

Efeito antiúlcera de *Bidens pilosa* L. e segurança toxicológica em roedores: estudo comparativo entre extratos do caule e da raiz

Antiulcer effect of Bidens pilosa L. and toxicological safety in rodents: comparative study between stem and root extracts

Abel José Alves Nascimento^{1/+}, Bruno Lucena de Lima², Artur Danilo Novaes da Silva², Helder Carvalho Souza Lima Silva², Ricardo Prado Lyra², Gabriela Saraiva Dantas², Daniela de Alencar Menezes², Fabiana Lima Silva^{3,4}, Schirley Cristina Almeida Pereira⁶, Joelmir Lucena Veiga da Silva⁹

¹ Acadêmico de Farmácia-UNINOVE, ² Acadêmico da Faculdade de Medicina de Olinda (FMO), ³ PhD. Farmácia/ Instituto de Química-Universidade de São Paulo (USP), ⁴ PhD. Professor/Instituto de Ciências da Saúde-Universidade Paulista (UNIP), ⁵ Professora-FMO. ⁶ PhD. Professor-FMO

RESUMO: Objetivo: Investigar e comparar a atividade antiúlcera de extratos obtidos das raízes (Bpr-EtOH) e do caule (Bpc-EtOH) de *Bidens pilosa*, em ensaios de úlceras estomacais induzidas por etanol absoluto em ratos e na triagem toxicológica aguda em camundongos. **Métodos:** Para o ensaio antiúlcera foi utilizado o modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos (n = 4-5). Para a triagem toxicológica aguda foram utilizados camundongos machos (n = 5), tratados com dose única dos extratos separadamente com 2 g/kg, via oral (VO) ou veículo, monitorados durante três dias. Os valores de p < 0,05, pelo teste t ou ANOVA, foram considerados significantes. Todos os procedimentos foram aprovados pelo CEUA/UNINOVE. **Resultados:** Tanto o extrato Bpc-EtOH (150 e 500 mg/kg) protegeu a mucosa gástrica (ALU = 138,0 ± 30,5 e 96,3 ± 11,8 mm², respectivamente), quanto o extrato Bpr-EtOH (50, 150 e 500mg/kg) induziu o mesmo efeito, porém todas as doses (ALU = 178,3 ± 10,0; 67,4 ± 9,5 e 35,5 ± 14,3 mm², respectivamente) foram significativamente diferentes do controle, e mais eficaz (Emax) que o extrato Bpc-EtOH. O omeprazol (ALU = 145,7 ± 19,9 mm²) também promoveu efeito semelhante aos extratos. A análise histopatológica das amostras do tecido confirmou a proteção gástrica. A dose máxima de 500mg/kg dos extratos é segura e não deve causar danos aos animais, uma vez que na triagem toxicológica, utilizando a dose de 2g/kg, não foram verificados danos importantes nem mortes. **Conclusão:** O caule e raiz de *B. pilosa* também apresentam princípios ativos com atividade antiúlcera, sendo que estão mais concentrados na raiz ou são diferentes daqueles no caule e, ambos, seguros nas doses utilizadas.

Palavras-chave: Planta medicinal. Extrato vegetal. Agente antiúlcera. Toxicidade.

ABSTRACT: Purpose: To investigate and to compare the extracts of the stalks (Bpc-EtOH) and roots (Bpr-EtOH) from *Bidens pilosa* on ethanol-gastric ulcer model rats and acute toxicological screening in mice. **Methods:** in the ulcer model were accessed the extracts on ethanol-induced rat gastric lesions (n = 4-5). To analyze the safety toxicological those extracts in vivo, the acute toxicity screening was performed with single dose extracts and during three days in mice (n=5). **Results:** the Bpc-EtOH (150 and 500 mg/kg) protected the rat gastric mucosa layer (ULA=138.0 ± 30.5 and 96.3 ± 11.8 mm², respectively). The Bpr-EtOH induced similar effects on all doses (ULA=178.3 ± 10.0; 67.4 ± 9.5 and 35.5 ± 14.3 mm²) and the most efficacy (Emax) than Bpc-EtOH. The omeprazole (ULA=145.7 ± 19.9 mm²) showed also protective effects as expected. The histopathology analyzes corroborated those results. The maximum dose 500 mg/kg (o.r.) of the extracts is safe and do not cause damages to animals because dose 2 g/kg (o.r.) in toxicological screening did fail. **Conclusion:** The stalks and roots from *B. pilosa* also present actives metabolites for antiulcer activity, it may be more concentration in roots or are different than stalks, and both are safe in doses tested.

Keywords: Medicinal plant. Plant extract. Anti-ulcer. Toxicity

INTRODUÇÃO

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas

Medicinais e Fitoterápicos^{1,2} estimulam pesquisas com plantas que possam colaborar com a descoberta de drogas capazes de contribuir para o tratamento de doenças que acometem a

⁺Correspondência do autor:joelmir.veiga@fmo.edu.br

população brasileira. A escolha da planta baseada em seu uso na medicina popular (critério etnofarmacológico) ou na quimiotaxonomia (critério quimiotaxonômico) é um dos meios que pode conduzir à descoberta de medicamentos que possam servir de ferramentas farmacológicas ou de modelos para a síntese de novos fármacos³.

A família *Asteraceae* possui aproximadamente 23 mil espécies e é de importância medicinal, detentora de grande valor⁴. *Bidens pilosa* L. trata-se de uma erva daninha utilizada e cresce em todas as regiões tropicais do mundo⁵ conhecida popularmente como “picão-preto”. Trabalhos prévios têm demonstrado algumas de suas atividades biológicas para suas partes aéreas como antimicrobiana, anti-inflamatória, antimalárica e hipoglicemiante⁶⁻⁹. Vale destacar que suas folhas apresentam propriedades antissecretória e antiulcerogênica¹⁰.

O tratamento farmacológico para a úlcera é baseado na inibição da secreção ácida gástrica por antagonistas- H_2 e inibidores de bomba de próton¹¹. Entretanto, a maioria dessas classes terapêuticas provoca reações adversas¹². Assim, a busca por novos agentes para o tratamento da úlcera, mais eficazes e menos tóxicos, é essencial. O objetivo do estudo foi investigar e comparar o efeito dos extratos obtidos das raízes (Bpr-EtOH) e dos caules (Bpc-EtOH) de *Bidens pilosa* sobre úlcera estomacais induzidas por etanol absoluto em ratos e a segurança toxicológica aguda destes extratos em camundongos.

MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (AN 0003/12).

Foram utilizados os extratos etanólicos brutos (Bpc-EtOH e Bpr-EtOH) obtidos do caule e das raízes de *B. pilosa*, respectivamente. Os extratos foram dissolvidos em TWEN-20 (0,1%) e diluídos em água destilada para se obter as doses necessárias para os experimentos.

Para investigar a atividade antiúlcera dos extratos, ratos Wistar, em jejum de 24 h, foram separados em grupos de cinco animais, previamente tratados: por via oral, por gavagem, com cada extrato (50, 150 ou 500 mg/kg, grupo tratado); 10 mL/kg de água destilada mais TWEN-20 (grupo controle negativo); ou 4 mg/kg omeprazol por via intraperitoneal (grupo controle positivo). Decorridos 60 minutos, 10 mL/kg de etanol absoluto (grupo controle) era administrado por gavagem¹³. Após 1h da administração do agente ulcerogênico (etanol absoluto), os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 , seus estômagos removidos e abertos ao longo da curvatura maior. A área lesão ulcerativa (ALU) de cada animal foi calculada de acordo com a metodologia adaptada¹⁴. Amostras destes tecidos foram submetidas a análise histopatológica com hematoxilina-eosina (HE).

Para investigar a toxicidade aguda, grupos de cinco camundongos receberam uma dose de 2 g/kg (VO)¹⁵ de cada extrato e foram verificados segundo a atividade locomotora e comportamental a cada 30 minutos, durante três

horas consecutivas. Outro grupo recebeu o veículo VO (água destilada + TWEN-20 0,1%), sendo considerado controle. A ocorrência de morte em cada grupo foi verificada após 24, 48 e 72 h para calcular a dose letal 50 (DL_{50})¹⁶. Para observar possíveis alterações morfológicas de órgãos vitais (coração, pulmões, fígado e rins), estes foram isolados e devidamente pesados (mg/g) e amostras submetidas a análise histopatológica com HE.

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão da média. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes ($p < 0,05$) obtidas pelo teste-t ou por ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett. Todos os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.01.

RESULTADOS

O extrato Bpc-EtOH protege a mucosa gástrica de acordo com a dose ($p < 0,05$) de 150 e 500 mg/kg (ALU= $138,0 \pm 30,5$ e $96,3 \pm 11,8$ mm², respectivamente)(Figura 1A). Já o extrato Bpr-EtOH também induziu efeito semelhante, porém todas as doses 50, 150 e 500 mg/kg (ALU= $178,3 \pm 10,0$; $67,4 \pm 9,5$ e $35,5 \pm 14,3$ mm², respectivamente) foram significativamente diferentes do controle (Figura 1B), e sendo mais eficaz (E_{max} , $p < 0,05$) que o extrato do caule (Bpc-EtOH). O omeprazol (ALU= $145,7 \pm 19,9$ mm²) também promoveu tal efeito, quando comparado ao controle.

Na análise histopatológica de amostras dos experimentos, percebeu-se as criptas normais da mucosa gástrica no grupo controle (Figura 2A). Nos grupos de ratos pré-tratados

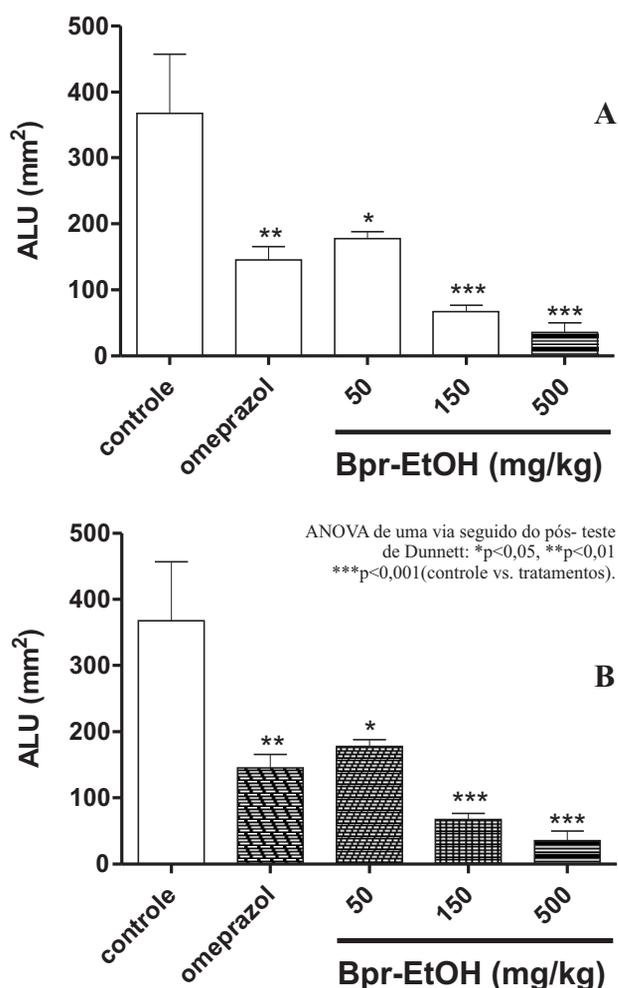


Figura 1. Efeito dos extratos Bpc-EtOH (A) e Bpr-EtOH (B), e do omeprazol frente à úlcera gástrica induzida por etanol (controle) em ratos (n = 4-5).

com 500 mg/kg (VO) dos extratos Bpc-EtOH (Figura 2B) ou Bpr-EtOH (Figura 2C), verificou-se que os produtos foram capazes de proteger as células superficiais da mucosa, não apresentando pontos hemorrágicos nem infiltração de células inflamatórias, semelhante ao grupo controle (Figura 2A).

No início da avaliação toxicológica, os extratos Bpc-EtOH e Bpr-EtOH não alteraram a ambulação/comportamento dos animais, quando comparados ao grupo controle.

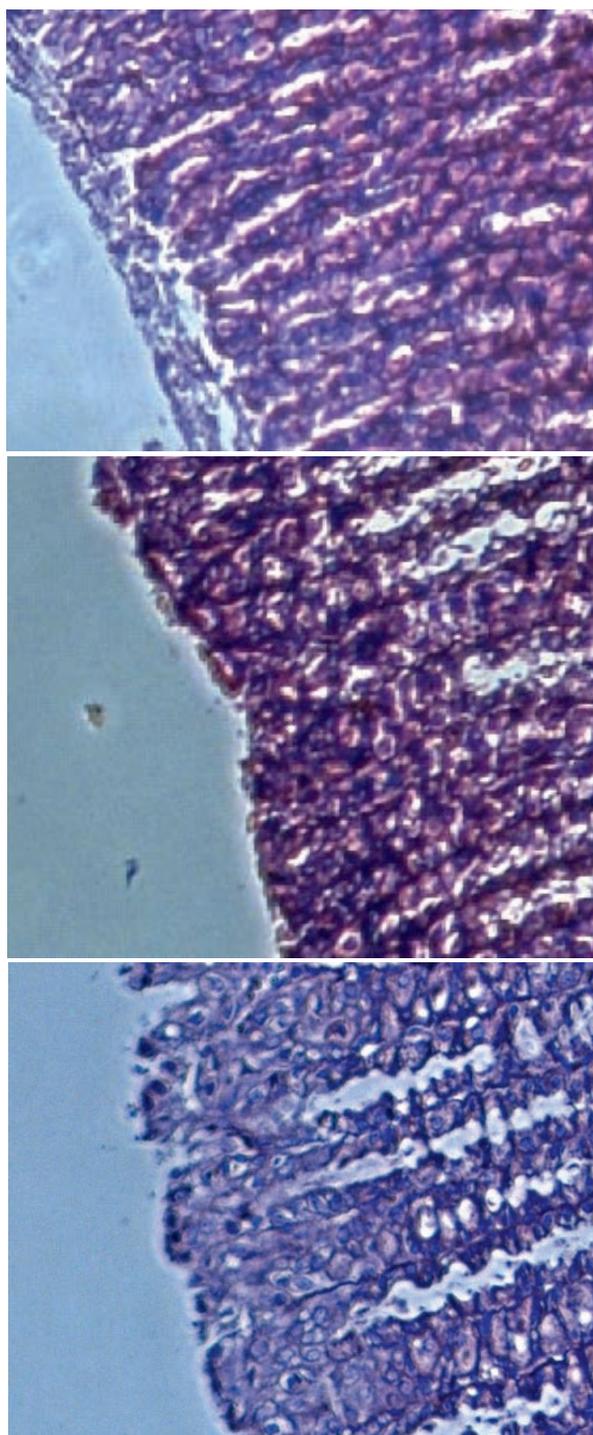


Figura 2. Histologia da mucosa gástrica de ratos: controle (A) e tratados com 500 mg/kg de Bpc-EtOH (B) ou de Bpr-EtOH (C). HE, 100X

Os camundongos tratados com o extrato Bpc-EtOH não tiveram seus pesos alterados após 24, 48 e 72 h do tratamento (Tabela 1). Entretanto, o Bpr-EtOH reduziu o peso dos

animais de maneira significativa ($p < 0,01$) após 24 e 48h da administração, e acompanhado de redução na ingestão de ração e aumento na ingestão de água (dados não mostrados), mas às 72h eles restabeleceram o peso (Tabela 1).

Tabela 1. Peso (g) dos camundongos antes (controle) e 24, 48 e 72 horas após a administração dos extratos Bpc-EtOH e Bpr-EtOH (v.o., 2 g/kg), $n = 5$.

Tratamento (extrato)	Controle	24 horas	48 horas	72 horas
Bpc -EtOH	36,6 ± 1,5	36,5 ± 1,4	36,2 ± 1,8	36,9 ± 1,8
Bpr -EtOH	33,6 ± 0,3	30,1 ± 0,7**	30,2 ± 0,9**	32,0 ± 0,6

** $p < 0,01$, ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Dunnett (controle x Bpr-EtOH)

Não houve mortes de animais e, após a eutanásia, na análise dos órgãos vitais (coração, fígado, pulmões e rins), percebeu-se que nenhum extrato foi capaz de aumentar a razão de peso desses órgãos (Tabela 2). No entanto, verificou-se diminuição na razão de peso naqueles tratados com o extrato Bpr-EtOH para o coração e ambos extratos para os pulmões (Tabela 2). Na análise histopatológica dos tecidos não foram evidenciadas alterações que pudessem caracterizar alguma toxicidade nestes órgãos.

Tabela 2. A razão de peso (mg/g) dos órgãos isolados dos animais controle e tratados com os extratos Bpc-EtOH e Bpr-EtOH (v.o., 2 g/kg), $n = 5$.

Tratamentos	Coração	Fígado	Pulmões	Rins
Controle	0,9 ± 0,09	7,7 ± 0,7	1,9 ± 0,08	2,2 ± 0,1
Bpc -EtOH	0,8 ± 0,06	7,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1**	1,9 ± 0,1
Bpr -EtOH	0,6 ± 0,03**	7,5 ± 0,4	1,0 ± 0,04***	1,9 ± 0,05

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, teste-t (controle x extrato)

DISCUSSÃO

A hiper-reatividade gastrointestinal é uma condição que pode ser induzida em modelos animais e corresponde a várias afecções que alteram a fisiologia do trato

gastrointestinal. Entre elas, destacam-se as úlceras gástricas que ocorrem devido ao desequilíbrio entre os mecanismos de defesa e os fatores de agressão da mucosa gastroduodenal¹⁷. O modelo animal para lesões gástricas induzidas por etanol envolvem a depressão dos mecanismos de defesa gástrica, assim como a redução da produção do muco, do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, da secreção de bicarbonato, da glutathione endógena e das prostaglandinas¹⁸. Além disso, a ação do etanol aumenta a liberação de histamina, o influxo de cálcio, a geração de radicais livres e a produção de leucotrienos¹⁹ e o recrutamento de neutrófilos²⁰. O fato dos extratos de *B. pilosa* (Bpc-EtOH e Bpr-EtOH) terem protegido a mucosa gástrica pode ser explicado devido aos princípios ativos de *Bidens pilosa*⁸ que contribuíram para as atividades antioxidante e anti-inflamatória local, proporcionando proteção da mucosa como observado na Figura 2 (B e C). Visto que a administração de antioxidantes inibe as lesões gástricas por etanol em ratos²¹. Como o extrato das raízes apresentou efeito mais eficaz, é provável que os princípios ativos responsáveis por tal atividade estejam mais concentrados ou sejam diferentes daqueles do caule. A atividade antiulcerogênica das folhas de *B. pilosa* já caracterizada¹⁰, corrobora com os dados deste trabalho para a existência de princípios ativos com tal propriedade também nas raízes e caule desta espécie.

Para investigar a segurança toxicológica dos extratos utilizados neste estudo, realizou-se a triagem toxicológica aguda. A primeira observação realizada após a administração dos

extratos Bpc-EtOH e Bpr-EtOH foi a atividade motora e comportamental dos animais em campo aberto, percebeu-se que os extratos não apresentaram efeito ansiolítico e nem ansiogênico/sedativo (dados não mostrados). Apesar do extrato Bpr-EtOH reduzir o peso dos ratos, após 24 e 48h da sua administração, este efeito foi revertido às 72h. O que sugeriu efeito moderador de apetite induzido pelo extrato, atuando periféricamente ao invés de efeito sobre o sistema nervoso central, uma vez que não se observou alteração na ambulação dos animais anteriormente. Pois sabe-se que os inibidores de apetite clássicos, como fluoxetina, sibutramina, modulam neurotransmissores centrais e conseqüentemente o apetite, reduzindo a necessidade da ingestão de alimentos²².

Ao término da triagem toxicológica, verificou-se que nenhum extrato aumentou a razão de peso dos órgãos (Tabela 2), indicando que não houve alterações que sugeririam toxicidade nesses órgãos. Entretanto, notou-se diminuição significativa na razão de peso do coração dos ratos tratados com Bpr-EtOH e na de peso dos pulmões dos animais para ambos os extratos (Tabela 2). Para confirmação desses dados, as análises histopatológicas não mostraram alterações nestes tecidos (dados não mostrados), o que descarta alguma lesão. Assim, pode-se concluir que a dose máxima de 500mg/kg dos extratos utilizada no efeito antiúlcera é segura, e que não deve causar danos aos animais, uma vez que na triagem toxicológica, utilizando a dose de 2g/kg, 4 vezes maior que aquela do ensaio farmacológico, não

foram verificados danos importantes nem mesmo mortes dos animais, por isso a DL₅₀ não foi determinada.

Conclui-se que *Bidens pilosa* contém princípios ativos com propriedade antiúlcera nas raízes e caule, assim como as suas folhas, sendo segura nas doses utilizadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria no. 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 04 maio. 2006.
2. Brasil. Presidência da República. Decreto no. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006.
3. Firenzuoli F, Gori L. Herbal medicine today: clinical and research Issues. Evid. Based Complement. Alternat Méd. 2007; 4(1):37-40.
4. Gao T, Yao H, Song J, Zhu Y, Liu C, Chen S. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. BMC Evolutionary Biology. 2010;10:324.
5. Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Aguirre-Garcia F. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxandibetic mice. Phytother Res. 2002;16(4):383-6.
6. Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Munoz JF. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. BMC. 2006; 6(2).
7. Pereira RL, Ibrahim T, Lucchetti L, Da Silva AJ, Gonçalves De Moraes VL. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. Immunopharmacol. 1999;43(1):31-7.
8. Oliveira FQ, Andrade-Neto V, Krettli AU, Brandao MG. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. J. Ethnopharmacol. 2004; 93(1):39-42.
9. Chang CL, Kuo HK, Chang SL, Chiang YM, Lee TH, Wu WM, Shyur LF, Yang WC. The distinct effects of a butanol fraction of *Bidens pilosa* plant extract on the development of Th1-mediated diabetes and Th2-mediated airway inflammation in mice. J. Biomed. Sc. 2005;12(1):79-89.
10. Tan PV, Dimo T, Dongo E. Effects of methanol, cyclohexane and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* on various gastric ulcer models in rats. J. Ethnopharmacol. 2000;73(3):415-21.
11. Chen WC, Li YD, Chiang PH, Tsay FW, Chan HH, Tsai WL, Tsai TJ, Wang EM, Cheng JS, Lai KH. Comparison of proton pump inhibitor and histamine-2 receptor antagonist in the prevention of recurrent peptic ulcers/erosions in long-term low-dose aspirin users: a retrospective cohort study. Biomed Res Int 2014; 693567.
12. Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of antiulcer remedies. Phytother Res. 2000;14:581-1.
13. Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. Jpn J Pharmacol. 1991; 57:595-605.
14. Kauffman GL, Grossman MI. Prostaglandin and cimetidine inhibit the formation of ulcers produced by parenteral salicylates. Gastroenterol. 1978; 75:1099-102.
15. Brasil, 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 90, de 18 de março de 2004. Normas para o estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos.
16. Litchfield LTJR, Wilcoxon F. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. J Pharmacol Exp Ther. 1949;19:388-97.
17. Bittencourt PFS, Rocha GA, Penna FJ, Queiroz DMM. Úlcera péptica gastroduodenal e infecção pelo *Helicobacter pylori* na criança e adolescente. J Pediatr. 2006; 82(5).
18. Kinoshita M, Kume E, Tamaki H. Roles of prostaglandins nitric oxide and the capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection produced by ecabet sodium. J Pharmacol Exp Ther. 1995; 275(1):494-501.
19. Glavin Gb, Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. FASEB J. 199; 6:825-31.
20. Cheng CL, Koo MW. Effect of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. Life Sci. 2000; 67:2647-53.
21. Ligumsky M, Sestieri M, Okon F, Ginsburg I. Antioxidants inhibit ethanol-induced gastric injury in the rat. Role of manganese, glycine and carotene. Scandanavian J Gastroenterol. 1995; 30:854-60.
22. Arterburn DE, Crane PK, Veenstra DL. The efficacy and safety of sibutramine for weight loss: a systematic review. Arch Intern Med. 2004;164(9):994-1003.