PETRI, G. & CUCONG, B. N. On the quantitative determination of chamazulene and pro-chamazulenes in essential oils and crude drugs from yarrow (*Achillea* sp – Compositae). **Sci. Pharm.**, v. 45, p. 25-39, 1977.

VIEIRA, C.; FETZER, S.; SAUER, S. K.; EVANGELISTA, S.; AVERBECK, B.; KRESS, M.; REECH, P. W.; CIRILLO, R.; LIPPI, A.; MAGGI, C. A. & MANZINI, S. Pro- and anti-inflammatory actions of ricinoleic acid: similarities and differences with capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 364, p. 87-95, 2001.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **The American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1, p. S19-S23, 2001.

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, n. 5, p. 691-703, 2001.

WALLACE, J. L. & GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **Faseb Journal**, v. 10, p. 731-740, 1996.

W3TROPICOS Database, Missouri Botanical Garden. Disponível em < www.mobot.org > Acesso em 09 jan. 2004.

YATSKIEVYCH, G. The Missouri Flora Website. Disponível em < www.missouriplants.com > Acesso em 09 jan. 2004.

YESILADA, E.; TAKAISHI, Y.; FUJITA, T. & SEZIK, E. Anti-ulcerogenic effects of *Spartium junceum* flowers on in vivo test models in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, p. 219-226, 2000.

ANEXO

Tabela 2: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por estresse (imobilização a 4 °C) em ratas.

Tratamentos	Índice de Lesões	Índice de Úlceras	Índice Total
CL (água: 0,1 ml/100 g)	8,8 ± 0,5	24,0 ± 5,5	32,8 ± 5,2
EABA (125 mg/kg)	6,4 ± 0,5 *	12,6 ± 2,6	19,0 ± 2,9
EABA (1500 mg/kg)	5,6 ± 0,3 *	14,6 ± 3,9	20,2 ± 4,0
EABA (2000 mg/kg)	5,3 ± 0,3 *	17,7 ± 3,8	23,0 ± 3,8
Ranitidina (60 mg/kg)	5,1 ± 0,3 *	5,3 ± 2,2 *	10,4 ± 2,2 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 3: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por indometacina (20 mg/kg - sc) em ratas.

Tratamentos	Índice de Lesões	Índice de Úlceras	Índice Total
CL (água: 0,1 ml/100 g)	7,8 ± 0,4	105,7 ± 9,2	113,6 ± 9,3
EABA (125 mg/kg)	6,3 ± 0,3	85,0 ± 7,8	91,3 ± 8,0
EABA (1500 mg/kg)	8,5 ± 0,3	83,1 ± 6,7	91,6 ± 6,9
EABA (2000 mg/kg)	6,3 ± 0,8	51,2 ± 8,4 *	57,5 ± 9,0 *
Ranitidina (60 mg/kg)	6,0 ± 0,3 *	4,3 ± 1,5 *	9,3 ± 2,2 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 4: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.

Tratamentos	Índice de Lesões	Índice de Úlceras	Índice Total
CL (água: 0,1 ml/100 g)	9,4 ± 0,4	103,2 ± 6,8	112,6 ± 7,0
EABA (125 mg/kg)	7,8 ± 0,7	70,2 ± 15,3 *	78,0 ± 16,0 *
EABA (1500 mg/kg)	8,2 ± 0,4	15,7 ± 5,3 *	23,8 ± 5,6 *
EABA (2000 mg/kg)	6,5 ± 0,3 *	9,3 ± 4,2 *	15,8 ± 4,3 *
Ranitidina (60 mg/kg)	7,0 ± 0,3 *	40,9 ± 4,8 *	47,9 ± 4,7 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 5: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas de *A. millefolium* (EABA) sobre a quantidade de muco gástrico e a concentração dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (GSH), em ratas.

Tratamentos	Muco	GSH
	(µg de Alcian Blue/ml/g de tecido)	(µg de GSH/ml/g de tecido)
NL (água: 0,1 ml/100 g)	93,4 ± 6,1	92,1 ± 3,4
CL (água: 0,1 ml/100 g)	77,0 ± 5,6	56,4 ± 4,3 ^φ
EABA (125 mg/kg)	76,2 ± 5,2	56,9 ± 5,8 ^φ
EABA (1500 mg/kg)	73,5 ± 7,6	82,1 ± 4,6
EABA (2000 mg/kg)	112,1 ± 6,1 *	96,5 ± 9,5 *
Ranitidina (60 mg/kg)	85,3 ± 4,6	75,3 ± 4,2

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni (p < 0,05).

* Diferente do grupo controle lesado.

^φ Diferente do grupo não lesionado.

Tabela 6: Efeito da rutina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.

Tratamentos	Índice de Lesões	Índice de Úlceras	Índice Total
CL (água: 0,1 ml/100 g)	10,6 ± 0,2	92,0 ± 8,0	102,5 ± 8,3
Rutina (50 mg/kg)	9,2 ± 0,4	59,9 ± 8,3	69,1 ± 8,5
Rutina (100 mg/kg)	8,5 ± 0,2 *	43,4 ± 6,8 *	51,9 ± 6,9 *
Rutina (200 mg/kg)	9,3 ± 0,6	71,3 ± 10,5	80,9 ± 10,9
Ranitidina (60 mg/kg)	8,6 ± 0,5 *	57,0 ± 2,6	66,0 ± 2,8

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 7: Efeito da quercetina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.

Tratamentos	Índice de Lesões	Índice de Úlceras	Índice Total
CL (água: 0,1 ml/100 g)	11,2 ± 0,4	85,1 ± 6,3	96,2 ± 6,6
Quercetina (50 mg/kg)	9,3 ± 0,3	75,1 ± 11,1	84,4 ± 11,1
Quercetina (100 mg/kg)	9,2 ± 0,6 *	21,4 ± 8,4 *	30,6 ± 8,9 *
Quercetina (200 mg/kg)	8,2 ± 0,5 *	17,6 ± 5,7 *	25,7 ± 6,0 *
Ranitidina (60 mg/kg)	8,7 ± 0,5 *	60,6 ± 6,5	69,6 ± 6,3

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 8: Efeito do óleo essencial das folhas da *A. millefolium* sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo) em ratas.

Tratamentos	Índice de Lesões	Índice de Úlceras	Índice Total
CL (água: 0,1 ml/100 g)	10,8 ± 0,4	117,6 ± 6,8	128,5 ± 7,0
Óleo (5 mg/kg)	9,5 ± 0,5	116,1 ± 4,4	125,6 ± 4,2
Óleo (10 mg/kg)	10,3 ± 0,3	95,7 ± 7,5	105,7 ± 7,7 *
Óleo (50 mg/kg)	9,8 ± 0,3	108,8 ± 7,1	118,7 ± 6,9
EABA (2000 mg/kg)	5,2 ± 0,3 *	3,2 ± 1,6 *	8,3 ± 1,6 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 9: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a atividade da NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) na mucosa gástrica de ratas com lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo).

Tratamentos	Atividade da NQO1 (nmoles/mg/min)
NL (água: 0,1 ml/100 g)	8940 ± 838
CL (água: 0,1 ml/100 g)	9542 ± 2355
EABA (2000 mg/kg)	8401 ± 3489

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

Tabela 10: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a atividade da glutatona S-transferase (GST) na mucosa gástrica de ratas com lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/200 g - vo).

Tratamentos	Atividade da GST (nmoles/mg/min)
NL (água: 0,1 ml/100 g)	526 ± 94
CL (água: 0,1 ml/100 g)	626 ± 57
EABA (2000 mg/kg)	330 ± 108 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 11: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.

Tratamentos	Volume (ml)	PH	Acidez Total (mEq[H ⁺]/ml/4 h)
C (água: 0,1 ml/100 g)	8,1 ± 0,9	1,5 ± 0,1	0,069 ± 0,007
EABA (125 mg/kg)	10,3 ± 0,7	1,3 ± 0,1	0,090 ± 0,005
EABA (1500 mg/kg)	7,0 ± 0,6	1,6 ± 0,1	0,064 ± 0,005
EABA (2000 mg/kg)	4,8 ± 0,4 *	2,2 ± 0,1 *	0,044 ± 0,004 *
Ranitidina (60 mg/kg)	5,1 ± 0,4 *	2,9 ± 0,4 *	0,027 ± 0,007 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 12: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol em ratas com ligadura do piloro.

Tratamentos	Volume (ml)	pH	Acidez Total (mEq[H ⁺]/ml/4 h)
C (água: 0,1 ml/100 g)	7,4 ± 0,3	1,7 ± 0,1	0,069 ± 0,003
Betanecol (2,5 mg/kg)	12,4 ± 0,4 *	1,4 ± 0,1	0,084 ± 0,003
EABA (125 mg/kg)	12,0 ± 0,6 *	1,4 ± 0,1	0,078 ± 0,003
EABA (1500 mg/kg)	11,4 ± 0,5 *	1,3 ± 0,1	0,076 ± 0,006
EABA (2000 mg/kg)	10,3 ± 0,4 * ^φ	1,5 ± 0,1	0,065 ± 0,005 ^φ
Atropina (1,0 mg/kg)	3,8 ± 0,1 * ^φ	2,9 ± 0,2 * ^φ	0,027 ± 0,003 * ^φ

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni (p < 0,05).

* Diferente do grupo controle.

^φ Diferente do grupo betanecol.

Tabela 13: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina em ratas com ligadura do piloro.

Tratamentos	Volume (ml)	PH	Acidez Total (mEq[H ⁺]/ml/4 h)
C (água: 0,1 ml/100 g)	8,2 ± 0,7	1,5 ± 0,1	0,068 ± 0,007
Pentagastrina (400 µg/kg)	12,7 ± 0,6 *	1,1 ± 0,1 *	0,101 ± 0,004 *
EABA (125 mg/kg)	12,7 ± 0,4 *	1,0 ± 0,1 *	0,105 ± 0,005 *
EABA (1500 mg/kg)	13,0 ± 0,5 *	1,0 ± 0,1 *	0,114 ± 0,002 *
EABA (2000 mg/kg)	11,3 ± 0,8 *	1,2 ± 0,1 *	0,106 ± 0,004 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 14: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a secreção ácida gástrica estimulada por histamina em ratas com ligadura do piloro.

Tratamentos	Volume (ml)	pH	Acidez Total (mEq[H ⁺]/ml/4 h)
C (água: 0,1 ml/100 g)	7,7 ± 0,8	1,6 ± 0,1 *	0,063 ± 0,006
Histamina (10 mg/kg)	13,0 ± 0,3 *	1,1 ± 0,1 *	0,108 ± 0,002 *
EABA (125 mg/kg)	12,1 ± 0,6 *	1,1 ± 0,1 *	0,109 ± 0,002 *
EABA (1500 mg/kg)	11,5 ± 1,0 *	1,2 ± 0,1 *	0,109 ± 0,005 *
EABA (2000 mg/kg)	7,3 ± 0,7 ^φ	1,6 ± 0,1 ^φ	0,086 ± 0,007 * ^φ
Ranitidina (60 mg/kg)	5,5 ± 0,4 ^φ	2,2 ± 0,1 * ^φ	0,037 ± 0,003 * ^φ

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni (p < 0,05).

* Diferente do grupo controle.

^φ Diferente do grupo histamina.

Tabela 15: Curva proteína-atividade da H⁺/K⁺-ATPase isolada de cachorro.

Proteína (mg/ml)	Pi (μMPi/min)
0,1	0,30
0,3	0,65
0,6	1,54
0,9	2,13
1,8	3,85
3,6	6,12
7,2	9,00
10,8	9,06
20,0	8,79

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 16: Curva tempo-atividade da H⁺/K⁺-ATPase isolada de cachorro.

Tempo (min)	Pi (μMPi/min)
2,5	0,08
5,0	0,15
7,5	2,50
10,0	2,83
20,0	5,46
30,0	7,20
45,0	6,94

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 17: Cinética da H⁺/K⁺-ATPase dependente do ATP.

ATP (mM)	Pi (μMPi/mg/min)
0,10	0,22
0,24	0,30
0,40	0,34
0,60	0,36
1,00	0,38

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 18: Efeito do omeprazol e ouabaína na atividade da H⁺/K⁺-ATPase.

Concentração (mM)	Omeprazol (%)	Ouabaína (%)
0,05	82,45	102,40
0,10	74,74	101,04
0,25	64,89	104,97
0,50	47,94	103,10
1,00	31,91	96,12

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 19: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas de *A. millefolium* (EABA) sobre a atividade da H⁺/K⁺-ATPase.

EABA (µg/ml)	Pi (µMPi/mg/min)
0	5,32 ± 0,34
50	4,45 ± 0,11
200	3,74 ± 0,32 *
300	2,86 ± 0,25 *
500	3,40 ± 0,14 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de determinações em triplicatas e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Figura 20: Efeito da rutina sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.

Tratamentos	Volume (ml)	PH	Acidez Total (mEq[H ⁺]/ml/4 h)
C (água: 0,1 ml/100 g)	6,9 ± 0,4	1,7 ± 0,1	0,068 ± 0,004
Rutina (50 mg/kg)	8,4 ± 0,9	1,5 ± 0,1	0,077 ± 0,007
Rutina (100 mg/kg)	6,8 ± 0,7	1,8 ± 0,1	0,061 ± 0,007
Rutina (200 mg/kg)	9,4 ± 0,8	1,4 ± 0,1	0,079 ± 0,004
Ranitidina (60 mg/kg)	4,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2 *	0,026 ± 0,002 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 21: Efeito da rutina sobre a atividade da H⁺/K⁺-ATPase.

Rutina (μM)	Pi (μMPi/mg/min)
0	4,16 ± 0,31
25	3,95 ± 0,18
50	3,53 ± 0,10
250	2,47 ± 0,04 *
500	1,64 ± 0,07 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de determinações em triplicatas e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 22: Efeito da quercetina sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.

Tratamentos	Volume (ml)	pH	Acidez Total (mEq[H ⁺]/ml/4 h)
C (água: 0,1 ml/100 g)	7,4 ± 0,6	1,6 ± 0,1	0,076 ± 0,005
Quercetina (50 mg/kg)	7,8 ± 0,7	1,6 ± 0,1	0,079 ± 0,005
Quercetina (100 mg/kg)	8,3 ± 0,7	1,5 ± 0,1	0,083 ± 0,005
Quercetina (200 mg/kg)	7,4 ± 0,6	1,6 ± 0,1	0,073 ± 0,007
Ranitidina (60 mg/kg)	4,9 ± 0,2	2,7 ± 0,1 *	0,024 ± 0,002 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 23: Efeito da quercetina sobre a atividade da H⁺/K⁺-ATPase.

Quercetina (μM)	Pi (μMPi/mg/min)
0	3,70 ± 0,29
25	2,69 ± 0,35 *
50	2,48 ± 0,10 *
250	1,85 ± 0,07 *
500	1,26 ± 0,11 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de determinações em triplicatas e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do Teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 24: Efeito do óleo essencial das folhas da *A. millefolium* sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas com ligadura do piloro.

Tratamentos	Volume (ml)	pH	Acidez Total (mEq[H ⁺]/ml/4 h)
C (água: 0,1 ml/100 g)	8,4 ± 0,8	1,7 ± 0,1	0,071 ± 0,005
Óleo (5 mg/kg)	7,8 ± 0,9	1,7 ± 0,1	0,072 ± 0,008
Óleo (10 mg/kg)	7,8 ± 0,8	1,6 ± 0,1	0,083 ± 0,007
Óleo (50 mg/kg)	7,7 ± 1,1	1,7 ± 0,1	0,070 ± 0,008
EABA (2000 mg/kg)	4,6 ± 0,3 *	2,2 ± 0,1 *	0,039 ± 0,003 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n=6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 25: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas de *A. millefolium* (EABA) sobre o esvaziamento gástrico de líquidos em ratas.

Tratamentos	Concentração (μg de vermelho de fenol/ml)
C (água: 0,1 ml/100 g)	13,8 \pm 1,8
EABA (125 mg/kg)	17,4 \pm 1,8 *
EABA (1500 mg/kg)	12,6 \pm 3,1
EABA (2000 mg/kg)	14,1 \pm 2,1
Atropina (3,0 mg/kg)	18,7 \pm 1,9 *

Os valores representam as médias \pm desvio padrão (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para p < 0,05.

Tabela 26: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas de *A. millefolium* (EABA) sobre o trânsito intestinal em camundongos fêmeas.

Tratamentos	Percorso do carvão ativado (%)
C (água: 0,1 ml/10 g)	71,2 \pm 3,7
EABA (100 mg/kg)	80,4 \pm 5,1
EABA (1000 mg/kg)	75,7 \pm 3,0
EABA (2000 mg/kg)	74,1 \pm 2,6
Neostigmina (20 μg /kg)	88,2 \pm 2,9 *

Os valores representam as médias \pm erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para p < 0,05.

Tabela 27: Padronização do método da diarreia induzida pelo óleo de rícino em camundongos fêmeas.

Tratamentos	Tempo do primeiro sólido (min)	Tempo de indução da diarreia (min)	Nº de episódios sólidos	Nº de episódios líquidos	Peso Total dos Episódios (g)
C (água: 0,1 ml/10 g)	3,8 ± 1,1	0	2,8 ± 1,2	0	0,03 ± 0,01
Óleo (0,1 ml/30 g)	12,3 ± 3,1	26,8 ± 1,7 *	2,3 ± 0,7	4,5 ± 0,7 *	0,21 ± 0,04 *
Óleo (0,3 ml/30 g)	11,7 ± 4,0	34,3 ± 4,5 *	2,2 ± 0,6	5,2 ± 0,7 *	0,10 ± 0,02
Óleo (0,5 ml/30 g)	18,8 ± 8,7	33,2 ± 3,7 *	1,5 ± 0,5	5,7 ± 0,6 *	0,13 ± 0,04
Óleo (0,8 ml/30 g)	23,0 ± 8,6	33,3 ± 2,7 *	0,7 ± 0,3	5,8 ± 0,9 *	0,20 ± 0,04 *

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 28: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA) sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino (0,3 ml/30 g - vo) em camundongos fêmeas.

Tratamentos	Tempo de indução da diarreia (min)	Nº de Episódios
C (água: 0,1 ml/10 g)	52,8 ± 4,0	8,5 ± 1,0
EABA (100 mg/kg)	47,8 ± 6,2	14,5 ± 3,8
EABA (500 mg/kg)	47,7 ± 3,4	7,5 ± 2,0
EABA (1000 mg/kg)	48,7 ± 4,2	8,7 ± 2,3
Loperamida (5,0 mg/kg)	77,0 ± 2,7 *	1,7 ± 0,8

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias (n = 6) e a correlação estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle lesado para p < 0,05.

Tabela 30: Comparação das atividades específicas entre as enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT no citosol do corpo e do fundo do estômago de ratas.

Citosol	NQO1 (nmoles/mg/min)	GST (nmoles/mg/min)	CAT (nmoles/mg/min)
Corpo	9001 ± 3546	756 ± 84 *	14 ± 4 * ^φ
Fundo	6532 ± 2303	386 ± 10 *	42 ± 4 * ^φ

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de determinações realizadas em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

* Diferente do grupo NQO1.

^φ Diferente do grupo GST.

Tabela 31: Comparação das atividades específicas das enzimas antioxidantes NQO1, GST e CAT entre o citosol do corpo e do fundo do estômago de ratas.

Enzimas	Corpo	Fundo
NQO1 (nmoles/mg/min)	9001 ± 3546	6532,3 ± 2302,8
GST (nmoles/mg/min)	756 ± 84	385,7 ± 9,6 *
CAT (nmoles/mg/min)	14 ± 4	42,0 ± 4,2 *

Os valores representam a médias ± erro padrão das de determinações realizadas em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo corpo para $p < 0,05$.

Tabela 32: Efeito do extrato bruto aquoso das folhas da *A. millefolium* (EABA, 1000 mg/kg/7 dias - vo) sobre as atividades das enzimas antioxidantes GST, NQO1 e CAT da mucosa gástrica de ratas.

Tratamento	Atividade Enzimática (nmoles/mg/min)					
	GST		NQO1		CAT	
	Corpo	Fundo	Corpo	Fundo	Corpo	Fundo
C (água, 0,1 ml/100 g)	756 ± 84	386 ± 10	9001 ± 3546	6532 ± 2303	14 ± 4	42 ± 4
EABA (1000 mg/kg)	514 ± 66	311 ± 77	11365 ± 1111	8223 ± 750	19 ± 7	26 ± 11

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de determinações realizadas em triplicata e a comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.