



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CYNTHIA LAYSE FERREIRA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E GASTROPROTETORA DOS
EXTRATOS DE *Spondias purpurea* L. (ANACARDIACEAE)**

RECIFE

2018

CYNTHIA LAYSE FERREIRA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E GASTROPROTETORA DOS
EXTRATOS DE *Spondias purpurea* L. (ANACARDIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade
Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da
Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos

RECIFE

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

A447a Almeida, Cynthia Layse Ferreira de.
Avaliação das atividades antioxidante e gastroprotetora dos extratos de Spondias purpúreas L.(Anacardiaceae) / Cynthia Layse Ferreira de Almeida. – 2018.
138 f: il. ; 30 cm.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.
Inclui referências e anexos.

1. Anacardiaceae. 2. Úlcera Gástrica. 3. Cicatrização. I. Silva, Teresinha Gonçalves da. (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018-107)

CYNTHIA LAYSE FERREIRA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E GASTROPROTETORA DOS
EXTRATOS DE *Spondias purpurea* L. (ANACARDIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco.

Aprovada em: 26/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Orientadora – UFPE

Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos
Coorientadora – UEPB

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
Examinador interno – UFPE

Profa. Dra. Camila de Albuquerque Montenegro
Examinadora externa – UFCG

Profa. Dra. Alice Valença Araújo
Examinadora externa – UFPE

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes
Examinador externo – URCA

Profa. Dra. Maria Bernadete Sousa Maia
Suplente interna – UFPE

Prof. Dr. Eryvelton de Souza Franco
Suplente externo - UNIBRA

Aos meus pais, Francisca e Adauto, dedico.

Agradecimientos

A Deus, pelo Seu infinito amor e incessante cuidado, por iluminar meus caminhos e me mostrar que os Seus planos sempre são maiores e melhores que os meus;

Aos meus pais, Adauto e Francisca, e *aos meus irmãos*, João Felipe e Cisia, que foram meu suporte e a razão de eu enfrentar todas as dificuldades para aqui chegar;

Ao Temístocles Santana, meu namorado e grande amigo, e *sua Família*, pelo amor, incentivo imensurável, pela paciência, compreensão e por sua presença constante ao meu lado;

À Samara Brito, companheira de todas as horas, amiga, e, sobretudo, irmã, pelo companheirismo, amizade e pelo apoio incondicional;

À Profa. Teresinha Gonçalves da Silva, pela oportunidade, orientação, carinho e por ser uma inspiração para mim;

À Profa. Vanda Lucia dos Santos, por viabilizar minha chegada até aqui e por sua disponibilidade e amizade;

Ao Prof. Almir Wanderley e integrantes do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Produtos Bioativos, Alisson, Anne, Amanda, Carol, Daillo, Hyago, Isabella, Jamilka, Jéssica, Joanellys, Lady, Samara, pelo suporte e auxílio nos desafios diários e dúvidas durante esta caminhada;

À profa. Camila Montenegro, grande amiga e irmã, conselheira sempre presente em todas as horas;

Aos professores examinadores Alice Valença, Irwin Alencar, Eryelton Franco e Bernadete Maia por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições;

Aos professores, colegas e aos funcionários, Nerilin e Riluan, do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de aprendermos juntos;

Aos professores Larissa Rolim (UNIVASF), Lécio Leone (URCA), Jacinto Costa (UFPE), Márcia Vanusa (UFPE) e Eusébio (UFAL), pelas valiosas parcerias firmadas;

Aos amigos e colegas do Laboratório Biofarmatox, pelo apoio e amizade, em especial ao meu IC Henrique Bandeira, e aos colegas, Jhonatta, Carol, Caio, Anne, Michelly, Pedro Silvino, Pedro Paulo e Carlson;

Às Friends, Jeyce, Natalie e Sandrine, pelos momentos de descontração e pela amizade verdadeira e fiel;

Às amigas e companheiras de estadia Geilza Carla, Danielle Rocha e Dayanne Casimiro, pela compreensão e amizade;

Aos amigos do laboratório do Professor Rafael Ximenes, Fatinha, Simone, Raudiney, Wellington, Camila e João;

Aos amigos Anita, André, Daniele Madruga, Kethyane Gama, Kaisy Martins, Moana Paixão, Danielle Monteiro, Leillany Nunes, Arthur Sales, Hudson Arruda, Michelly Zueiroga e Nelson Justino,

Aos funcionários Cláudia (Veterinária) e Seu Fredson, pela atenção diária e apoio.

A Capes, Facepe e CNPq, pelo apoio e suporte financeiro.

A todos e todas que participaram do desenvolvimento desta tese.

MUITO OBRIGADA!

Cynthia Layse.

“Seus frutos servirão de alimento, e suas folhas, de remédio.”

Ezequiel 47:12

RESUMO

Spondias purpurea tem seus frutos e folhas utilizados na medicina popular como antidiarreico, antiespasmódico, diurético e antitérmico. Estudos indicam a presença de taninos, flavonoides e triterpenos em suas folhas e raízes. Com o objetivo de avaliar as atividades antioxidante e gastroprotetora, foram obtidos os extratos hexânico (EHSp), acetato de etila (EASp) e etanólico (EESp) que foram submetidos aos protocolos de caracterização fitoquímica, antioxidante, toxicológica e farmacológica. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância de uma via. Na prospecção fitoquímica, foram encontrados flavonoides, derivados cinâmicos, terpenos e esteroides na cromatografia em camada delgada, e na cromatografia líquida de alta eficiência, foram encontrados ácido cafeico e epigalocatequina no EHSp, e ácido tânico, nos extratos EASp e EESp. Os ensaios antioxidantes demonstraram relevante atividade dos extratos nos métodos. Na avaliação do potencial hemolítico, os extratos não foram capazes de induzir hemólise. A administração de 2.000 mg/kg do EHSp e EASp não causou alterações. Com relação à atividade gastroprotetora, EHSp foi testado em diferentes modelos de indução aguda de úlcera. No modelo de HCl/etanol, etanol e AINE, EHSp promoveu redução do índice de lesão ulcerativo quando comparado ao controle. EHSp protegeu as mucosas gástricas, conforme constatado pelas análises histopatológicas, bem como houve aumento nas concentrações de GSH e redução de TNF- α . Para a ligadura do piloro, foi verificado que EHSp reduziu o conteúdo secretório gástrico. Nos mecanismos de ação foi verificado que o efeito gastroprotetor de EHSp não envolve NO, mas tem a participação dos grupamentos sulfidrílicos e o aumento da produção de muco aderido à mucosa. O teste de migração celular demonstrou um aumento na taxa de confluência das células endoteliais. No modelo de ácido acético, houve cicatrização das úlceras e acentuada atividade proliferativa das células na análise imunohistoquímica com Ki-67 e BrdU. Estes dados indicam que *S. purpurea* tem propriedade antiulcerogênica, possivelmente relacionada aos mecanismos antioxidantes, antissecretórios e citoprotetores, além de possuir baixa toxicidade.

Palavras-chave: Anacardiaceae. Úlceras gástricas. Proteção gástrica. Cicatrização.

ABSTRACT

Spondias purpurea has its fruits and leaves used in folk medicine as antidiarrheal, antispasmodic, diuretic, and antipyretic. Studies indicate the presence of tannins, flavonoids, and triterpenes in their leaves and roots. In order to evaluate the antioxidant and gastroprotective activities, the hexane (SpHE), ethyl acetate (SpAE) and ethanolic (SpEE) extracts were obtained and submitted to phytochemical, antioxidant, toxicological, and pharmacological characterization protocols. The results were expressed as mean \pm standard deviation and submitted to one-way analysis of variance. In phytochemical prospection were found flavonoids, cinnamic derivates, terpens and steroids in the thin layer chromatography, and in high efficiency liquid chromatography were found caffeic acid and epigallocatechin in SpHE, and tannic acid, in SpAE and SpEE. Antioxidant assays demonstrated significant extractive activity in the methods. In the evaluation of hemolytic potential, the extracts were not able to induce hemolysis. The administration of 2000 mg/kg SpHE and SpAE did not cause changes. Regarding the gastroprotective activity, SpHE were tested in different models of acute ulcer induction. In the HCl/ethanol, ethanol and NSAID models, SpHE promoted reduction of the ulcerative lesion index when compared to the injured control. EHSp protected the gastric mucosa, as evidenced by the histopathological analyzes, as well as there was an increase in the concentrations of GSH and reduction of TNF- α . For pylrous ligation, it was verified that EHSp reduced the secretory gastric content. In the mechanisms of action it was verified that the gastroprotective effect of EHSp does not involve NO, but it has the participation of the sulfhydryl groups and the increase of the mucous production adhered to the mucosa. The cell migration test demonstrated an increase in the confluence rate of endothelial cells receiving EHSp. In model of acetic acid, treatment resulted in healing of ulcers, and marked proliferative activity of the cells in the immunohistochemical analysis with the Ki-67 and BrdU markers. These data indicate that *S. purpurea* has an antiulcerogenic property, possibly related to the antioxidant, antisecretory, and cytoprotective mechanisms, besides having low toxicity.

Keywords: Anacardiaceae. Gastric ulcers. Gastric protection. Healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Corte histológico do estômago.....	28
Figura 2 - Os tipos de glândulas gástricas, as células predominantes e suas secreções.....	29
Figura 3 - Secreção ácida gástrica e mecanismos moleculares.....	32
Figura 4 - A espécie <i>Spondias purpurea</i> L. (Anacardiaceae).	38
Figura 5 - Fluxograma experimental.....	41
Figura 6 - Modelo para cálculo de teste de migração celular.	56
Figura 7 - Cromatograma comparativo do extrato hexânico de <i>Spondias purpurea</i> (EHSp). (A) ácido cafeico (26 min), (B) epigallocatequina (32,25 min).	61
Figura 8 - Cromatograma comparativo do extrato acetato de etila de <i>Spondias purpurea</i> (EASp) e do ácido tânico.	62
Figura 9 - Cromatograma comparativo do extrato etanólico de <i>Spondias purpurea</i> (EESp) e do ácido tânico.....	62
Figura 10 - Efeito da administração oral do EHSp em úlceras induzidas por HCl/etanol em camundongos Swiss.....	73
Figura 11 - Estômagos de camundongos pré-tratados (v.o.) com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado, CL (A), lansoprazol 30 mg/kg (B), EHSp (12,5 mg/kg) (C), EHSp (25 mg/kg) (D) e EHSp (50 mg/kg) (E) no modelo de HCl/etanol.	74
Figura 12 - Efeito da administração oral do EHSp em úlceras induzidas por etanol em ratos Wistar.	75

Figura 13 - Estômagos de camundongos pré-tratados (v.o.) com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado, CL (A), lansoprazol 30 mg/kg (B), EHSp (12,5 mg/kg) (C), EHSp (25 mg/kg) (D) e EHSp (50 mg/kg) (E) no modelo de etanol.....	76
Figura 14 - Efeito da administração oral do EHSp em úlceras induzidas por anti-inflamatório não esteroide (indometacina) em ratos Wistar.....	77
Figura 15 - Estômagos de camundongos pré-tratados (v.o.) com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado, CL (A), lansoprazol 30 mg/kg (B), EHSp (12,5 mg/kg) (C), EHSp (25 mg/kg) (D) e EHSp (50 mg/kg) (E) no modelo de AINE (indometacina).....	77
Figura 16 - Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos submetidos à indução de úlceras com HCl/etanol.....	80
Figura 17 - Análise histopatológica da mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de úlceras com etanol absoluto.	81
Figura 18 - Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos submetidos à indução de úlceras com AINE (indometacina).	82
Figura 19 - Efeito da administração oral do EHSp nas concentrações de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por HCl/etanol (A), etanol (B) e AINE (C).	85
Figura 20 - Efeito da administração oral do EHSp nas concentrações de fator de necrose tumoral α (TNF- α) na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por HCl/etanol (A), etanol (B) e AINE (C).	87
Figura 21 - Efeito da administração oral do EHSp nas concentrações de fator de óxido nítrico (NO) na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por HCl/etanol (A), etanol (B) e AINE (C).	90

Figura 22 - Efeito da administração oral de EHSp e carbenoxolona após pré-tratamento com L-NAME (i.p.) na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.	93
Figura 23 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução aquosa de Tween 80 1% e tratados com solução aquosa de Tween 80 1% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e EHSp (25 mg/kg) (C); ou pré-tratados com L-NAME e tratados com solução aquosa de Tween 80 1% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e EHSp (25 mg/kg) (F) no modelo de avaliação da participação do óxido nítrico na gastroproteção.	93
Figura 24 - Efeito da administração oral de EHSp e carbenoxolona após pré-tratamento com NEM (i.p.) na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.	95
Figura 25 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução aquosa de Tween 80 1% e tratados com solução aquosa de Tween 80 1% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e EHSp (25 mg/kg) (C); ou pré-tratados com NEM e tratados com solução aquosa de Tween 80 1% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e EHSp (25 mg/kg) (F) no modelo de avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção.	96
Figura 26 - Efeito da administração oral do EHSp e carbenoxolona sobre o conteúdo de muco gástrico após ligadura do piloro em ratos.	97
Figura 27 - Efeito do EHSp no fechamento da injúria endotelial e migração celular.	99
Figura 28 - Efeito da administração oral de ranitidina e EHSp nas úlceras induzidas por ácido acético em ratos.	101
Figura 29 - Análise histopatológica das mucosas gástricas coradas com HE e PAS de ratos submetidos à indução de úlceras com ácido acético.	103
Figura 30 - Análise imunohistoquímica por Ki-67 e BrdU das mucosas gástricas de ratos submetidos à indução de úlceras com ácido acético.	105

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Caracterização fitoquímica dos extratos de *Spondias purpurea* L por cromatografia em camada delgada. 42
- Tabela 2** - Padrões analíticos (Substância Química de Referência - SQR) e seus respectivos parâmetros cromatográficos obtidos pelo método de CLAE. 44
- Tabela 3** - Parâmetros relacionados aos padrões utilizados em CLAE. 45
- Tabela 4** - Classes de metabólitos secundários encontradas nos extratos das folhas de *Spondias purpurea*. 60
- Tabela 5** - Teor de fenóis totais presentes nos extratos das folhas de *Spondias purpurea*. 64
- Tabela 6** - Atividade antioxidante dos extratos de *Spondias purpurea* pelo método de fosfomolibdênio. 65
- Tabela 7** - Atividade antioxidante dos extratos de *S. purpurea* por redução de ferro. 66
- Tabela 8** - Atividade antioxidante dos extratos de *S. purpurea* por sequestro de ABTS em 6, 30 e 60 minutos. 66
- Tabela 9** - Atividade antioxidante dos extratos de *S. purpurea* por sequestro de DPPH. 67
- Tabela 10** - Efeito da administração oral de EASp e EHSp obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. e solução aquosa de Tween 80 1% (controle) no consumo de ração e água, ganho de massa corporal e massa dos órgãos por camundongos fêmeas, durante 14 dias. 69

Tabela 11 - Efeito da administração oral de EHSp e EASp obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. e solução aquosa de Tween 80 1% (controle) nos parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas, durante 14 dias. 71

Tabela 12 - Efeito da administração oral de EHSp e EASp obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. e solução aquosa de Tween 80 1% (controle) nos parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas, durante 14 dias. 71

Tabela 13 - Efeito da administração intraduodenal de ranitidina e EHSp sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura do piloro em ratos. 92

Tabela 14 - Efeito da administração oral da ranitidina e do EHSp durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético. 106

Tabela 15 - Efeito da administração oral da ranitidina e do EHSp durante 14 dias sobre a massa dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético. 106

Tabela 16 - Efeito da administração oral da ranitidina e do EHSp durante 14 dias sobre o índice relativo dos órgãos dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético. 107

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAT	Atividade antioxidante total
Abs	Absorbância
ABTS⁺	2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ACh	Acetilcolina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ALT	Alanina aminotransferase
ALU	Área de lesão ulcerativa
AMP_c	3',5'- monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância de uma via
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AST	Aspartato aminotransferase
Biofarmatox	Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos
BrdU	Bromodeoxiuridina
Ca²⁺	Íon cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CCK-2	Receptor de colecistocinina 2
CE₅₀	Concentração de efeito 50%
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl⁻	Íon cloreto
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
d.p.	Desvio padrão
DL₅₀	Dose Letal 50%
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil1-picrilhidrazil
DTNB	5,5-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico
EAG	Equivalente ácido gálico
EASp	Extrato acetato de etila de <i>Spondias purpurea</i>

EC	Células enterocromafins
ECL	Células enterocromafins símiles
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EESp	Extrato etanólico de <i>Spondias purpurea</i>
EHSp	Extrato hexânico de <i>Spondias purpurea</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EP₃	Receptor de prostaglandina E ₃
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ET	Equivalente trolox
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
G_{q/11}	Proteína G _q ou proteína 11
GSH	glutathiona reduzida
H⁺	Próton
H⁺-K⁺-ATPase	Bomba de prótons
H₂S	Ácido sulfídrico
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCO₃⁻	Íon bicarbonato
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
i.p.	Intraperitoneal
IBPs	Inibidores de bomba de prótons
ILU	Índice de Lesão Ulcerativo
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
K⁺	Íon potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LB	Liebermann-Burchard
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina-metil-éster
Na⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio

NEM	N-etilmaleimida
NEU	Acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, água
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
P	Probabilidade
PG	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandina da série E
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína cinase dependente de AMP _c
PLC	Fosfolipase C
PVDF	Polifluoreto de vinilideno
s.c.	Subcutânea
SBF	Soro bovino fetal
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SST₂	Receptor de somatostatina 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Geral	26
2.2 Específicos	26
3 REFERENCIAL TEÓRICO	28
3.1 O estômago	28
3.2 A secreção ácida gástrica	30
3.3 Mecanismos regulatórios da secreção ácida	31
3.4 Úlceras pépticas	33
3.5 Terapêutica das úlceras pépticas	34
3.6 Considerações botânicas	36
3.6.1 Família Anacardiaceae.....	36
3.6.2 Gênero <i>Spondias</i>	36
3.6.3 <i>Spondias purpurea</i> L.	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Material	40
4.1.1 Material botânico	40
4.1.2 Animais.....	40
4.2 Métodos	41
4.2.1 Obtenção dos extratos vegetais	42
4.2.2 Perfil fitoquímico dos extratos	42
4.2.2.1 <i>Análise por cromatografia em camada delgada</i>	42
4.2.2.2 <i>Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	43
4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	45
4.2.3.1 <i>Dosagem de fenóis totais</i>	45
4.2.3.2 <i>Avaliação da atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio</i>	46
4.2.3.3 <i>Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro</i>	46
4.2.3.4 <i>Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS</i>	47
4.2.3.5 <i>Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH</i>	47
4.2.4 Ensaio toxicológicos	48
4.2.4.1 <i>Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos</i>	48
4.2.4.2 <i>Ensaio toxicológico não clínico agudo</i>	48

4.2.5 Avaliação da atividade gastroprotetora de <i>Spondias purpurea</i>	49
4.2.5.1 Modelos de indução aguda	49
4.2.5.1.1 Úlcera gástrica aguda induzida por HCl/Etanol	49
4.2.5.1.2 Úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto.....	50
4.2.5.1.3 Úlcera gástrica aguda induzida por indometacina.....	50
4.2.5.2 Análise histopatológica da mucosa gástrica	51
4.2.5.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	51
4.2.5.3.1 Determinação da concentração de GSH	51
4.2.5.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória	52
4.2.5.4.1 Determinação da concentração de TNF-α.....	52
4.2.5.4.2 Determinação da concentração de óxido nítrico.....	52
4.2.6 Mecanismos de ação gastroprotetores de <i>Spondias purpurea</i>	53
4.2.6.1 Atividade antissecretória após ligadura do piloro	53
4.2.6.2 Avaliação da participação do óxido nítrico	53
4.2.6.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos	54
4.2.6.4 Avaliação da participação de muco aderido à parede gástrica	54
4.2.7 Avaliação da atividade cicatrizante de <i>Spondias purpurea</i>	55
4.2.7.1 Teste de migração celular <i>in vitro</i>	55
4.2.7.2 Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i>	56
4.2.7.3 Análise histopatológica.....	57
4.2.7.3 Análise imunohistoquímica.....	57
4.2.7.4 Avaliação da toxicidade de doses repetidas durante 14 dias	58
4.3 Análise estatística	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Perfil fitoquímico dos extratos	60
5.1.1 Análise por cromatografia em camada delgada	60
5.1.2 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	61
5.2 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>.....	63
5.2.1 Dosagem de fenóis totais	64
5.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio.....	65
5.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).....	65
5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS	66
5.2.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH.....	67
5.3 Ensaios toxicológicos.....	68

5.3.1 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos	68
5.3.2 Ensaio toxicológico não clínico agudo.....	69
5.4 Avaliação da atividade gastroprotetora de <i>Spondias purpurea</i>.....	72
5.4.1 Modelos de indução aguda	72
5.4.1.1 Úlcera gástrica aguda induzida por HCl/etanol	72
5.4.1.2 Úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto.....	74
5.4.1.3 Úlcera gástrica aguda induzida por indometacina.....	76
5.4.2 Análise histopatológica da mucosa gástrica.....	78
5.5 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>.....	83
5.5.1 Determinação da concentração de GSH.....	83
5.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória	86
5.6.1 Determinação da concentração de TNF- α	86
5.6.2 Determinação da concentração de NO	88
5.7 Mecanismos de ação gastroprotetores de <i>Spondias purpurea</i>	91
5.7.1 Atividade antissecretória após ligadura do piloro	91
5.7.2 Avaliação da participação do óxido nítrico	92
5.7.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos	94
5.7.4 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica	96
5.8 Avaliação da atividade cicatrizante de <i>Spondias purpurea</i>.....	97
5.8.1 Teste de migração celular <i>in vitro</i>	97
5.8.2 Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i>	100
5.8.3 Análise histopatológica.....	101
5.8.4 Análise imunohistoquímica.....	104
5.8.5 Avaliação da toxicidade de doses repetidas durante 14 dias	106
6 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS.....	111
ANEXOS	136
Anexo A – Comitê de ética	136
Anexo B – Tabela de toxicidade.....	137
Anexo C – Aceite do artigo.....	138

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As úlceras pépticas englobam lesões inflamatórias ou necrotizantes que podem atingir as mucosas do esôfago, estômago ou duodeno e são causadas por um desequilíbrio entre os fatores defensores e agressores da mucosa (NASCIMENTO et al., 2015; ARAGÃO et al., 2018).

Estas úlceras acometem cerca de 4 milhões de pessoas no mundo, sendo as mulheres as representantes de mais da metade dos casos. Os sintomas compreendem dor epigástrica, sensação de plenitude, sangramento, obstrução, e cerca de 20% dos acometidos não tratados evoluem para perfurações. Embora sejam raras, estas complicações são potencialmente fatais e geram uma taxa de mortalidade em torno de 10 a 40% (BANSAL et al., 2009; ZELICKSON et al., 2011; THORSEN et al., 2013).

Apesar da disponibilidade de terapias efetivas, como antagonistas dos receptores H₂ e inibidores da bomba de prótons (IBPs), vários fatores limitam o uso destes agentes, como a alta taxa de recidiva da doença, as interações medicamentosas e os efeitos colaterais decorrentes do uso a longo prazo (DEVAULT; TALLEY, 2009). Portanto, é essencial pesquisar e desenvolver novas alternativas terapêuticas que demonstrem boa eficácia com menos efeitos indesejáveis, bem como terapias que promovam a cicatrização das úlceras e a prevenção da recorrência da doença.

Nesta perspectiva, a utilização dos produtos naturais surge como uma prática milenar e é fonte de potenciais metabólitos para o desenvolvimento de novos medicamentos (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). Países desenvolvidos trazem em seu componente histórico esta tradição e aproximadamente 30% dos fármacos utilizados são derivados destes produtos, sobretudo, de plantas medicinais (VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008; WHO, 2011).

As plantas medicinais representam uma escolha segura, eficaz e de baixo custo. Devido ao acesso limitado aos medicamentos e ao fator cultural, cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento as utiliza na terapêutica dos mais diversos tipos de males (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; WHO, 2011).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade mundial e abriga cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Contudo, as plantas medicinais são utilizadas de forma empírica, com pouco ou nenhum estudo de suas propriedades

farmacológicas e mecanismos de ação (RABELO et al., 2013). Estima-se que 82% da população brasileira faz uso destas plantas, seja pelo uso popular transmitido de geração a geração ou pelo conhecimento tradicional (VEIGA-JUNIOR, 2008; RODRIGUES; DE SIMONI, 2010).

Existe uma ampla variedade de espécies vegetais empregadas no tratamento dos distúrbios gastrintestinais. No Brasil, a atividade antiulcerogênica de plantas como *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008), *Virola surinamensis* (HIRUMA-LIMA et al., 2009), *Hyptis martiusii* (ROCHA CALDAS et al., 2015), *Xylopia langsdorffiana* (MONTENEGRO et al., 2014) e *Maytenus distichophylla* (CALDAS-FILHO, 2013) foi comprovada e este efeito farmacológico se deve aos diferentes metabólitos secundários presentes, como compostos fenólicos, terpenos e alcaloides.

Nesse cenário, *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae), conhecida como "serigueleira", uma planta nativa do semiárido brasileiro com suas partes aéreas utilizadas na medicina popular para tratamento de distúrbios gástricos foi selecionada para a presente pesquisa (CACERES et al., 1990; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; ENGELS et al., 2012).

Trabalhos com a espécie são raros e, embora suas folhas sejam utilizadas pela população, na literatura não há trabalhos referentes à composição fitoquímica. Já para o fruto, foram encontrados os pigmentos carotenoides luteína e zeaxantina, ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico) e flavonóis O-glicosídeos de quercetina, kaempferol e ramnetina (ENGELS et al., 2012). Na polpa fresca foi possível identificar cetonas, álcoois, aldeídos, ésteres e terpenos, e os principais compostos isolados foram hexanal, trans-2-hexanal, 3-hexen-1-ol, 2-hexen-1-ol (CEVA-ANTUNES et al., 2016). Propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora também foram relatadas para o extrato etanólico das folhas de *S. purpurea* (ALMEIDA, 2013; OLIVEIRA, 2014).

Diante disso, foi proposto o estudo fitoquímico e farmacológico, bem como a avaliação da segurança de uso dos extratos das folhas de *S. purpurea*, como possibilidade de constituir o leque de alternativas eficazes para o tratamento das doenças associadas ao trato gastrintestinal.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a composição fitoquímica, verificar a toxicidade e avaliar as atividades antioxidante e gastroprotetora dos extratos obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae).

2.2 Específicos

- ✓ Identificar os principais constituintes químicos dos extratos das folhas de *S. purpurea*;
- ✓ Pesquisar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico das folhas de *S. purpurea* por diferentes métodos;
- ✓ Determinar o potencial hemolítico e a toxicidade aguda não clínica dos extratos das folhas de *S. purpurea*;
- ✓ Avaliar a atividade gastroprotetora do extrato hexânico das folhas de *S. purpurea* em modelos agudos *in vivo* de úlcera induzida por etanol acidificado, etanol absoluto e anti-inflamatório não esteroide;
- ✓ Realizar a análise histopatológica e determinar as concentrações de parâmetros antioxidante (glutathione reduzida) e anti-inflamatórios (fator de necrose tumoral α e óxido nítrico) do tecido estomacal de animais tratados com extrato hexânico de *S. purpurea*;
- ✓ Investigar os mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *S. purpurea*, a partir da atividade antissecretória, participação do óxido nítrico, grupamentos sulfidrílicos e produção de muco;
- ✓ Descobrir a atividade cicatrizante do extrato hexânico das folhas de *S. purpurea* pelo teste *in vitro* de migração celular e pelo modelo crônico de lesão gástrica induzida por ácido acético em ratos, bem como realizar as análises histopatológica e imunohistoquímica para confirmar esta atividade.

Referencial Teórico

3 REFERENCIAL TEÓRICO

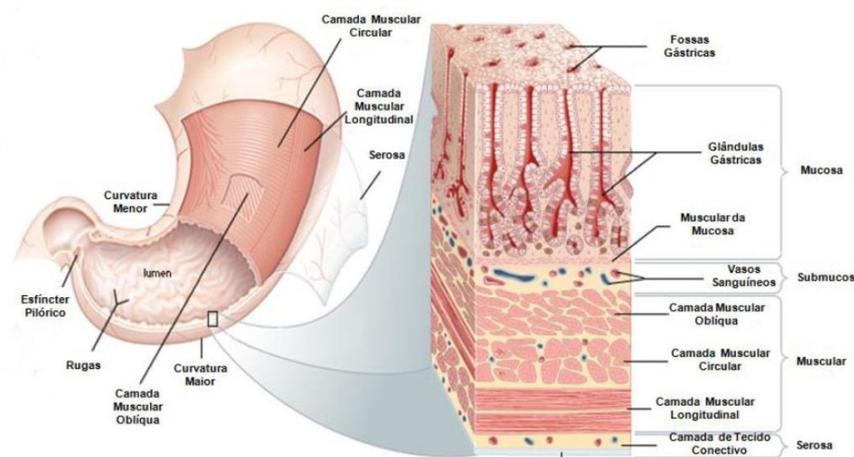
3.1 O estômago

O estômago compreende um órgão dilatado do trato gastrointestinal que atua como um reservatório responsável por realizar os processos de digestão e absorção de substâncias, além de armazenar os alimentos e distribuí-los para o intestino de maneira regulada (FEHER, 2012; SCHUBERT, 2014).

Com relação à anatomia, o estômago apresenta uma curvatura maior e outra menor, está situado entre o esôfago e o duodeno, delimitado pelo esfíncter esofágico inferior e pelo esfíncter pilórico, respectivamente, e se subdivide em quatro regiões: cárdia, fundo, corpo e piloro. A cárdia corresponde a 5% da área da superfície gástrica e é considerada uma zona de transição que se sobrepõe ao esfíncter esofágico inferior. O fundo e o corpo gástrico contêm cerca de 80% das glândulas gástricas oxínticas ou parietais, constituídas de células produtoras das secreções características do estômago. Já na região pilórica, há a predominância de glândulas secretoras de gastrina (BANSAL et al., 2009; FEHER, 2012; BERI et al., 2013).

Histologicamente, a parede estomacal é subdividida em camada mucosa, mais interna; submucosa, formada de tecido conjuntivo frouxo; muscular (subdividida em longitudinal externa, circular e oblíqua interna) e serosa, que envolve o órgão (BANSAL et al., 2009) (Figura 1).

Figura 1 - Corte histológico do estômago.

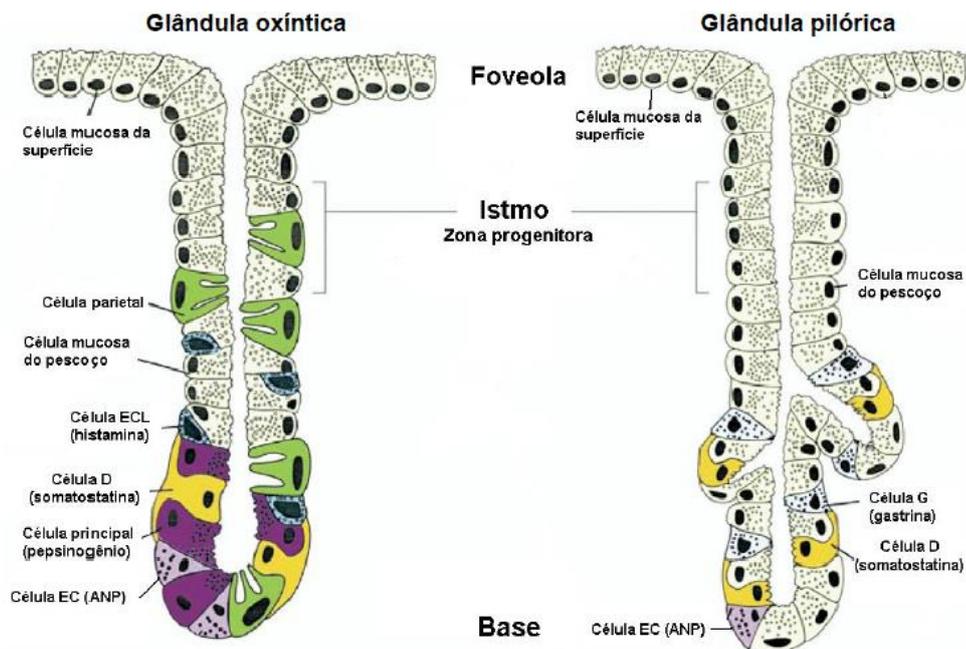


Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013.

Na mucosa, o epitélio colunar de revestimento secreta muco e bicarbonato (fatores defensores) e sofre invaginações com uma série de foveólas gástricas. Cada foveóla se abre em 4 ou 5 glândulas gástricas, do tipo oxínticas ou pilóricas, que são unidades funcionais formadas de uma variedade de tipos celulares específicos (SCHUBERT; PEURA, 2008; FRY, 2009; FEHER, 2012).

Com relação à funcionalidade, o estômago se subdivide em três regiões. A região inicial, abaixo do esfíncter esofágico, é responsável pela produção de muco. A região oxíntica é composta de células do pescoço, produtoras de muco; de células parietais ou oxínticas, que secretam ácido clorídrico e fator intrínseco; e de células pépticas ou principais, de localização mais basal na glândula e que produzem e armazenam o pepsinogênio em grânulos apicais. Há, ainda, as células endócrinas, a exemplo das células enterocromafins-símiles (ECL), que sintetizam e liberam histamina, um importante regulador endócrino da secreção ácida gástrica; células enterocromafins (EC), produtoras de peptídeo natriurético atrial (ANP) e serotonina; e células D, produtoras de amilina e somatostatina, uma substância parácrina inibitória. Por fim, na região do antro pilórico há células produtoras de muco e células G produtoras de gastrina (FRY, 2009; MILLS; SHIVDASANI, 2011; CHU, SCHUBERT, 2012) (Figura 2).

Figura 2 - Os tipos de glândulas gástricas, as células predominantes e suas secreções.



Fonte: SCHUBERT; PEURA, 2008 (Adaptado).

O estômago é inervado pelas vias aferentes e eferentes que partem dos nervos do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. A notável inervação aferente vagal transmite e integra a informação proveniente dos centros superiores, como o hipotálamo, a fim de estabelecer a função secretora. Os eferentes dos receptores gustativos alcançam o núcleo do trato solitário onde a informação é traduzida também em sinais ativadores da secreção. Ademais, os plexos nervosos entéricos, uma rede de neurônios conhecida por “pequeno cérebro” conferem certo grau de função autônoma e atuam na regulação de mediadores da secreção ácida gástrica. Os neurônios pós-ganglionares podem ser colinérgicos, quando liberam acetilcolina (ACh), ou neurônios não-adrenérgicos não-colinérgicos, quando liberam outros neurotransmissores, a exemplo do óxido nítrico (NO) e da substância P (SCHUBERT; PEURA, 2008; CHU, SCHUBERT, 2012).

3.2 A secreção ácida gástrica

Variados mecanismos permitem o controle da secreção ácida e estão intimamente relacionados com o deslocamento do bolo alimentar pelo trato gastrintestinal. A secreção ácida auxilia na conversão deste bolo em quimo, destrói bactérias e realiza a digestão de proteínas e gorduras. Diante de um estímulo, a taxa de secreção pode aumentar cerca de dez vezes mais. O suco gástrico presente no estômago é constituído por ácido clorídrico (HCl), pepsina, mucina e eletrólitos, como os íons sódio (Na^+), potássio (K^+), bicarbonato (HCO_3^-) e cloreto (Cl^-) (FRY, 2009; WALDUM; HAUSO; FOSSMARK, 2014).

O HCl é produzido nas células parietais especializadas que abrangem uma rede de pequenos canais, denominados canalículos que se fundem com a membrana plasmática apical. As tubulovesículas intracelulares também se unem aos canalículos, o que amplifica em 5 a 10 vezes a área de superfície de membrana em contato com o lúmen glandular. Estas vesículas também são o local de armazenamento da maior parte de um transportador ligado à membrana, a bomba de prótons (H^+/K^+ -ATPase) (FRY, 2009; FEHER, 2012; BERRIDGE, 2012).

A célula parietal secreta HCl por um mecanismo de transporte ativo dependente de trifosfato de adenosina (ATP). A H^+/K^+ -ATPase é formada de duas subunidades, sendo a subunidade α a que contém o sítio catalítico. Por meio desta enzima, ocorre a saída de íons H^+ para o lúmen gástrico e de K^+ para o meio intracelular. Os íons

K^+ , por sua vez, retornam para o lúmen gástrico por meio do cotransporte com íons Cl^- na porção apical da célula. Estes íons Cl^- irão reagir com os íons H^+ presentes no lúmen para formar o HCl. Já na superfície basolateral, íons HCO_3^- são direcionados para o sangue, o que gera uma maré alcalina (FRY, 2009; FEHER, 2012).

3.3 Mecanismos regulatórios da secreção ácida

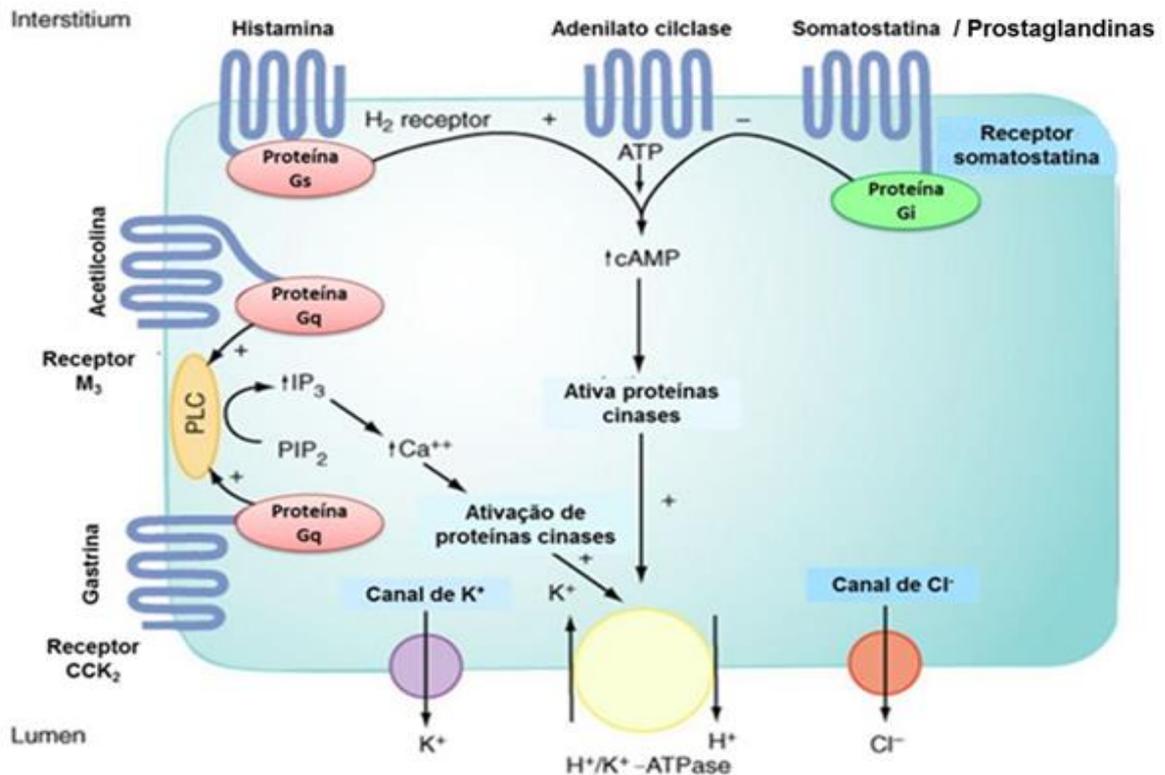
O controle da secreção ácida é complexo e envolve as sinalizações neurócrina, representada pela acetilcolina; parácrina, exercida pela histamina; e endócrina, pela gastrina. Os receptores para estes secretagogos estão localizados na membrana basolateral da célula parietal e são responsáveis pela produção do HCl. A secreção também pode ser estimulada por outras substâncias, tais como a cafeína e o álcool (SCHUBERT; PEURA, 2008; FRY, 2009; STENGEL et al., 2013).

A ACh é liberada das fibras da mucosa do fundo do estômago, estimula a célula parietal diretamente via receptores muscarínicos do tipo M_3 que acoplados à proteína $G_{q/11}$ promovem a ativação da fosfolipase C beta 1 ($PLC-\beta_1$), com consequente geração de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e o aumento da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Este mecanismo ativa proteínas cinases, que regulam a fusão das vesículas contendo a H^+/K^+ -ATPase com a membrana apical destas células (SCHUBERT, 2011; BERRIDGE, 2012).

A ACh também ativa receptores do tipo M_2 e M_4 presentes nas células D e inibe a liberação de ANP e a secreção da somatostatina. Além disto, estimula a liberação de gastrina por ativar os receptores M_3 presentes nas células G, ativa a cascata de sinalização do Ca^{2+} e a secreção de histamina das células ECL (BANSAL et al., 2009; SCHUBERT, 2011).

A gastrina, agonista endócrino da secreção, é liberada na corrente sanguínea a partir das células G do antro e do duodeno. Assim, estimula de forma direta os receptores de colecistocinina 2 (CCK-2) das células parietais, os quais acoplados a proteína $G_{q/11}$, ativam a via da $PLC-\beta_1$, o que provoca o aumento da concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ e permite a fusão das vesículas contendo a H^+/K^+ -ATPase com a membrana apical. A principal forma da gastrina estimular a secreção ácida é a indireta, a partir da ligação com os receptores CCK-2 presentes nas células ECL, promovendo a liberação de histamina (SCHUBERT; PEURA, 2008; SCHUBERT, 2011; KOPIC, GEIBEL, 2013).

Figura 3 - Secreção ácida gástrica e mecanismos moleculares.



Fonte: <http://www.misodor.com/estomago%20cirurgical.html> (Adaptado) - Acesso em: 31 jan 2018).

A histamina, por sua vez, é liberada das células ECL das glândulas oxínticas e dos mastócitos, se liga ao receptor do tipo H₂ acoplado à proteína estimulatória G_s na célula parietal. Esta proteína ativa a enzima ciclase de adenilil (AC) que permite a conversão de ATP em adenosina 3' 5' monofosfato-cíclico (AMPc). O aumento de AMPc estimula a proteína quinase dependente de AMPc tipo A (PKA), que fosforila substratos, ativa a H⁺/K⁺-ATPase e permite a extrusão de H⁺ para o lúmen gástrico e a entrada de K⁺ na célula. Assim, ocorre a estimulação direta da secreção ácida via parácrina (BANSAL et al., 2009; FRY, 2009, BERRIDGE, 2012).

A histamina é considerada um potente vasodilatador e estimula de forma indireta a secreção pela interação com os receptores H₃ das células D, ligados à inibição da somatostatina, bem como pelo estímulo à liberação de gastrina e histamina (GUSTAFSSON et al., 2011).

Ademais, a somatostatina, as prostaglandinas (PGs) e a secretina também estão envolvidas no processo de inibição da secreção ácida. A somatostatina, liberada pelas células D, atua de forma direta ao inibir as células parietais e a

cascata de sinalização da AC. De maneira indireta, ela se liga no receptor de somatostatina 2 (SST₂), acoplado a proteína Gi, e promove a inibição da liberação de gastrina das células G e de histamina das células ECL e mastócitos (BERRIDGE, 2012; KOPIĆ; GEIBEL, 2013).

A prostaglandina E₂ (PGE₂) melhora a resistência à lesão por meio da redução da secreção ácida basal e estimulada, reforça a secreção de bicarbonato, a produção de muco, a renovação celular e o fluxo sanguíneo local, além de inibir a secreção de histamina. As PGs regulam a secreção ácida gástrica via receptor EP₃, acoplado à proteína Gi, que uma vez ativada, inibe a via da AC na célula parietal (BANSAL et al., 2009).

Devido à acidez do quimo, o hormônio secretina é liberado pelo duodeno e interfere nas células G e parietais, o que gera um efeito inibitório sobre a secreção ácida (FRY, 2009).

A secreção ácida engloba três etapas: as fases cefálica, gástrica e intestinal. Na primeira, os centros cerebrais superiores respondem à visão, odor e sabor dos alimentos e transmitem a informação para o complexo dorsal do vago. Assim, as eferências vagais dão origem aos reflexos motor e secretor e ativam o nervos entéricos a fim de provocar a secreção de ácido no estômago. Na fase gástrica, quantitativamente a mais importante, a secreção ácida é amplificada por estímulos mecânicos e químicos. Na fase intestinal, são liberados os hormônios colecistocinina, secretina, somatostatina e neurotensina com o objetivo de controlar a secreção ácida (FEHER, 2012).

3.4 Úlceras pépticas

As úlceras pépticas (UPs) compreendem as úlceras esofágicas, gástricas e duodenais e são causadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores e defensores da mucosa (MEHTA, 2016).

Os fatores citoprotetores são representados pela barreira de muco-bicarbonato, secreção de mucina, fosfolipídios de superfície, PGs, fluxo sanguíneo da mucosa, renovação celular, enzimas antioxidantes (como a catalase e superóxido dismutase) e fatores de crescimento (ALRASHDI et al., 2012; ATEUFACK et al., 2015).

Os mecanismos agressores resultam da união de fatores endógenos, como HCl, pepsina, refluxo biliar, peroxidação lipídica e formação de radicais livres; e exógenos, relacionados ao estilo de vida contemporâneo, que incluem uso excessivo de álcool, uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), estresse, fumo e a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (MAGIEROWSKI et al., 2015; MEHTA, 2016).

O etanol e seu metabólito, o acetaldeído, são responsáveis por causar grande parte das injúrias gástricas no homem e geram lesões hemorrágicas, edema, esfoliação e infiltração de células inflamatórias (CHEN et al., 2015; WANG et al., 2018).

Os AINEs são ácidos orgânicos fracos, que contêm um ácido carboxílico em sua estrutura, o qual contribui para sua hidrossolubilidade e confere propriedade detergente frente aos fosfolípidios de membrana. São capazes de inibir o reparo, proliferação celular e angiogênese, retardando o processo de cicatrização da mucosa gástrica (BJARNASON et al., 2007; MEHTA, 2016; ARAGÃO et al., 2018).

Efeitos adversos ao trato digestório, ocasionados pela inibição da ciclo-oxigenase (COX) em decorrência do uso de AINEs, vão desde sintomas dispépticos e erosões gástricas até úlceras pépticas com complicações graves, como sangramento ou perfuração (BLANDIZZI et al., 2009; SUZUKI et al., 2012).

As lesões características das UPs comprometem a integridade do revestimento do estômago ou do duodeno, podendo atingir desde as camadas superficiais – mucosa, muscular da mucosa, submucosa, até as mais profundas camadas da parede muscular (BANSAL et al., 2009), o que ocasiona dor epigástrica, sangramento, obstrução, perfuração, que pode até mesmo evoluir para o estado de morte e corresponde ao quadro sintomatológico (PROCTOR; DEANS, 2014).

3.5 Terapêutica das úlceras pépticas

A regulação fisiológica da secreção ácida constitui um importante alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. As múltiplas opções disponíveis no mercado farmacêutico englobam antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas do receptor H₂ para a histamina e inibidores da bomba de prótons (MEHTA, 2016; KAZMI et al., 2017).

Os primeiros a serem desenvolvidos foram os antiácidos, que a partir de uma reação de neutralização com o ácido estomacal, formam água e dióxido de carbono. Os mais usuais são o hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, carbonato de sódio e carbonato de cálcio. Apesar de acessíveis e seguros, não são isentos de efeitos colaterais, como alcalose, náuseas, distensão abdominal, flatulência, diarreia e constipação (MEJIA; KRAFT, 2009).

Devido ao mecanismo de secreção ácida também envolver receptores muscarínicos, surgiram, em seguida, os medicamentos anticolinérgicos, como a pirenzepina. Os anticolinérgicos promovem o bloqueio do receptor dos gânglios intramurais da parede do estômago, o que diminui a dor e a motilidade duodenal. Entretanto, os efeitos indesejáveis englobam boca seca, visão turva, taquicardia e constipação (JAIN et al., 2007).

A histamina, um dos secretagogos responsáveis por ativar a secreção ácida, também é alvo terapêutico para o desenvolvimento de medicamentos, como a cimetidina e a ranitidina. Os antagonistas seletivos do receptor H_2 antagonizam, de forma reversível, a interação de histamina com estes receptores, o que culmina com a redução da concentração de íons H^+ (STEWART; ACKROYD, 2011). Porém, estas opções apresentam efeitos colaterais como ginecomastia em homens, galactorreia em mulheres, impotência, náuseas, tonturas e alterações hematológicas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011).

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs), como o omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, surgiram como um importante avanço no tratamento de úlceras e se tornaram os agentes mais efetivos na supressão da acidez gástrica, ao promoverem a inibição da bomba de prótons da célula parietal de forma irreversível. Contudo, não são isentos de efeitos colaterais, como a hipergastrinemia, hipersecreção rebote, cefaleia, diarreia, náusea e constipação (O'NEIL; LEONARD, 2011).

Já nos casos onde ocorre a infecção pela bactéria *H. pylori*, se faz necessário o emprego da terapia antimicrobiana dupla ou tripla (metronidazol, amoxicilina ou tetraciclina) combinada com drogas antissecretórias (IBPs, como o omeprazol ou antagonista do receptor H_2 , a exemplo da ranitidina) (NAJM, 2011).

Assim, é possível constatar que os medicamentos disponíveis apresentam efeitos indesejáveis, elevada taxa de recidiva e têm alto custo. Portanto, os produtos naturais, sobretudo, oriundos de plantas medicinais, surgem como uma alternativa

de estudo para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas mais seguras e mais acessíveis à população.

3.6 Considerações botânicas

3.6.1 Família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae é constituída por aproximadamente 70 gêneros, subdivididos em cinco tribos (Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae) e 600 espécies, distribuídas entre as regiões tropicais, subtropicais e temperadas (WANNAN, 2006; ENGELS et al., 2012).

No Brasil, foram catalogados apenas 14 gêneros e 57 espécies, sendo que destas, 14 são espécies endêmicas da Caatinga, bioma exclusivo do País, com grande patrimônio biológico para a região semiárida (SILVA-LUZ; PIRANI, 2010; PELL et al., 2011).

Diversas espécies de Anacardiaceae apresentam potencial econômico por fornecerem frutos comestíveis, como *Anacardium occidentale* (cajuzeiro); *Mangifera indica* (mangueira); *Spondias* spp. (cajazeira), *Spondias tuberosa* (umbuzeiro) e *Spondias purpurea* (serigueleira). Além disto, são utilizadas em ornamentações (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Schinus molle* L. e *Rhus succedanea* L.) e no fornecimento de madeira (*Astronium graveolens* Jacq., gonçalo-alves; *Myracrodruon urundeuva* Allemão, aroeira e *Schinopsis brasiliensis* Engl., braúna) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Do ponto de vista químico, os membros desta família são ricos em metabólitos secundários (flavonoides, terpenos, esteroides), particularmente compostos fenólicos com interessantes atividades biológicas, a exemplo do ácido anacárdico, reconhecido por suas propriedades antitumoral, antimicrobiana e antioxidante (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006; WIART, 2006; ENGELS et al., 2012).

3.6.2 Gênero *Spondias*

O gênero *Spondias* recebe esta denominação pela semelhança com o fruto ameixa e é constituído por aproximadamente 14 espécies que são cultivadas e

comercializadas na forma de frutos consumidos *in natura* ou processados (WANNAN, 2006; BACHELIER; ENDRESS, 2009).

Estudos com a espécie *Spondias mangifera* (mangueira) demonstraram atividade gastroprotetora, antidiarreica e antimicrobiana (ARIF et al., 2008; ACHARYYA et al., 2010).

Spondias pinnata, rica em compostos fenólicos, é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diabetes e a atividade hipoglicemiante do extrato das cascas foi comprovada em testes com roedores (SATPATHY; TYAGI; GUPTA, 2011). Ademais, efeitos antioxidante e antimicrobiano dos extratos também foram observados (CHETIA; GOGOI, 2011; DAS et al., 2011; DADUANG et al., 2011; MUHAMMAD et al., 2011).

Spondias dulcis, “cajá-manga”, é outra espécie comum no Nordeste do Brasil, utilizada na medicina tradicional e com estudos comprovados no tratamento do diabetes (MITCHELL; AHMAD, 2006).

Na etnofarmacologia, a cajazeira (*Spondias mombin*) é utilizada para o tratamento de afecções gástricas, gonorreia, malária e como um indutor do trabalho de parto, além da comprovação do seu efeito antidiabético em ratos (AYOKA et al., 2006; GBOLADE; ADEYEMI, 2008; AKINMOLADUN; OBUOTOR; FAROMBI, 2010; IDOWU et al., 2010; IWEALA; OLU DARE, 2011).

Estudo de Dias (2014) revelaram a atividade gastroprotetora, anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Spondias tuberosa* em modelos animais.

No Brasil, estudos realizados com esse gênero se limitam principalmente à descrição das características físico-químicas, maturação, estabilidade e constituintes químicos dos seus frutos (BORGES et al., 2007; ENGELS et al., 2012; GONDIM et al., 2013).

3.6.3 *Spondias purpurea* L.

A espécie *Spondias purpurea* L., conhecida popularmente por serigueleira, é uma planta nativa das regiões semiáridas subtropicais da Mesoamérica, Peru e Brasil. Produz frutos ovais lisos, verdes, amarelos ou vermelhos de até 5,5 cm de comprimento e com uma massa de 12 a 28 g, que são consumidos tanto na forma

natural quanto processada (MILLER; SCHAAL, 2005; BACHELIER; ENDRESS, 2009; ENGELS et al., 2012).

S. purpurea é utilizada com frequência na região amazônica, na forma de suco, para o alívio de febre e dores. Em outros países da América do Sul é empregada no tratamento de problemas renais, diarreia, como antiespasmódico, diurético, analgésico e antianêmico (CACERES et al., 1990; GUERRERO, 1994; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007) (Figura 4).

Figura 4 - A espécie *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae).



Estudos indicam a presença marcante de taninos, flavonoides e triterpenos em suas folhas e raízes (GUERRERO, 1994), constituintes químicos que são marcadores nas plantas com atividade antiulcerogênica.

Os extratos aquosos e metanólico e as cascas de *S. purpurea* foram ativos contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (AGRA; BARBOSA-FILHO, 2007; BERNHARDT, 2008). Ensaio com o extrato etanólico das folhas da serigueleira apresentou atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antidiarreica e gastroprotetora em modelos animais (ALMEIDA, 2013; RAMOS, 2013; OLIVEIRA, 2014).

Diante destas premissas, justifica-se a escolha da espécie para investigar as atividades farmacológicas, sobretudo, em relação à atividade gastroprotetora.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material botânico

O material vegetal utilizado foi obtido a partir das folhas da espécie *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae), coletadas na Fazenda São João, localizada na zona rural do município de Alhandra (S 7°19'54.8", O 34°57'39.5"), Estado da Paraíba, em junho de 2014. Em seguida, uma amostra representativa da espécie contendo flor e fruto foi identificada pela curadora Dra. Rita de Cássia Pereira e depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob número de registro 89986.

4.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos (espécie *Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, machos e fêmeas, com peso entre 25 e 35 g e ratos (espécie *Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, de ambos os sexos, pesando entre 180 e 250 g. Os camundongos foram provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos e os ratos, do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ambos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brasil.

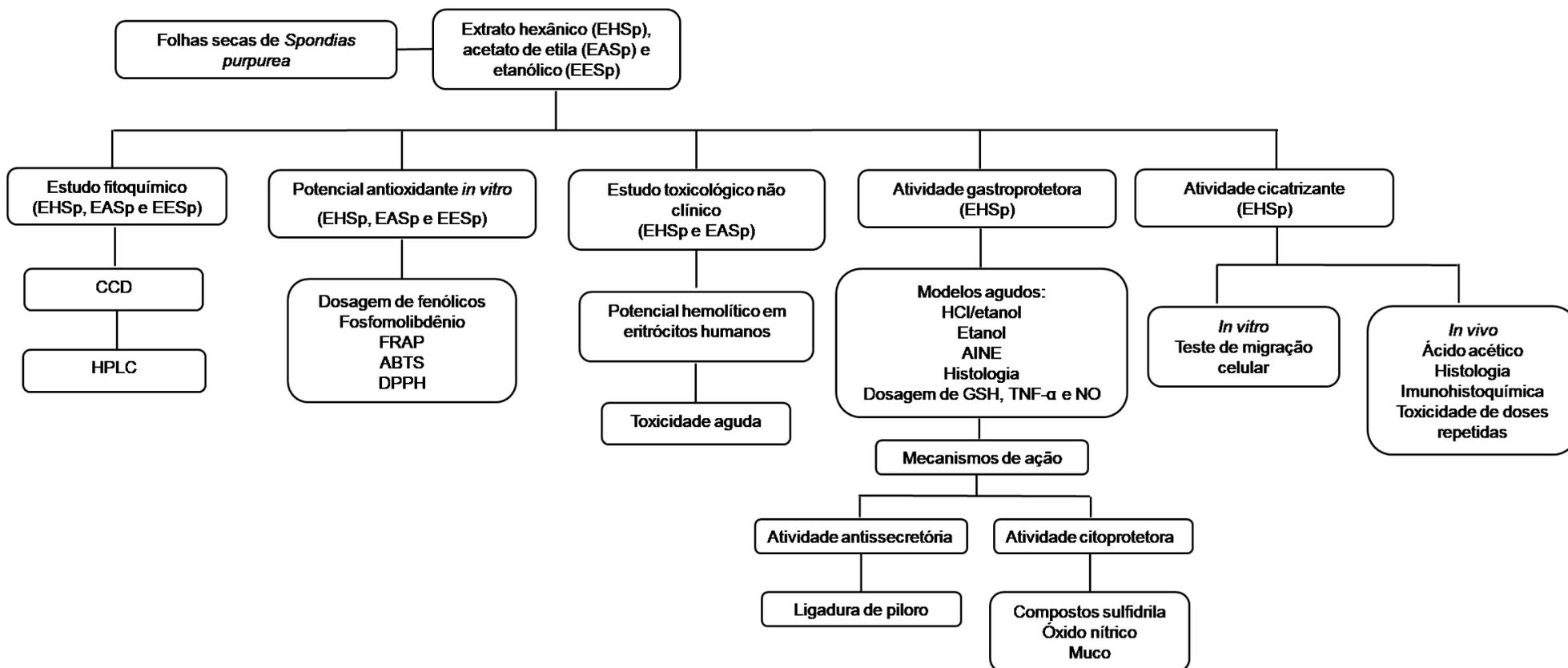
Os animais foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro), temperatura (22 ± 2 °C) e receberam água e ração (Presence, Purina, Brasil) *ad libitum*.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 23076.013615/2015-11) (Anexo 1).

4.2 Métodos

Os métodos utilizados neste estudo foram realizados conforme o fluxograma experimental apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma experimental.



4.2.1 Obtenção dos extratos vegetais

Os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de *S. purpurea* foram obtidos no Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX), do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As folhas de *S. purpurea* coletadas foram expostas à secagem em estufa (40 °C) e, posteriormente, trituradas em moinho de facas. Em seguida, o material vegetal (600 g) foi submetido à maceração a frio com solventes (6 litros) em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e etanol), sob agitação, por três vezes consecutivas, em intervalos de 72 h cada. Os extratos foram filtrados e os solventes foram totalmente retirados com o auxílio de um evaporador rotativo à baixa pressão. Os rendimentos foram de 10, 8 e 6,5% para os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico.

4.2.2 Perfil fitoquímico dos extratos

4.2.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada

A presença dos grupos de metabólitos secundários nos extratos foi avaliada por meio da cromatografia em camada delgada e foram utilizados reveladores químicos específicos (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização fitoquímica dos extratos de *Spondias purpurea* L por cromatografia em camada delgada.

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Reagente revelador	Referência
Flavonoides, cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	derivados e Quercetina, rutina e ácido clorogênico	NEU e cloreto férrico	WAGNER; BLADT, 1996; BRASSEUR; ANGENOT, 1986
Triterpenos e esteroides Mono e sesquiterpenos	β -sitosterol Timol	LB Anisaldeído sulfúrico	HARBORNE, 1998 HARBORNE, 1998
Cumarinas e quinonas	Cumarina Lapachol	KOH	WAGNER; BLADT, 1996
Alcaloides	Pilocarpina	Dragendorff	WAGNER; BLADT, 1996

Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	conden-	Catequina	Vanilina clorídrica	ROBERTS; CARTWRIGHT; OLDSCHOOL, 1957
---	---------	-----------	---------------------	--

Nota: KOH – hidróxido de potássio, NEU- acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, água; LB – Liebermann-Burchard.

4.2.2.2 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a determinação do perfil cromatográfico do extrato hexânico de *S. purpurea*, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) LC-20 (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC-20ADVP, degaseificador modelo DGU-20A, detector PDA modelo SPD-20AVP, forno modelo CTO-20ASVP, injetor automático modelo SIL-20ADVP e controlador modelo SCL-20AVP e acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD). Os dados obtidos foram tratados com o auxílio do *software LC Solution 1.0* (Shimadzu, Tóquio, Japão).

No método inicial, a fase móvel utilizada foi composta de 2 solventes: solvente A - solução de ácido trifluoracético 0,01% diluído em água ultrapurificada e solvente B – acetonitrila 100%, obedecendo ao seguinte gradiente: 0-40 min 90-60% A, 40–50 min 60% A, and 50–60 min 60–90% A, com fluxo de 0,8 mL/min. A fase estacionária foi uma coluna C₁₈ Hypersil (Thermo Fisher Scientific, Runcorn, United Kingdom), com dimensões de 250 x 4,6 mm, tamanho da partícula 5 µm, mantida a 30°C.

Foram realizados ensaios em triplicata, nos quais foram injetados 50 µL da amostra e feito o monitoramento nos comprimentos de onda de 320 nm. Foram analisadas, individualmente, 24 substâncias químicas de referência – SQR (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha), com grau de pureza ≥ 98%, utilizadas para investigar suas presenças no extrato (Tabela 2). Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,22 µm de poro (Chromafil Xtra, EUA). As substâncias químicas de referência foram preparadas individualmente, todas as soluções foram solubilizadas em metanol grau CLAE e submetidas ao processo de sonicação para aprimorar a solubilização das partículas.

Tabela 2 - Padrões analíticos (Substância Química de Referência - SQR) e seus respectivos parâmetros cromatográficos obtidos pelo método de CLAE.

Padrão analítico (SQR)	Tempo de retenção (min)	λ max (nm)
Ácido cafeico	25,91	217/323
Ácido clorogênico	22,19	217/325
Ácido elágico	33,81	251/367
Ácido gálico	4,52	215/271
Ácido p-cumárico	32,02	211/309
Ácido protocatecuíco	12,76	203/293
Ácido tânico	22,72	215/396
Apigenina	52,22	218/337
Borneol	32,02	230/342
Catequina	23,12	212/278
Crisina	69,36	267/313
Epicatequina	27,51	273/400
Epigallocatequina	32,04	204/343
Fisetina	40,80	220/362
Galocatequina	3,47	205
Kaempferol	53,55	214/370
Lupeol	48,24	194/234/298/355
Miricetina	40,66	264/375
Naringenina	34,29	202/344
Quercetina	47,39	254/370
Quercetina 3 β	34,62	270/370
Resveratrol	43,53	327
Rutina	33,24	255/352
Scopoletina	37,24	226/297/343

O extrato etanólico (EESp) e o extrato acetato de etila (EASp) de *S. purpurea* foram analisados em cromatógrafo líquido (Shimadzu, Tóquio, Japão), bombas LC-10ADVP, controladora SCL-10AVP, degaseificador DGU-20A₃, detector SPD-M20A e autoinjeter SIL-20A HT e coluna C18 (Shimadzu, Tóquio, Japão) (150 x 4,6 mm; 5 μ m). O sistema de solventes utilizado continha A: água ultrapura e B: metanol, com

eluição em gradiente em fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL, 5% B 0 min, 5% - 100% B 0 - 15 min, 100% B 15-20 min, 5% B 25 min.

As corridas cromatográficas analíticas foram realizadas com solventes ultrapuros. Na fase móvel foi utilizada água ultrapura e metanol grau CLAE J.T. Baker, filtrado em membrana de nylon 0,45 µm com sistema Supelco, próprio para filtração de solventes.

EESp e EASp, antes de injetados nos cromatógrafos, foram filtrados em filtro de seringa Millipore Millex - HV 0,45 µm PVDF (polifluoreto de vinilideno). Os padrões utilizados foram ácido elágico, ácido tânico, ácido gálico e catequina. Padrões e extratos foram preparados a uma concentração de 1 mg/mL. As amostras foram comparadas por tempo de retenção, espectro UV e coeluição a $\lambda = 260$ nm. Os padrões apresentaram os seguintes parâmetros (Tabela 3):

Tabela 3 - Parâmetros relacionados aos padrões utilizados em CLAE.

Padrão	Tempo de retenção (min)	Lambda máximo
Ácido gálico	5,40	217/269/399/378/429
Catequina	14,0	220/277/430/452/473
Ácido elágico	16,8	198/253/362/443/434

4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos seguintes métodos fotolorimétricos *in vitro*:

4.2.3.1 Dosagem de fenóis totais

As dosagens de compostos fenólicos dos extratos foram determinadas por meio do reagente de Folin-Ciocalteu, com modificações e em triplicata, segundo a metodologia proposta por Li et al. (2008).

Os extratos (1 mg/mL), separadamente, foram adicionados em tubos de ensaios contendo 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:1 v/v) e permaneceram em repouso (protegidos da luz) por 3 minutos. Em seguida, 0,8 mL de carbonato de sódio 7,5% foram adicionados e a mistura foi incubada durante 120 minutos em ambiente escuro. Em seguida, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda = 765$ nm. O ácido gálico (0– 500 mg/L) foi utilizado para

a calibração da curva padrão. Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico (mg EAG)/grama de extrato.

4.2.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio

A atividade antioxidante determinada pelo método do fosfomolibdênio se baseia na determinação espectrofotométrica da redução do Mo^{+4} a Mo^{+5} , com formação subsequente de fosfato de Mo^{+5} , que apresenta absorção máxima a 695 nm (PRIETO et al., 1999). Alíquotas de 0,1 mL de cada extrato (1 mg/mL) foram dissolvidas em água destilada e acrescidas de 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). As amostras foram mantidas em tubos fechados e incubados a 90 °C por 90 minutos. Após resfriamento, à temperatura ambiente, foi determinada a absorbância no comprimento de onda de 695 nm. A atividade antioxidante total (AAT) foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela fórmula:

$$\text{AAT (\%)} = \frac{\text{Absorbância do extrato} - \text{Absorbância do controle}}{\text{Abs do ácido ascórbico} - \text{Absorbância do controle}} \times 100$$

4.2.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

O teste antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi realizado conforme metodologia descrita por Benzie; Strain (2006) com modificações. O reagente FRAP de uso imediato foi obtido a partir de 25 mL de tampão acetato 0,3 M; 2,5 mL da solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM.

As amostras na concentração de 1 mg/mL foram diluídas em metanol nas concentrações de 500, 250, 150, 75 e 50 µg/mL. Em seguida, foram misturados 30 µL de cada amostra, 90 µL de água destilada e 900 µL do reagente FRAP e homogeneizados em vórtex. As amostras foram incubadas a 37°C e mantidas ao abrigo da luz. Após 30 minutos foi determinada a absorbância a 595 nm. Como solução-padrão, foi utilizado o antioxidante sintético Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mmol Trolox (ET) por grama do extrato.

4.2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS

Para realização deste ensaio, foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999). Inicialmente, foi formado o radical ABTS^{•+} (2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), a partir da reação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 16 horas (tempo necessário para a formação do radical). Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 (\pm 0,01) a 734 nm.

Assim, foram adicionados 30 μ L de cada amostra diluída em 3 mL da solução contendo o radical e determinou-se a absorvância no comprimento de onda de 734 nm, após 6, 30 e 60 minutos de reação. A solução-padrão utilizada foi o Trolox nas concentrações de 100 a 2.000 mM em etanol. As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição oxidativa e em capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC, μ M)/ g de extrato.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Absorvância do controle} - \text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do controle}} \times 100$$

4.2.3.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH

Neste ensaio, a atividade sequestradora de radical livre dos extratos foi medida em termos de doação de hidrogênio, com a utilização do radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS, 1995 com modificações). Foram misturados 250 μ L da solução de DPPH (1 mM) a 40 μ L de diferentes concentrações dos extratos (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000 μ g/mL), em triplicata. Após 30 minutos, sob proteção da luz, foi medida a absorvância com o auxílio de um espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm. O ácido gálico foi utilizado como referência. O sequestro de radicais DPPH foi calculado pela fórmula:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{\text{Absorvância do controle} - \text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do controle}} \times 100$$

4.2.4 Ensaios toxicológicos

4.2.4.1 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos

As hemácias humanas do sangue periférico foram obtidas de voluntários saudáveis e serviram como modelo para avaliar a atividade hemolítica.

Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina (NaCl 0,9% + CaCl₂ 10 mM) e centrifugados (790 g/5 min). O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos ressuspensos em solução de NaCl 0,9% para se obter uma suspensão de eritrócitos a 2%.

Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL dos extratos separadamente diluídos em DMSO a 10% e distribuídos nos poços.

Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram distribuídos em todos os poços. Após incubação de 1 hora, sob agitação constante à temperatura ambiente, a placa permaneceu em repouso por um período de 1 h, onde o sobrenadante foi transferido para outra placa e a absorbância medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Amostras com valores de CE₅₀ < 200 µg/mL são consideradas hemolíticas (COSTA-LOTUFO et al., 2002, com modificações).

4.2.4.2 Ensaio toxicológico não clínico agudo

Este experimento foi realizado de acordo com as normas descritas na OECD n°423 (2001) e na Resolução n° 90 de 2004, que dispõe sobre a publicação do “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”.

Os camundongos foram submetidos a um jejum 12 horas e divididos em 2 grupos (n = 3 fêmeas). Os grupos receberam veículo (solução de Tween 80 1%) como controle e EHSp ou EASp na dose única de 2.000 mg/kg, por via oral (gavage). Com o objetivo de avaliar as alterações comportamentais sobre o SNC e SNA, bem como a ocorrência de morte, parâmetros comportamentais foram observados durante as

primeiras quatro horas, e uma vez ao dia, até completar 72 horas, conforme preconizado por Almeida et al. (1999) (Anexo 2).

Durante os 14 dias de observação, foram mensurados diariamente o consumo de água, ração e a massa corpórea dos animais. Ao término desse período, os animais foram anestesiados para a coleta de uma amostra de sangue destinada à realização de exames hematológicos e bioquímicos. Após a coleta, os animais foram eutanasiados e seus órgãos retirados (fígado, baço e rins), pesados e examinados macroscopicamente.

Como não houve nenhum evento de morte, o experimento foi repetido (n =3 fêmeas), para se obter um número final de 6 animais por grupo, conforme recomendado pela OECD.

4.2.5 Avaliação da atividade gastroprotetora de *Spondias purpurea*

4.2.5.1 Modelos de indução aguda

4.2.5.1.1 Úlcera gástrica aguda induzida por HCl/Etanol

Para avaliar a possível atividade gastroprotetora, inicialmente foi realizada uma triagem farmacológica com diferentes doses do EHSp pelo modelo de indução aguda de úlcera com o agente lesivo HCl/etanol.

Após 18 horas de jejum, os animais foram divididos em grupos (n = 6/grupo) e pré-tratados por via oral com o veículo - solução aquosa de Tween 80 1%, 10 mL/kg (controle lesionado - CL), lansoprazol (30 mg/kg) – um inibidor da bomba de prótons, ou os extratos EHSp e EASp nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg. Após 50 minutos, a ulcerogênese foi induzida pela administração de solução 0,3 M HCl/etanol 60% (0,2 mL por animal, v.o.) e uma hora depois, os camundongos foram eutanasiados (câmara de CO₂) e os estômagos retirados, lavados e abertos pela grande curvatura. O conteúdo gástrico foi desprezado, a mucosa lavada cuidadosamente com solução de NaCl 0,9% e fixados em placa de vidro para melhor visualização (MIZUI; DOTEUCHI, 1983, com modificações).

Em seguida, foi determinado o índice de lesão ulcerativo (ILU), conforme o número e a severidade de lesões (SZELENYI; THIEMER, 1978), de acordo com o escore:

Nível 1: para pontos hemorrágicos e ulcerações até 1 mm;

Nível 2: para ulcerações com 2 mm;

Nível 3: para ulcerações profundas a partir de 3 mm.

Sendo,

$$ILU = \Sigma (\text{lesões nível 1} \times 1) + (\text{lesões nível 2} \times 2) + (\text{lesões nível 3} \times 3)$$

Em seguida, a porção glandular do estômago foi pesada e armazenada sob a temperatura de -80°C para posterior quantificação dos níveis de citocina pró-inflamatória (fator de necrose tumoral alfa – TNF- α), óxido nítrico (NO) e glutathiona reduzida (GSH).

4.2.5.1.2 Úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto

Após jejum de 18 h, os ratos ($n = 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados por via oral (gavage) com solução aquosa de Tween 80 1% (grupo controle lesionado - CL), e lansoprazol (30 mg/kg) e EHSp (12,5; 25 ou 50 mg/kg). Após 1 hora, foi administrado o agente lesivo etanol absoluto (4 mL/kg) por via oral. Decorrida 1 hora dessa administração, os ratos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos pela grande curvatura (MORIMOTO et al., 1991 com modificações).

Em seguida, foram fotografados e as lesões contadas por planimetria computadorizada, como auxílio do Programa *ImageJ*. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (ALU) (mm^2) em relação à área total da mucosa gástrica. A porção glandular do estômago foi pesada e armazenada sob a temperatura de -80°C para posterior quantificação dos níveis de citocina TNF- α , NO e GSH.

4.2.5.1.3 Úlcera gástrica aguda induzida por indometacina

Os ratos ($n= 6$) permaneceram em jejum por 18 h antes do experimento, divididos em grupos e posteriormente foram pré-tratados por via oral. Os grupos receberam solução aquosa de Tween 80 1%, ranitidina 60 mg/kg - um antagonista dos receptores H_2 e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg). Decorrida 1 hora do pré-tratamento, os animais receberam indometacina 30 mg/kg (agente lesivo) por via

subcutânea (s.c.) e 6 horas após essa administração, os ratos foram eutanasiados em câmara de CO₂ (DJAHANGURI, 1969 modificado).

Os estômagos foram retirados, lavados, abertos pela grande curvatura e prensados em placa de vidro para melhor visualização das lesões. Em seguida, foram fotografados e as lesões foram quantificadas por planimetria computadorizada, como auxílio do Programa *ImageJ*. Os resultados foram expressos em ALU (mm²) em relação à área total da mucosa gástrica. A porção glandular do estômago foi pesada e armazenada sob a temperatura de -80°C para posterior quantificação dos níveis de citocina TNF- α , NO e GSH.

4.2.5.2 Análise histopatológica da mucosa gástrica

Amostras da mucosa gástrica oriundas dos modelos de indução aguda de úlceras por HCl/etanol, etanol e AINE foram preservadas em formaldeído a 10% tamponado por 24 horas. Logo após, foram lavadas em solução tampão, desidratadas em álcool em série crescente de concentração e incluídas em glicol metacrilato historesina (Historesin Leica, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Alemanha). Os cortes de 4 μ m foram obtidos em micrótomo (modelo RM 2245, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Alemanha) equipado com navalha de vidro, distendidos em água destilada e colocados sobre lâminas, levados para secagem em estufa a 60°C por 1 minuto e submetidos às técnicas de coloração pela hematoxilina-eosina (HE). As lâminas em duplicata por animal foram analisadas em microscópio de luz (modelo DM500, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Alemanha) e fotografadas em câmera acoplada ao microscópio (model EC3, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Alemanha). A análise histopatológica foi realizada com o auxílio do *software* Leica Application Suite (LAS) EZ microscope (Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Alemanha) (BENEDITTI et al., 2004; LEMOS et al., 2011, 2014; ALMEIDA et al., 2014).

4.2.5.3 Avaliação da atividade antioxidante in vivo

4.2.5.3.1 Determinação da concentração de GSH

As mucosas dos estômagos submetidos aos modelos de indução aguda de úlceras foram homogeneizadas em solução tampão de KCl 1,15% com EDTA 3 mM (5 mL/g de tecido). Em seguida, 200 µL da amostra foi precipitada em 800 µL de solução de ácido tricloroacético 10%, centrifugada a 790 g e o sobrenadante foi recolhido para a quantificação da GSH. Assim, 500 µL do sobrenadante foi adicionado a um meio de reação contendo 400 µL de TRIS (Tris hidroximetil aminometano) 400 mM + EDTA 4 mM e 100 µL de DTNB (5,5-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) 4mM (pH= 8,9). A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, foi iniciada a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 412 nm (SEDLAK & LINDSAY, 1968). Os resultados foram corrigidos pela concentração de proteína do homogenato e expressos em µg GSH/mg de proteína. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Folin (LOWRY et al., 1951) e utilizou uma solução de albumina de soro bovino (BSA) 0,1% como padrão.

4.2.5.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Os tecidos estomacais dos modelos de HCl/etanol, etanol e indometacina foram homogeneizados em solução tampão PBS, centrifugados por 15 minutos a 790 g e o sobrenadante foi utilizado na realização destes ensaios.

4.2.5.4.1 Determinação da concentração de TNF- α

Neste experimento, foi realizada a quantificação dos níveis de TNF- α pela técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA sanduíche), utilizando um sistema reagente específico para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (*eBioscience*, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.2.5.4.2 Determinação da concentração de óxido nítrico

Para avaliar a produção de NO, a concentração de nitrito (metabólito estável do NO) foi medida no sobrenadante do homogenato dos estômagos. Uma alíquota de 50 µL de amostra foi transferida para uma microplaca e incubada com 50 µL de reagente de Griess modificado (sulfanilamida 1%, N-(1-naftil) etilenodiamina

dicloridrato 0,1%, H₃PO₄ 5%) por 10 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. A absorbância foi medida em 540 nm em leitor de microplacas e a concentração de nitrato foi calculada usando uma curva padrão de nitrito de sódio (GIUSTARINI et al., 2008).

4.2.6 Mecanismos de ação gastroprotetores de *Spondias purpurea*

4.2.6.1 Atividade antissecretória após ligadura do piloro

Este método permite a avaliação do conteúdo gástrico acumulado durante 4 horas, em termos de conteúdo secretado, pH e acidez total. Após jejum de 18 horas com acesso livre a solução de glicose 5%, os ratos (n = 7/grupo) foram anestesiados (via i.p.) com cloridrato de cetamina 5% (anestésico) e cloridrato de xilazina 2% (relaxante muscular) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da apófise xifoide para ligadura do piloro.

Em seguida, foi realizada a administração intraduodenal (i.d.) das substâncias: Solução aquosa de Tween 80 1%, como veículo para o grupo controle lesionado (CL), ranitidina 60 mg/kg e a melhor dose de EHSp (25 mg/kg). Um grupo falso operado (*sham*) foi adicionado neste experimento. Então, as incisões dos animais foram suturadas e 4 horas após a ligadura, os ratos foram eutanasiados, o esôfago foi pinçado para evitar a perda do material secretado e o estômago removido. O conteúdo gástrico foi coletado e pesado para determinar a quantidade de suco gástrico expresso em g/4h. Em seguida, o pH foi verificado com o auxílio de um pHmetro digital após centrifugação do conteúdo estomacal a 790 g por 10 minutos e expresso em unidades. No suco gástrico, a acidez total (mEq[H⁺]/L/4h) foi determinada no sobrenadante por titulação, em pH 7,0, com a solução de NaOH a 0,1 N (padronizado com biftalato de potássio) e com fenolftaleína como indicador (SHAY et al., 1945 com modificações).

4.2.6.2 Avaliação da participação do óxido nítrico

De acordo com o método proposto por Sikiric et al. (1997), após o jejum de 18 horas, os ratos Wistar machos (n= 7) foram divididos em 6 grupos conforme o pré-tratamento: 3 grupos receberam veículo e 3 grupos receberam N-nitro-L-arginina-

metil-éster (L-NAME) 70 mg/kg (i.p.), um agente bloqueador da enzima sintase de óxido nítrico (NOS). Após 30 minutos da administração, cada três grupos foram tratados por via oral com o veículo (solução aquosa de Tween 80 1%), carbenoxolona 100 mg/kg e com a melhor dose do EHS_p (25 mg/kg) das folhas de *S. purpurea* (25 mg/kg). Após uma hora do tratamento, os ratos receberam 4 mL/kg de etanol (agente lesivo, v.o.). Decorrida mais uma hora, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados e as lesões foram quantificadas por planimetria computadorizada, como auxílio do Programa *ImageJ*. Os resultados foram expressos em ALU (mm²) em relação à área total da mucosa gástrica.

4.2.6.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos

Ratos Wistar machos (n= 7) foram colocados em jejum por 18 horas e distribuídos em seis grupos. Conforme o pré-tratamento via intraperitoneal, 3 grupos receberam veículo e os outros 3 grupos receberam N-etilmaleimida (NEM) 10 mg/kg, um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999). Após 30 minutos da administração, cada três grupos foram tratados por via oral com solução aquosa de Tween 80 1% (controle lesionado, CL), carbenoxolona (100 mg/kg) e EHS_p (25 mg/kg). Após 1 hora do tratamento, os ratos receberam 4 mL/kg de etanol (agente lesivo) por via oral. Decorridos mais 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados e as lesões foram quantificadas por planimetria computadorizada, como auxílio do Programa *ImageJ*. Os resultados foram expressos em ALU (mm²) em relação à área total da mucosa gástrica.

4.2.6.4 Avaliação da participação de muco aderido à parede gástrica

Os animais (n= 7) foram submetidos ao jejum de 18 horas com acesso livre a solução de glicose 5%, distribuídos em grupos e posteriormente tratados (v.o.) com solução aquosa de Tween 80 1% (controle lesionado, CL), carbenoxolona (200 mg/kg) e EHS_p (25 mg/kg). Após 1 hora de cada administração, os animais foram anestesiados (via i.p.) com cloridrato de cetamina 5% (anestésico) e cloridrato de xilazina 2% (relaxante muscular) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da

apófise xifoide para ligadura do piloro. Em seguida, as incisões dos animais foram suturadas e 4 horas após a ligadura, os ratos foram eutanasiados, o esôfago foi pinçado para evitar a perda do material secretado e o estômago removido e aberto ao longo da grande curvatura.

A porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa, por duas horas, em 10 mL de solução de *alcian blue*. O excesso de *alcian blue* foi removido por lavagem do estômago por duas vezes consecutivas, com 7 mL de solução sacarose 0,25 mol/L; sendo a primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos. O corante, complexado ao muco aderido à parede estomacal, foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, agitando-se de forma intermitente por um minuto, a cada 30 minutos, durante 2 horas.

Desse material, foi retirada uma alíquota de 4 mL e adicionada a 4 mL de éter etílico e esta foi agitada por 2 minutos. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 min a 1.134 g e o sobrenadante, descartado. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro (modelo Epoch, BioTek) no comprimento de onda de 595 nm. A determinação da concentração do corante foi feita por intercalação em uma curva padrão com várias concentrações. Os resultados foram expressos em µg de *alcian blue*/g de tecido (RAFFATULLAH et al., 1990 com modificações).

4.2.7 Avaliação da atividade cicatrizante de *Spondias purpurea*

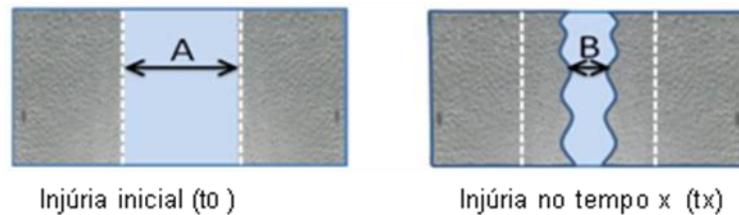
4.2.7.1 Teste de migração celular *in vitro*

Neste teste, foram utilizadas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), oriundas do banco de células da Fiocruz/Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em placas de 6 poços numa concentração de 5×10^5 células/mL e mantidas em meio de cultivo DMEM suplementado com soro bovino fetal (SBF) 10%. Ao atingirem 100% de confluência, o meio foi retirado do poço e foi adicionado 3 mL de PBS. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de 200 µL, foi feito um risco no fundo da placa em um local previamente delimitado. A solução de PBS foi retirada, e o EHSp (50 µg/mL) e a fitohemaglutinina, um agente mitogênico utilizado em estudos que envolvem a permeabilidade das células, foram adicionados aos poços, juntamente com a solução de SBF 10%. Então, o campo onde foi feita a lesão foi fotografado período de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram

expressos em percentual de confluência e calculados pela fórmula a seguir, seguindo o modelo expresso na Figura 6 (BUACHAN; CHULAROJMONTRI; WATTANAPITAYAKUL, 2014).

$$\% \text{ de confluência} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Figura 6 - Modelo para cálculo de teste de migração celular.



Fonte: BUACHAN; CHULAROJMONTRI; WATTANAPITAYAKUL, 2014 (Adaptado).

4.2.7.2 Avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*

Ratos *Wistar*, submetidos ao jejum de 18 h com acesso livre a solução de glicose 5%, foram distribuídos de maneira aleatória em grupos: *sham* (falso operado), controle lesionado (solução aquosa de Tween 80 1%), ranitidina (60 mg/kg) e EHSp (25 mg/kg).

Em seguida, os animais foram anestesiados com cetamina 5% (60 mg/kg) e xilazina 2% (6 mg/kg), a parede abdominal aberta por laparotomia, o estômago foi exposto e foi injetado 0,05 mL de ácido acético 30% na face externa da camada serosa estomacal (na junção do fundo com o antro). Os estômagos foram lavados com água destilada e a parede abdominal suturada. Após 48 horas da exposição dos estômagos ao ácido acético, os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1%, ranitidina e EHSp (25 mg/kg), uma vez ao dia, durante 14 dias (TAKAGI et al., 1969 modificado).

Ao final do décimo quarto dia, os animais foram eutanasiados, os estômagos foram retirados, fotografados, a área de lesão ulcerativa (ALU) foi determinada por planimetria computadorizada (*Software ImageJ*) e os dados foram expressos em mm².

4.2.7.3 Análise histopatológica

Amostras das porções lesionadas dos estômagos pelo ácido acético foram preservadas em formaldeído a 10% tamponado por 24 horas. Logo após, foram lavadas em água, imersas em álcool etílico 70% durante 3 - 4 dias e incluídas em parafina. Os cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo e submetidos às técnicas de coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico-Schiff (PAS). As lâminas foram analisadas em microscópio Micro Dip (Kacil Inc).

4.2.7.3 Análise imunohistoquímica

Nesta análise, cortes de 4 µm de espessura das amostras das regiões ulceradas pelo ácido acético foram montados em lâminas histológicas sinalizadas, desparafinizadas com xileno e hidratadas em etanol.

A expressão das proteínas Ki-67 e BrdU foi detectada a partir do método de biotina livre em conjugação com HRP (Horseradish Peroxidase). A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor por dois minutos. As lâminas foram arrefecidas à temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada utilizando BSA durante 1 hora. Em seguida, foram incubadas (*overnight*) com anticorpo monoclonal primário anti-*mouse* para a proteína Ki-67 (Santa Cruz Biotecnologia, código: sc-23900, diluição 1: 200) e para a proteína BrdU (Santa Cruz Biotecnologia, IIB5, código: sc-32323, diluição 1: 200) e foi utilizado o sistema de visualização HRP. Após a lavagem, as lâminas foram imersas em solução de cromógeno com diaminobenzidina, lavadas em água, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas.

As células imunorreativas para Ki-67 e BrdU foram detectadas pela presença de um cromógeno de cor castanho-avermelhado no núcleo e/ou citoplasma das células epiteliais da área lesionada. A reatividade foi indicada a partir da reatividade observada nas células analisadas: negativa (menos de 10%), leve (10 a 15% das células), moderada (25 a 50%) ou forte (mais de 50%).

4.2.7.4 Avaliação da toxicidade de doses repetidas durante 14 dias

Neste experimento, foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos do EHSp sobre os animais submetidos ao tratamento diário com a dose de 25 mg/kg durante 14 dias. Os consumos de água e ração, massa corporal e índice relativo dos órgãos - fígado, rins e baço (massa do órgão/massa do animal) foram mensurados.

4.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

Na avaliação da participação de grupamentos sulfidrílicos e do óxido nítrico, foi utilizado o teste “t” de *Student* para verificar diferença estatística entre os grupos bloqueados e não bloqueados.

A análise estatística foi realizada utilizando o *software GraphPad Prism* versão 7 (San Diego, CA, EUA). O nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil fitoquímico dos extratos

Estudos fitoquímicos com *Spondias purpurea* são escassos e, embora a espécie seja amplamente utilizada na medicina tradicional, este trabalho é pioneiro na investigação dos metabólitos secundários presentes nos extratos das folhas de *S. purpurea*.

5.1.1 Análise por cromatografia em camada delgada

A prospecção fitoquímica possibilitou identificar flavonoides, derivados cinâmicos, triterpenos, esteroides, mono e sesquiterpenos nos extratos (Tabela 4).

Tabela 4 - Classes de metabólitos secundários encontradas nos extratos das folhas de *Spondias purpurea*.

Classe de metabólitos secundários	EHSp	EASp	EESp
Heterosídeos cianogênicos	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Flavonoides	+++	+++	+++
Derivados cinâmicos	+++	+++	+++
Triterpenos e esteroides	+++	+++	+++
Mono e sesquiterpenos	+++	+	+
Alcaloides	-	-	-
Proantocianidinas e leucoantocianidinas	-	-	-
Cumarinas	-	-	-
Quinonas	-	-	-

Legenda: (-) ausente; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte.

Os flavonoides, encontrados nos extratos das folhas de *S. purpurea*, se destacam por seu efeito antioxidante ao impedirem a peroxidação lipídica e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que constitui um mecanismo importante no tratamento e prevenção de doenças como as úlceras pépticas (FARZAEI; ABDOLLAHI, RAHIMI, 2015; ZHAO et al., 2017).

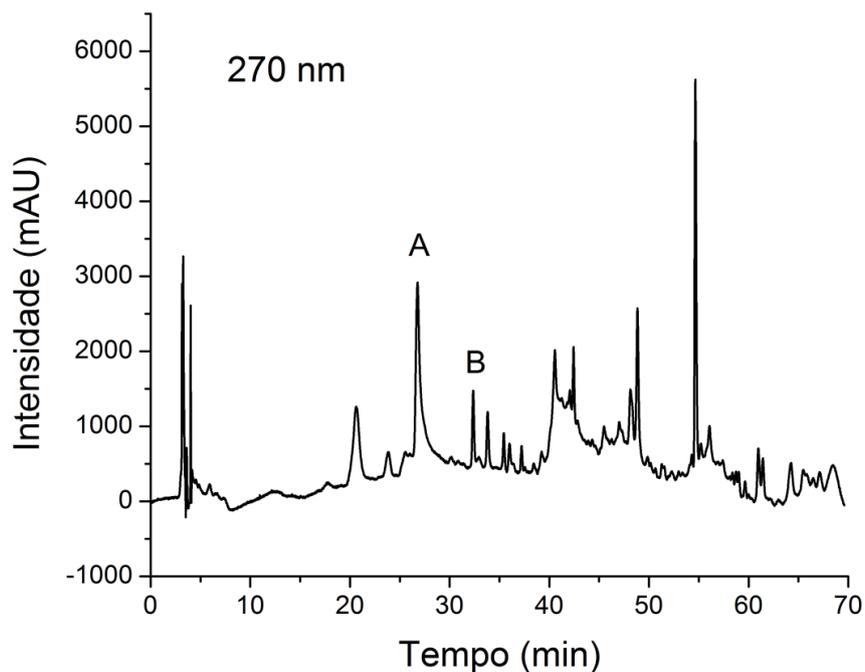
Os terpenos são um dos maiores grupos de metabólitos secundários e detêm um amplo espectro de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante. A atividade gastroprotetora de terpenos também se

destaca em modelos de indução aguda de úlceras gástricas em animais (ROZZA et al., 2014; CHINEDU; IBRAHIM, 2017; NESELLO et al., 2017).

5.1.2 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A partir da análise cromatográfica de EHSp, foi possível identificar dois dos padrões analíticos utilizados por meio da semelhança entre tempos de retenção e espectro de absorção em ultravioleta, bem como, quantificá-los: ácido cafeico (A) em 26 min ($8,60 \mu\text{g/mL} \pm 2,3$) e epigalocatequina (B) em 32,5 min ($3,01 \mu\text{g/mL} \pm 1,02$) (Figura 7).

Figura 7 - Cromatograma comparativo do extrato hexânico de *Spondias purpurea* (EHSp). (A) ácido cafeico (26 min), (B) epigalocatequina (32,25 min).

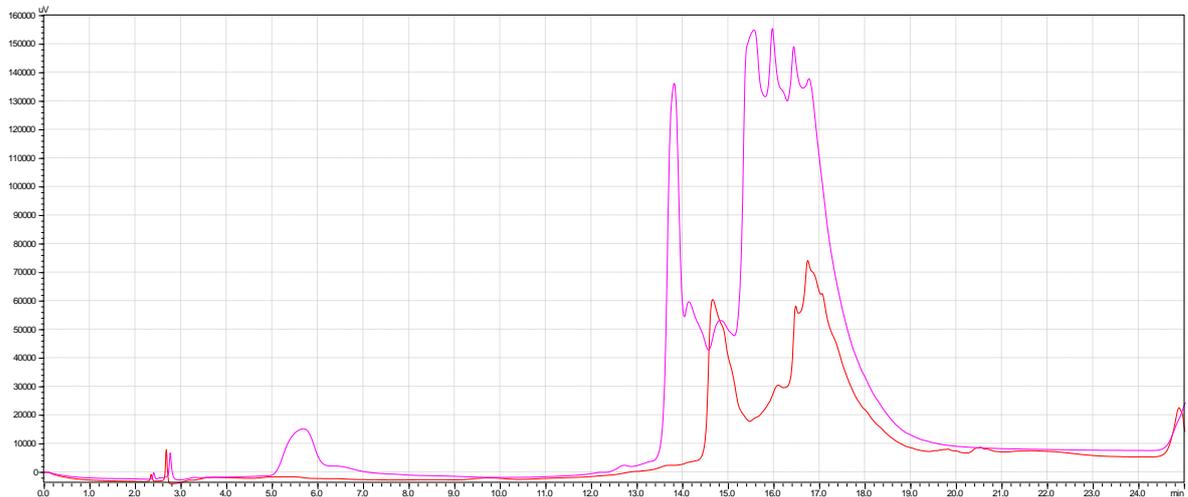


O ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico) é reconhecido por sua capacidade antioxidante *in vitro*, ao promover o sequestro de radicais livres, e *in vivo*, por aumentar as concentrações de antioxidantes endógenos e prevenir a oxidação (JANBAZ; SAEED; GILANI, 2004; SUN-WATERHOUSE et al., 2011).

De maneira similar, o estudo de Hamaishi, Kojima e Ito (2006) demonstrou que o chá rico em epigalocatequina possui alta capacidade antioxidante e antiulcerogênica em úlceras induzidas por etanol, estresse e ácido acético em ratos.

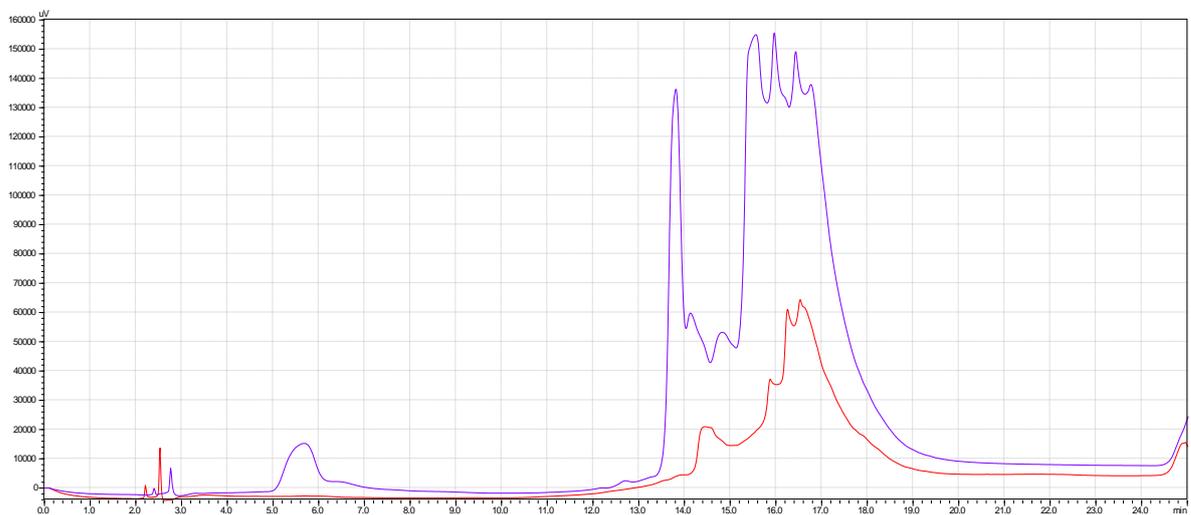
Já para os extratos EASp e EESp, os cromatogramas a seguir (Figuras 8 e 9) apresentaram picos referentes ao ácido tânico, um tanino, e suas diversas conformações.

Figura 8 - Cromatograma comparativo do extrato acetato de etila de *Spondias purpurea* (EASp) e do ácido tânico.



Legenda: Vermelho – EASp, lilás – ácido tânico.

Figura 9 - Cromatograma comparativo do extrato etanólico de *Spondias purpurea* (EESp) e do ácido tânico.



Legenda: Vermelho – EESp, azul – ácido tânico.

Taninos são polifenóis presentes em plantas de grande importância biológica e interesse econômico, solúveis em água e com pesos moleculares que variam entre 500 e 3.000 Daltons, também formam complexos com as proteínas insolúveis em água, o que lhes confere uma relevante atividade antimicrobiana, cicatrizante e anti-inflamatória. Atuam, ainda, como hemostáticos e suas propriedades adstringentes

são responsáveis pelos efeitos antidiarreico e antisséptico (WALLACE et al., 2000; ASLAM et al., 2016).

Espécies vegetais produtoras de taninos são utilizadas na medicina popular para diferentes finalidades e poucos estudos têm avaliado o potencial medicinal de tais substâncias. Além disso, trabalhos mostram os efeitos antiulcerogênicos de plantas ricas em taninos sobre úlceras agudas e subagudas em roedores (DE JESUS et al., 2012; BALAN et al., 2015; NAKAHARA, HARADA; SUEHIRO, 2017).

O ácido tânico tem atividade antimicrobiana e anti-inflamatória comprovadas, além de ser um inibidor competitivo da bomba de prótons, e conseqüentemente, da secreção ácida gástrica e das lesões induzidas pelo estresse. Ele pode precipitar microproteínas no local da úlcera péptica, formando uma película protetora que impede a absorção de substâncias tóxicas e promove a resistência contra a ação de enzimas proteolíticas (MURAKAMI; MURAMATSU; OTOMO, 1992; BANERJEE et al., 2014).

Assim, foram identificados flavonoides e taninos nos extratos das folhas de *Spondias purpurea*. A presença destes metabólitos foi de elevada importância para motivar a continuidade do estudo, seguindo para a etapa de avaliação das propriedades antioxidante e antiulcerogênica.

5.2 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Com base nos achados fitoquímicos, buscou-se investigar o potencial antioxidante dos extratos de *S. purpurea*.

Os resultados para esta atividade variam de acordo com a natureza do solvente utilizado e com os métodos de análise. Estudos demonstram que não existe um ensaio único capaz de avaliar o potencial antioxidante de forma quantitativa e com precisão (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Assim, foram utilizadas cinco diferentes metodologias, o que corrobora Schlesier et al. (2002) que propõe a utilização de no mínimo dois métodos.

Os experimentos a seguir diferem em seus mecanismos de ação e são considerados complementares no estudo da capacidade antioxidante de plantas (REBAYA et al., 2014).

5.2.1 Dosagem de fenóis totais

Compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza e consideradas potentes antioxidantes, tanto pela habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, quanto pelos radicais intermediários estáveis que impedem principalmente a oxidação dos lipídeos (PINCHUK et al., 2012). Eles atuam como redutores de oxigênio singlete nas reações de oxidação e no efeito quelante do íon ferro e são detentores de efeitos antimicrobiano, antioxidante e anti-inflamatório, responsáveis por gerar benefícios em inúmeras doenças (SUMBUL et al., 2011; ZHANG; TSAO, 2016; ALMEIDA et al., 2017).

Neste trabalho, a quantificação de fenóis totais dos extratos foi realizada a partir da curva de calibração do ácido gálico. A equação da reta obtida ($y = 0,036x + 0,0315$ e $R^2 = 0,9923$) foi empregada para determinar a concentração em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g de extrato, onde x corresponde à concentração de ácido gálico e y , a absorbância da amostra.

Os resultados expressos na Tabela 5 mostram consideráveis teores de EAG nos extratos. Contudo, EASp e EESp apresentaram concentrações superiores ao EHSp. Isto se justifica pelo fato da maioria dos compostos fenólicos ser encontrada sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo, portanto, solúvel em água e em solventes orgânicos polares (MELLO; SANTOS, 2001).

Tabela 5 - Teor de fenóis totais presentes nos extratos das folhas de *Spondias purpurea*.

Extrato	Teor de fenólicos totais (mg EAG/g)
EHSp	107,36 ± 1,82
EASp	186,71 ± 3,33
EESp	131,62 ± 7,90

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3).

Pesquisas realizadas em diferentes espécies de *Spondias* indicam a presença de moléculas antioxidantes e fornecem informações sobre o perfil de compostos fenólicos apenas para os frutos (GENOVESE et al., 2008; HAZRA; BISWAS; MANDAL, 2008; CHALISE et al., 2010; RUFINO et al., 2010). No estudo realizado por Engels et al. (2012), apenas com os frutos da seriguela, foram identificados compostos fenólicos como quercetina, kampferol, ácido gálico e rutina.

Outra análise realizada com os frutos de *S. purpurea* revelou um significativo teor de compostos fenólicos ($112,20 \pm 13,20$ mg EAG/g de extrato) (OMENA et al., 2012). Tiburski et al. (2011) encontraram uma concentração de 2,60 mg EAG/g nos frutos de *Spondias mombin* e Satpathy, Tyagi e Gupta (2011), 2,10 mg EAG/g do extrato obtido dos frutos de *Spondias pinnata*.

5.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio

Este experimento se fundamenta na redução do molibdênio (IV) a molibdênio (V) na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido (ZENGIN et al., 2014).

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n= 3$). As atividades antioxidantes dos extratos foram calculadas em $13,10 \pm 1,40\%$ para EHSp; $30,00 \pm 2,30\%$ para EASp e $34,00 \pm 4,40\%$ para EESp, em relação ao ácido ascórbico, atividade considerada 100% (Tabela 6). EASp e EESp apresentaram atividade antioxidante considerável em relação ao ácido ascórbico. Porém, o mesmo não foi observado para EHSp provavelmente devido ao seu caráter apolar.

Tabela 6 - Atividade antioxidante dos extratos de *Spondias purpurea* pelo método de fosfomolibdênio.

Extrato	% de redução do Mo^{6+}/Mo^{5+}
EHSp	$13,10 \pm 1,40$
EASp	$30,00 \pm 2,30$
EESp	$34,00 \pm 4,40$

Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$).

5.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

O FRAP é um ensaio simples que promove resultados rápidos e reprodutíveis (BENZIE; STRAIN, 1996) e pode ser feito em extratos alcoólicos e aquosos de plantas.

Neste método, a atividade antioxidante foi medida com base na capacidade de redução dos íons Fe^{3+} em Fe^{2+} e os dados foram expressos em mmol Equivalente de Trolox/g da amostra (LI; WU; HUANG, 2009). A tabela 7 expressa a relevante atividade antioxidante para os extratos de *S. purpurea*.

Omena e colaboradores (2012) revelaram que para os frutos de *S. purpurea*, o valor para o FRAP foi de 16,20 mmol de Equivalente de trolox (ET)/g de extrato. Satpathy, Tyagi e Gupta (2011) obtiveram valores que variaram de 5,97 – 7,93 mg ET/100 mg de extrato de *S. pinnata*.

Tabela 7 - Atividade antioxidante dos extratos de *S. purpurea* por redução de ferro.

Extratos	mmol Equivalente de Trolox(ET)/g da amostra
EHSp	278,3
EASp	982,5
EESp	702,8

Os resultados estão expressos em média das triplicatas (n= 3).

5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS

O método de inibição de radicais ABTS é gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Por meio deste, é possível verificar a atividade de compostos tanto de natureza hidrofílica como lipofílica (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

O potencial antioxidante dos extratos por ABTS foi determinado a partir da interpolação da absorbância da amostra equivalente à curva de calibração construída a partir do padrão Trolox. O TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) por grama de extrato e o percentual de inibição de radicais ABTS são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade antioxidante dos extratos de *S. purpurea* por sequestro de ABTS em 6, 30 e 60 minutos.

Extrato	% inibição	TEAC (μ mol Trolox/g extrato)
EHSp		
6 minutos	13,40 \pm 1,11	114,44 \pm 26,94
30 minutos	13,49 \pm 1,38	116,67 \pm 33,33
60 minutos	19,88 \pm 1,31	271,11 \pm 31,68
EASp		
6 minutos	49,35 \pm 0,76	984,44 \pm 18,36
30 minutos	56,61 \pm 1,79	1.160,00 \pm 43,33
60 minutos	61,57 \pm 0,69	1.280,00 \pm 16,67
EESp		
6 minutos	26,91 \pm 3,65	441,11 \pm 88,34
30 minutos	38,38 \pm 0,21	717,78 \pm 5,09
60 minutos	34,06 \pm 0,21	614,44 \pm 5,09

Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n= 3).

Tiveron (2010), ao avaliar o potencial antioxidante de extratos por este ensaio, considerou valores superiores a 8,10 μmol de Trolox/g de extrato como satisfatórios. Nos extratos EHSp, EASp e EESp, os compostos antioxidantes apresentaram alta reatividade com o ABTS, daí a importância de se investigar a atividade antioxidante por distintas metodologias (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

5.2.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH

Este método é considerado rápido, eficiente, simples e econômico, sendo amplamente utilizado para avaliar a capacidade de compostos atuarem como varredores de radicais livres ou doadores de hidrogênio. É capaz de mensurar com eficiência a atividade sequestradora de radicais livres de amostras vegetais em diferentes sistemas de solventes, tanto em soluções aquosas como em solventes orgânicos apolares, já que a reação ocorre em um meio de metanol/água, e desta forma, facilita a extração de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; SENDRA; SENTANDREU; NAVARRO, 2006; KHALED-KHOUDJAA; BOULEKBACHE-MAKHLOUF; MADANI, 2014).

De acordo com os dados expressos na Tabela 9, foi possível observar nestas condições que os extratos demonstraram significativa capacidade de sequestrar radicais livres.

Resultados semelhantes foram observados para os extratos das cascas e sementes do fruto de *S. purpurea* que promoveram um percentual de redução dos radicais DPPH de 32 e 37%, respectivamente. Além disto, foi observada uma relação positiva entre esta atividade e o conteúdo de fenóis totais presentes nas amostras (OMENA et al., 2012).

Tabela 9 - Atividade antioxidante dos extratos de *S. purpurea* por sequestro de DPPH.

Extrato ($\mu\text{g/mL}$)	Redução do DPPH (%)		
	EHSp	EESp	EASp
1.000	39,30 \pm 0,67	70,18 \pm 0,67	90,68 \pm 0,34
500	17,39 \pm 0,46	42,08 \pm 0,88	90,76 \pm 0,22
250	9,83 \pm 0,13	24,33 \pm 0,30	80,32 \pm 1,12
125	7,92 \pm 0,65	12,74 \pm 0,25	55,04 \pm 0,96
62,5	1,68 \pm 0,17	5,71 \pm 0,71	32,47 \pm 0,67
31,25	1,04 \pm 0,32	1,76 \pm 0,21	19,76 \pm 0,05

Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=3).

Os resultados das atividades antioxidantes *in vitro* indicam que os extratos de *S. purpurea* contêm classes de compostos bioativos de interesse na promoção da gastroproteção.

5.3 Ensaios toxicológicos

A investigação de possíveis sinais de toxicidade de *S. purpurea* deve preceder os estudos relacionados à atividade farmacológica, já que a utilização de espécies vegetais para fins terapêuticos com perfil de segurança não definido pode ocasionar inúmeros eventos indesejáveis (OLIVEIRA et al., 2014).

5.3.1 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos

Com a realização deste ensaio, verificou-se que EHSp, EESp e EASp apresentaram CE₅₀ superiores a 200 µg/mL e, portanto, não foram capazes de induzir hemólise, quando em comparação ao grupo controle.

O potencial hemolítico de uma substância está diretamente relacionado à sua citotoxicidade e é utilizado como primeiro passo na triagem toxicológica *in vitro*, o que complementa a sensibilidade e especificidade de estudos *in vivo* (FRAZIER, 1992; SCHIAR et al., 2007). Desta maneira, se faz necessário verificar a atividade hemolítica na triagem de atividades biológicas e toxicológicas de extratos vegetais.

Neste teste são utilizadas hemácias, células sanguíneas de fácil acesso e disponibilidade, que permitem a investigação dos efeitos tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana eritrocitária (SRINIVASAN; KEMPAIAH, 2006; BATISTA et al., 2007; FIRMINO, 2007). O rompimento desta membrana e a consequente liberação da hemoglobina no plasma podem causar o comprometimento de funções vitais, tais como hepática, renal e cardíaca (CARVALHO et al., 2007).

Assim, a partir da avaliação da toxicidade por hemólise, foi possível observar que os extratos não apresentaram potencial hemolítico sobre eritrócitos nas concentrações testadas. Estes resultados conferem uma baixa toxicidade e a garantia de uma margem considerável de segurança na sua futura utilização farmacológica.

5.3.2 Ensaio toxicológico não clínico agudo

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indica o guia 423 da OECD (2001) como referência para testes de toxicidade aguda.

Neste ensaio, foram utilizados camundongos fêmeas - consideradas mais sensíveis, e não foram observadas morte nem alterações no sistema nervoso central e autônomo dos animais tratados (n= 3) com as doses únicas de 2.000 mg/kg de EHSp e EASp. Em seguida, o teste foi repetido na mesma dose com três animais adicionais e, novamente, nenhuma morte foi observada durante o período de 14 dias após o tratamento, o que impossibilitou o cálculo da DL₅₀. Este resultado enquadra os extratos na categoria 5 de toxicidade da *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS) (OECD, 2001).

Com relação aos consumos de ração e água e ganho de massa corporal, foi verificado que os extratos não promoveram variações significativas (Tabela 10). Estes são importantes parâmetros para avaliar modificações na fisiologia, como alterações metabólicas, hormonais ou na absorção de nutrientes.

Tabela 10 - Efeito da administração oral de EHSp e EASp obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. e solução aquosa de Tween 80 1% (controle) no consumo de ração e água, ganho de massa corporal e massa dos órgãos por camundongos fêmeas, durante 14 dias.

Parâmetros	Tratamentos		
	Solução aquosa de Tween 80 1%	de EHSp (2.000 mg/kg)	EASp (2.000 mg/kg)
Consumo de ração (g)	31,33 ± 3,11	32,00 ± 3,08	31,54 ± 3,01
Consumo de água (mL)	50,38 ± 6,34	55,09 ± 6,93	51,25 ± 6,80
Ganho de massa corporal (g)	4,33 ± 0,75	3,50 ± 0,54	4,42 ± 0,80
Índice de órgãos (g/g)			
Fígado	38,25 ± 2,54	37,50 ± 3,91	36,50 ± 2,98
Rins	10,19 ± 1,01	10,71 ± 1,29	10,37 ± 1,20
Baço	3,31 ± 0,99	3,43 ± 0,90	3,20 ± 0,91

Os resultados estão expressos em média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, comparado com o grupo controle (solução aquosa de Tween 80 1%) (n= 6).

A massa e as características macroscópicas dos órgãos vitais são importantes indicadores fisiopatológicos que podem ser afetados por reações metabólicas provocadas por substâncias tóxicas. Contudo, não foram relatadas mudanças relevantes nestas condições experimentais quando comparados ao controle (Tabela 10) (VAGHASIYA; SHUKLA; CHANDA, 2010).

Na análise dos parâmetros hematológicos, não foram verificadas quaisquer alterações relacionadas à administração do EASp. Para EHSp, foi observada uma redução significativa apenas para o número de plaquetas dos animais tratados, sendo este achado é insuficiente para inferir toxicidade (Tabela 11).

Quanto aos parâmetros bioquímicos, a literatura relata que os níveis plasmáticos elevados de creatinina e ureia são de grande importância clínica e podem fornecer indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo proteico. Um aumento na concentração da creatinina, oriunda do metabolismo da creatina, pode estar relacionado à variação na taxa de filtração glomerular (KASTL, 2017). A amônia, quando presente em altas concentrações no sangue, pode atingir o sistema nervoso, causando neurotoxicidade (ARUMUGAM; NATESAN, 2017). Entretanto, em seu metabolismo, ela é convertida em ureia, um metabólito de baixa toxicidade, que posteriormente será excretado pelos rins (NATESAN; MANI; ARUMUGAM, 2016).

O fígado é um órgão fundamental no metabolismo ou biotransformação de substâncias (THAKKAR; SLIZGI; BROUWER, 2017) e as enzimas transaminases (ALT e AST) e fosfatase alcalina são utilizadas como biomarcadores de eventual toxicidade hepática. Lesões com destruição celular provocam considerável aumento dessas enzimas no sangue (BRANDÃO et al., 2009; MESSIAS et al., 2010).

A Tabela 12 expressa os valores séricos dos parâmetros bioquímicos analisados após o tratamento dos animais com EHSp e EASp e não foram observadas quaisquer alterações nestas condições experimentais.

Tabela 11 - Efeito da administração oral de EHSp e EASp obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. e solução aquosa de Tween 80 1% (controle) nos parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas, durante 14 dias.

Parâmetros	Tratamentos		
	Solução aquosa de Tween 80 1%	EASp (2.000 mg/kg)	EHSp (2.000 mg/kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,57 ± 0,17	9,30 ± 0,66	10,36 ± 0,98
Hemoglobina (g/dL)	15,40 ± 0,89	14,87 ± 0,82	16,90 ± 1,21
Hematócrito (%)	48,60 ± 1,35	48,83 ± 1,84	50,90 ± 0,37
VCM (μ^3)	50,33 ± 2,33	50,57 ± 1,39	51,57 ± 1,51
HCM (pg)	17,40 ± 1,93	16,01 ± 0,44	15,76 ± 0,95
CHCM (g/dL)	31,98 ± 0,26	31,64 ± 0,42	30,85 ± 1,29
RDW (%)	12,30 ± 0,61	11,69 ± 0,41	11,94 ± 0,53
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5,20 ± 0,21	5,33 ± 0,79	6,00 ± 1,25
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	628,80 ± 110,10	567,00 ± 95,37	503,50 ± 34,41*

Os resultados estão expressos em média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle (solução aquosa de Tween 80 1%) (n= 6).

Tabela 12 - Efeito da administração oral de EHSp e EASp obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. e solução aquosa de Tween 80 1% (controle) nos parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas, durante 14 dias.

Parâmetros	Tratamentos		
	Solução aquosa de Tween 80 1%	EASp (2.000 mg/kg)	EHSp (2.000 mg/kg)
Creatinina (mg/dL)	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,02
Ureia (mg/dL)	53,80 ± 3,49	53,80 ± 4,33	55,60 ± 5,27
AST (mg/dL)	155,30 ± 22,88	156,00 ± 33,79	111,30 ± 21,23
ALT (mg/dL)	67,75 ± 4,38	63,50 ± 1,50	63,33 ± 4,71
Fosfatase alcalina (mg/dL)	224,80 ± 25,38	265,00 ± 24,34	260,20 ± 19,70

Os resultados estão expressos em média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, comparado com o grupo controle (solução aquosa de Tween 80 1%) (n= 6).

O teste não clínico de toxicidade aguda é capaz de fornecer informações sobre as propriedades biológicas de um composto químico (RAJEH et al., 2012).

Ramos (2013) realizou um estudo de toxicidade aguda em ratos machos e fêmeas com o extrato etanólico das folhas de *S. purpurea* e não foram observados indícios de toxicidade relevantes.

Outrossim, neste trabalho, os extratos hexânico e acetato de etila das folhas de *S. purpurea* promoveram uma baixa toxicidade em camundongos fêmeas, nas condições testadas, o que corrobora a análise anterior e assegura a continuidade da pesquisa com a espécie.

5.4 Avaliação da atividade gastroprotetora de *Spondias purpurea*

Segundo Souza-Brito (1994), em estudos farmacológicos com extratos, as doses não devem exceder 1.000 mg/kg. Com base na DL₅₀ maior que 2.000 mg/kg para EHSp e EASp, foram selecionadas as doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg para a avaliação da atividade antiulcerogênica pelos modelos de indução aguda de úlceras por HCl/etanol, etanol absoluto e AINE.

5.4.1 Modelos de indução aguda

5.4.1.1 Úlcera gástrica aguda induzida por HCl/etanol

Para investigar a gastroproteção promovida pelos extratos EHSp e EASp, foi realizada uma triagem farmacológica em camundongos, utilizando HCl/etanol como agente lesivo. Este modelo é considerado rápido e conveniente para avaliar o potencial antiulcerogênico, citoprotetor e/ou antioxidante de extratos de plantas (SUZUKI et al., 2012).

Nas úlceras gástricas induzidas por HCl/etanol, o ácido clorídrico é responsável por provocar graves danos à mucosa gástrica, o que potencializa o efeito do etanol. Este, por sua vez, produz lesões necróticas em decorrência da ação direta sobre a mucosa, além de provocar a redução dos fatores defensores, como a secreção de bicarbonato e a produção de muco (ATEUFACK et al., 2015; ALMASAUDI et al., 2016).

O mecanismo multifatorial pelo qual o etanol promove as lesões envolve danos ao endotélio vascular e estagnação do fluxo sanguíneo gástrico, com consequente aparecimento de hemorragia, necrose e injúria tecidual; além de provocar erosão da membrana protetora de muco (a primeira camada de defesa do tecido estomacal); formação de edema e esfoliação celular (QADER et al., 2012; PRABHU; RAJAN, 2015; VIDAL et al., 2017).

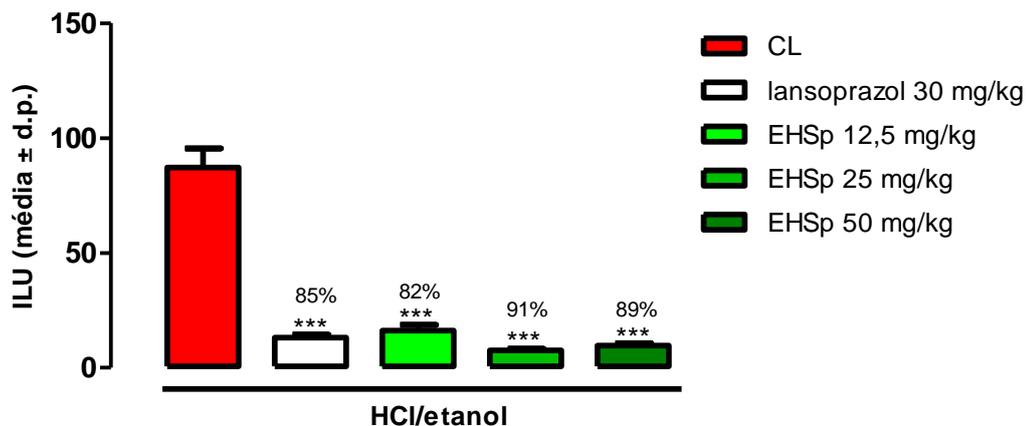
Com a realização deste protocolo, constatou-se que a administração prévia por via oral do lansoprazol e do EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg) reduziu de forma significativa o índice de lesão ulcerativa (ILU) em 85, 82, 91, 89%, respectivamente, quando comparado ao controle lesionado - CL (Figura 10). Estes achados podem

ser visualizados na análise macroscópica das mucosas gástricas ilustrada na Figura 11. Nos estômagos dos animais que receberam apenas o agente lesivo, foram observadas lesões severas com extensa área hemorrágica e necrótica visíveis. Na dose de 12,5 mg/kg de EHSp, foram vistas em determinadas regiões focos pontuais de inflamação e hemorragia. Nas demais doses de EHSp e lansoprazol, as mucosas permaneceram preservadas e com pontos de inflamação raros e discretos.

Resultados semelhantes foram observados no estudo realizado por Almeida (2013), que também comprovou o potencial antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de *S. purpurea* neste modelo.

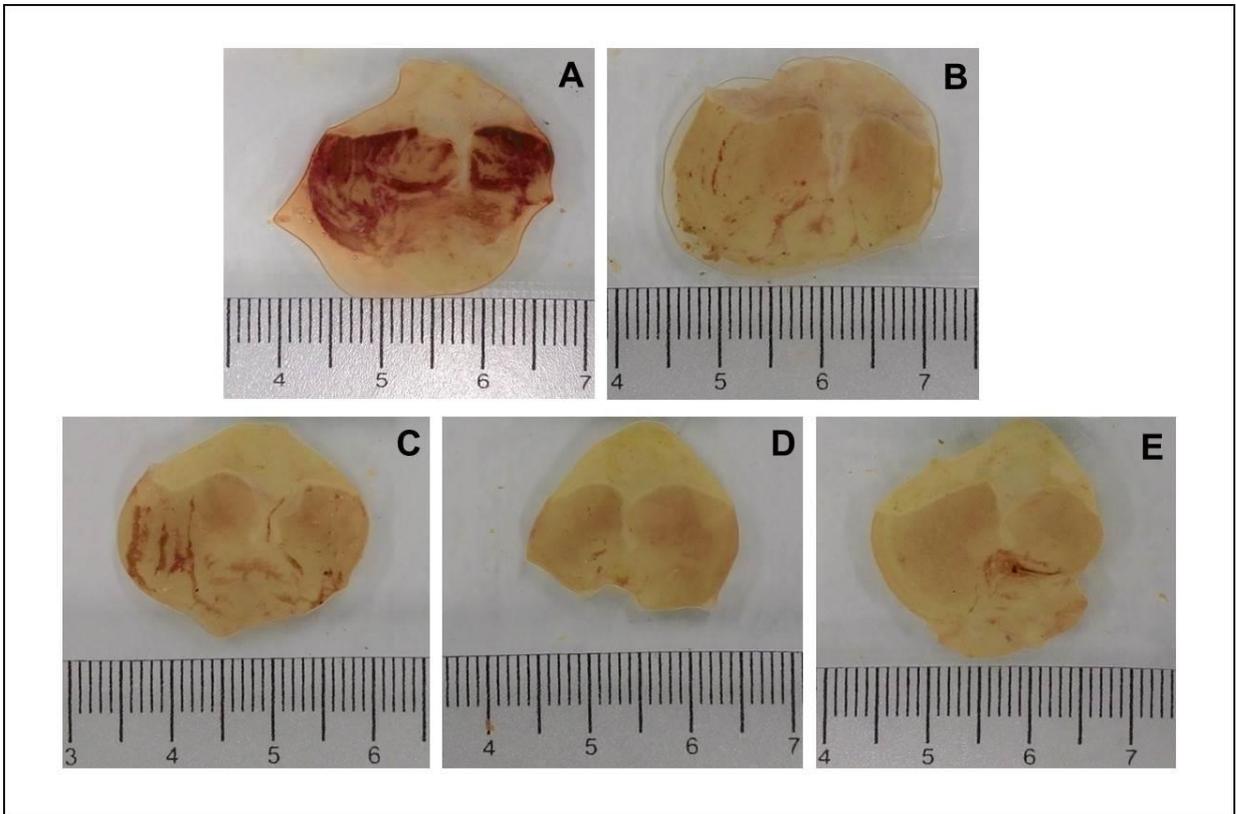
Já para os grupos pré-tratados com EASp, não foi observado percentual significativo de redução das lesão nas doses testadas. Desta maneira, EHSp foi escolhido para dar continuidade ao estudo.

Figura 10 - Efeito da administração oral do EHSp em úlceras induzidas por HCl/etanol em camundongos Swiss.



Os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1% (controle lesionado, CL), lansoprazol (30 mg/kg) e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg). ILU= Índice de Lesão Ulcerativa. Os resultados estão expressos como média ± d.p. (n= 5-6). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, ***p< 0,001, comparado com o grupo CL.

Figura 11 - Estômagos de camundongos pré-tratados (v.o.) com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado, CL (A), lansoprazol 30 mg/kg (B), EHSp (12,5 mg/kg) (C), EHSp (25 mg/kg) (D) e EHSp (50 mg/kg) (E) no modelo de HCl/etanol.



5.4.1.2 Úlcera gástrica aguda induzida por etanol absoluto

A indução de úlceras por etanol em ratos é um modelo comum e amplamente empregado nos estudos relacionados à patogênese e terapêutica das doenças ulcerosas (OYAGI et al., 2010; ROZZA et al., 2014).

A administração oral deste agente lesivo atinge a mucosa após o rompimento da barreira de muco e bicarbonato, produzindo lesões hemorrágicas, hiperemia, edema agudo, degranulação de mastócitos com liberação de histamina, infiltração de células inflamatórias e perda de células epiteliais. Em poucos minutos, o etanol é capaz de provocar vasoconstrição e estase do fluxo sanguíneo na microcirculação, bem como dilatação arteriolar e extravasamento de plasma (PARK et al., 2004; ALRASHDI et al., 2012; WANG et al., 2018).

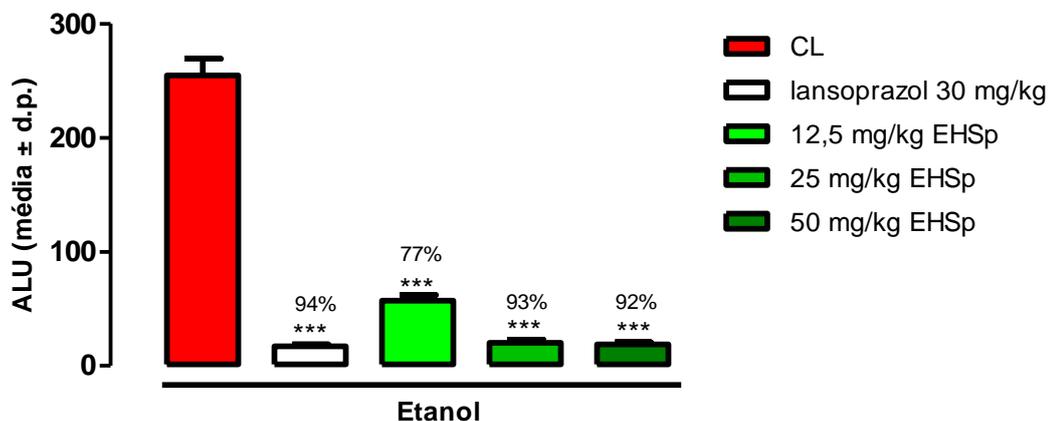
O pré-tratamento via oral com lansoprazol e com as diferentes doses de EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg) diminuiu de forma significativa a ALU em cerca de 94, 77, 93 e 92%, respectivamente, quando comparados ao CL, conforme expresso na

Figura 12 e estes resultados podem ser visualizados com o exame macroscópico das mucosas gástrica, conforme a Figura 13. Nos ratos que receberam veículo e, em seguida, etanol absoluto, as mucosas apresentaram regiões lesionadas com intensa hemorragia e necrose. Para EHSp e lansoprazol, as mesmas se mantiveram preservadas, exceto na dose de 12,5 mg/kg de EHSp, que revelou área de lesão moderada. Estudos com o EESp também demonstraram resultados similares no modelo de etanol em ratos (ALMEIDA, 2013).

Por se tratar de um modelo inespecífico, é possível relacionar o efeito farmacológico exercido por EHSp a vários fatores, como aumento na produção de NO, estímulo ao sistema antioxidante, diminuição da peroxidação lipídica, produção aumentada de muco e bicarbonato ou regeneração das células epiteliais gástricas (RODRIGUES et al., 2010).

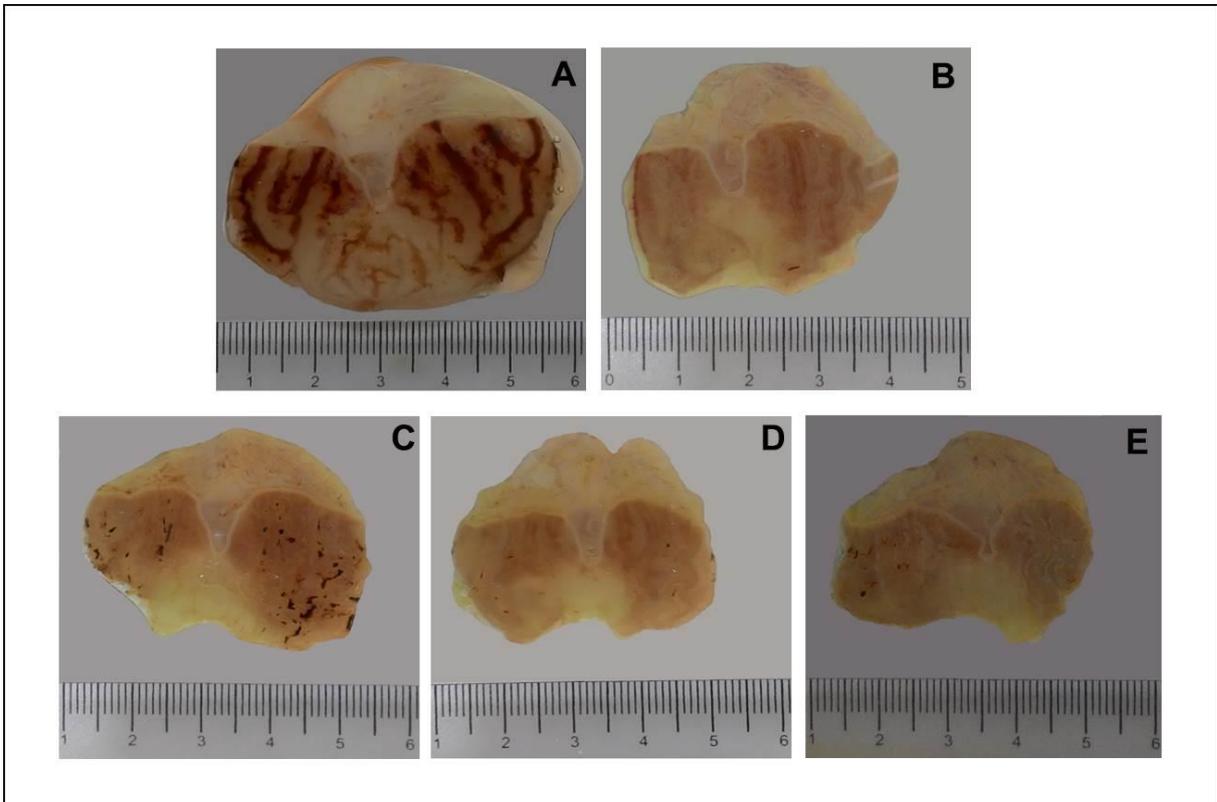
Foi realizada uma comparação estatística entre as diferentes doses dos grupos pré-tratados com EHSp e a dose de 25 mg/kg foi selecionada para os experimentos de mecanismos de ação, por ser tão eficaz quanto a dose de 50 mg/kg e, portanto, mais viável na inibição das lesões gástricas.

Figura 12 - Efeito da administração oral do EHSp em úlceras induzidas por etanol em ratos Wistar.



Os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1% (controle lesionado, CL), lansoprazol (30 mg/kg) e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg). ALU= Área de Lesão Ulcerativa. Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n= 5-6). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, ***p< 0,001, comparado com o grupo CL.

Figura 13 - Estômagos de camundongos pré-tratados (v.o.) com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado, CL (A), lansoprazol 30 mg/kg (B), EHSp (12,5 mg/kg) (C), EHSp (25 mg/kg) (D) e EHSp (50 mg/kg) (E) no modelo de etanol.



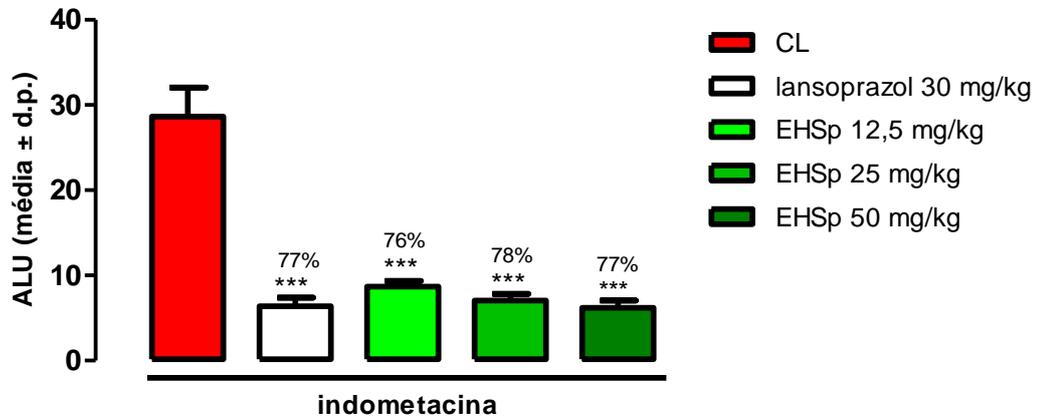
5.4.1.3 Úlcera gástrica aguda induzida por indometacina

O modelo de úlceras utilizando AINEs (como a indometacina, inibidor não seletivo da COX) em ratos permite investigar de forma mais específica o potencial citoprotetor e a capacidade antissecretória de um extrato, uma vez que a fisiopatologia desta lesão envolve a secreção ácida gástrica e a síntese de prostaglandinas (ADINORTEY et al., 2013; PALLE; KANAKALATHA; KAVITHA, 2017).

Neste experimento, a ranitidina e as doses crescentes de EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg) inibiram de forma significativa as lesões gástricas em 77, 70, 76 e 78%, respectivamente (Figura 14), o que corrobora os achados de Almeida (2013) para o extrato etanólico das folhas de *S. purpurea*.

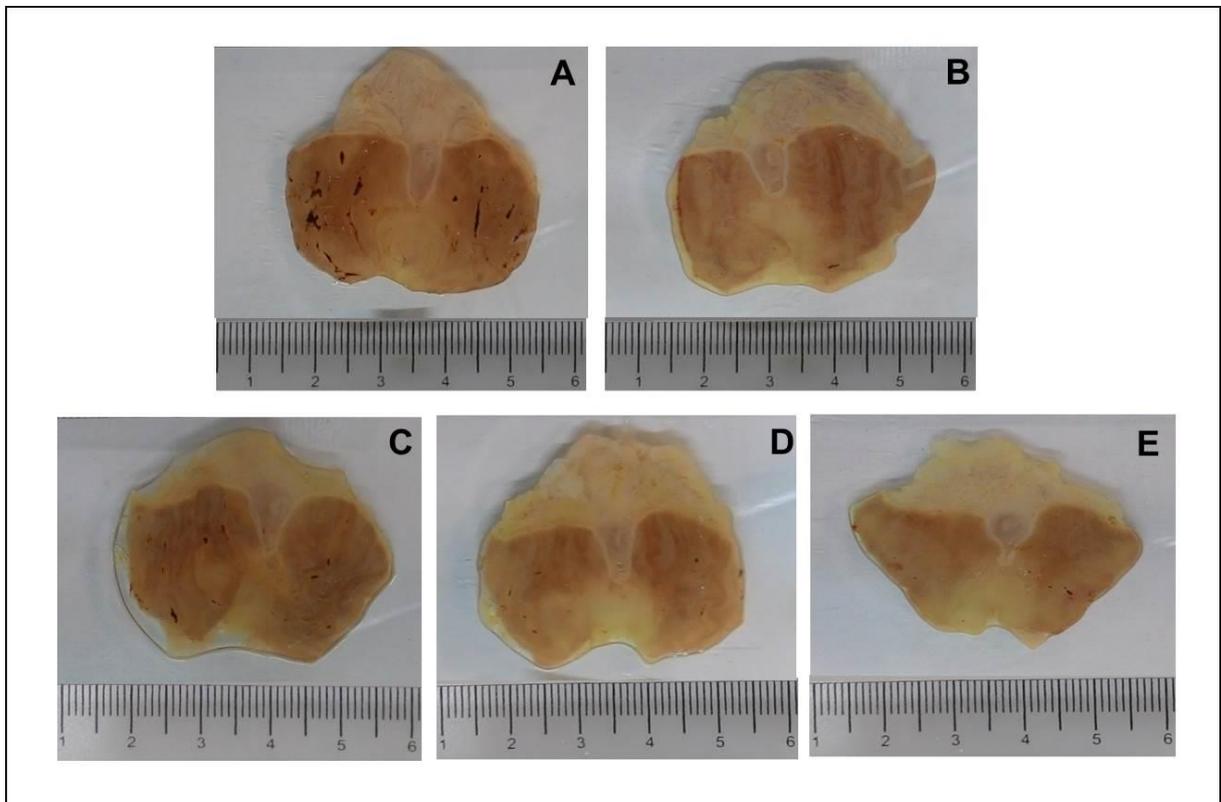
Na figura 15, os resultados macroscópicos deste experimento ilustram mucosas íntegras nos grupos que receberam EHSp e lansoprazol, quando comparados ao grupo CL, que apresentou pontos de necrose de intensidade moderada.

Figura 14 - Efeito da administração oral do EHSp em úlceras induzidas por anti-inflamatório não esteroide (indometacina) em ratos Wistar.



Os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1% (controle lesionado, CL), ranitidina (60 mg/kg) e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg). ALU= Área de Lesão Ulcerativa. Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n= 5-6). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, ***p< 0,001, comparado com o grupo CL.

Figura 15 - Estômagos de camundongos pré-tratados (v.o.) com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado, CL (A), lansoprazol 30 mg/kg (B), EHSp (12,5 mg/kg) (C), EHSp (25 mg/kg) (D) e EHSp (50 mg/kg) (E) no modelo de AINE (indometacina).



Os AINEs são fármacos amplamente prescritos no tratamento e alívio da dor, inflamação, doenças reumáticas e enxaquecas, em decorrência, também, dos seus efeitos analgésicos e antipiréticos. Porém, são considerados um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento de úlcera péptica e retardo no processo de cicatrização (SUNG et al., 2009).

O uso indiscriminado de AINEs, como a indometacina, causa danos à mucosa gástrica de forma local e sistêmica (quando da inibição da enzima COX), além de interferir parcialmente em mecanismos independentes da COX. Na ação citotóxica local, os AINEs, particularmente aqueles de natureza ácida, se associam quimicamente à camada de fosfolípidios e provocam o rompimento da barreira que recobre a superfície da mucosa, o que prejudica a integridade da membrana (WALLACE, 2008; SHIMOYAMA et al., 2013; ATEUFACK et al., 2015).

No mecanismo sistêmico, AINEs são capazes de inibir as enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) e, conseqüentemente, suprimir a síntese de prostaglandinas citoprotetoras, além de causar comprometimento da produção de muco e bicarbonato, diminuição do fluxo sanguíneo, alterações das estruturas microvasculares e da agregação plaquetária, redução da angiogênese e aumento da adesão leucocitária (WALLACE et al., 2000; MUSUMBA et al., 2009).

Com relação aos mecanismos independentes de COX, a diminuição dos níveis do óxido nítrico (NO), do sulfeto de hidrogênio (H₂S) e de poliaminas desempenham um papel importante na formação das úlceras induzidas por AINEs (SAUNDERS et al., 2008; MUSUMBA et al., 2009).

Apesar dos avanços recentes, ainda não foi encontrada uma alternativa terapêutica adequada para tratar a gastropatia induzida por AINEs (CHATTERJEE et al., 2012). Desta forma, os resultados obtidos neste ensaio sugerem a possível atividade gastroprotetora de EHSp por meio de mecanismos citoprotetores que envolvem a inibição das prostaglandinas.

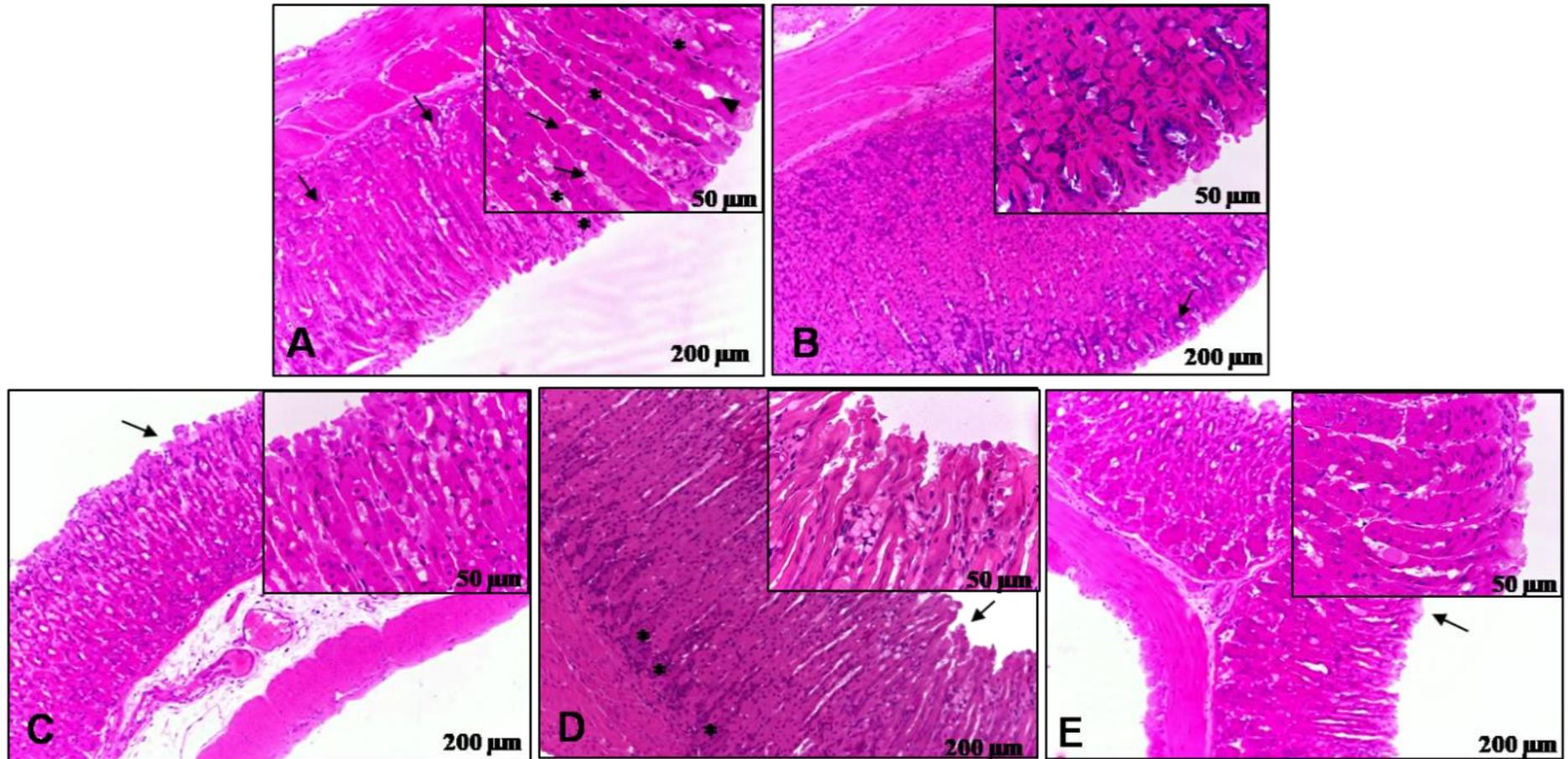
5.4.2 Análise histopatológica da mucosa gástrica

Para ir de encontro com os resultados observados nas análises macroscópicas, foi realizada análise histopatológica da mucosa gástrica dos animais com úlceras induzidas por HCl/etanol (Figura 16), etanol absoluto (Figura 17) e AINE (Figura 18).

A intensidade e o número de lesões podem variar de acordo com o tipo de agente lesivo utilizado (TARNAWASKI; AHLUWALIA, 2013). Em todos os modelos, observou-se uma intensa desorganização do epitélio simples colunar das fossetas e das glândulas gástricas, bem como congestão dos capilares sanguíneos no grupo controle lesionado – CL, sendo estes achados característicos da presença dos diferentes agentes agressores na mucosa. Na dose de 12,5 mg/kg de EHSp, foi possível notar uma mucosa pouco preservada com esfoliações do epitélio simples colunar e necrose do epitélio superficial, o que concorda com a média da área lesionada para este grupo. Em consonância com a análise macroscópica, para o lansoprazol e para as doses de 25 e 50 mg/kg de EHSp, a mucosa e o epitélio simples colunar se apresentaram preservados.

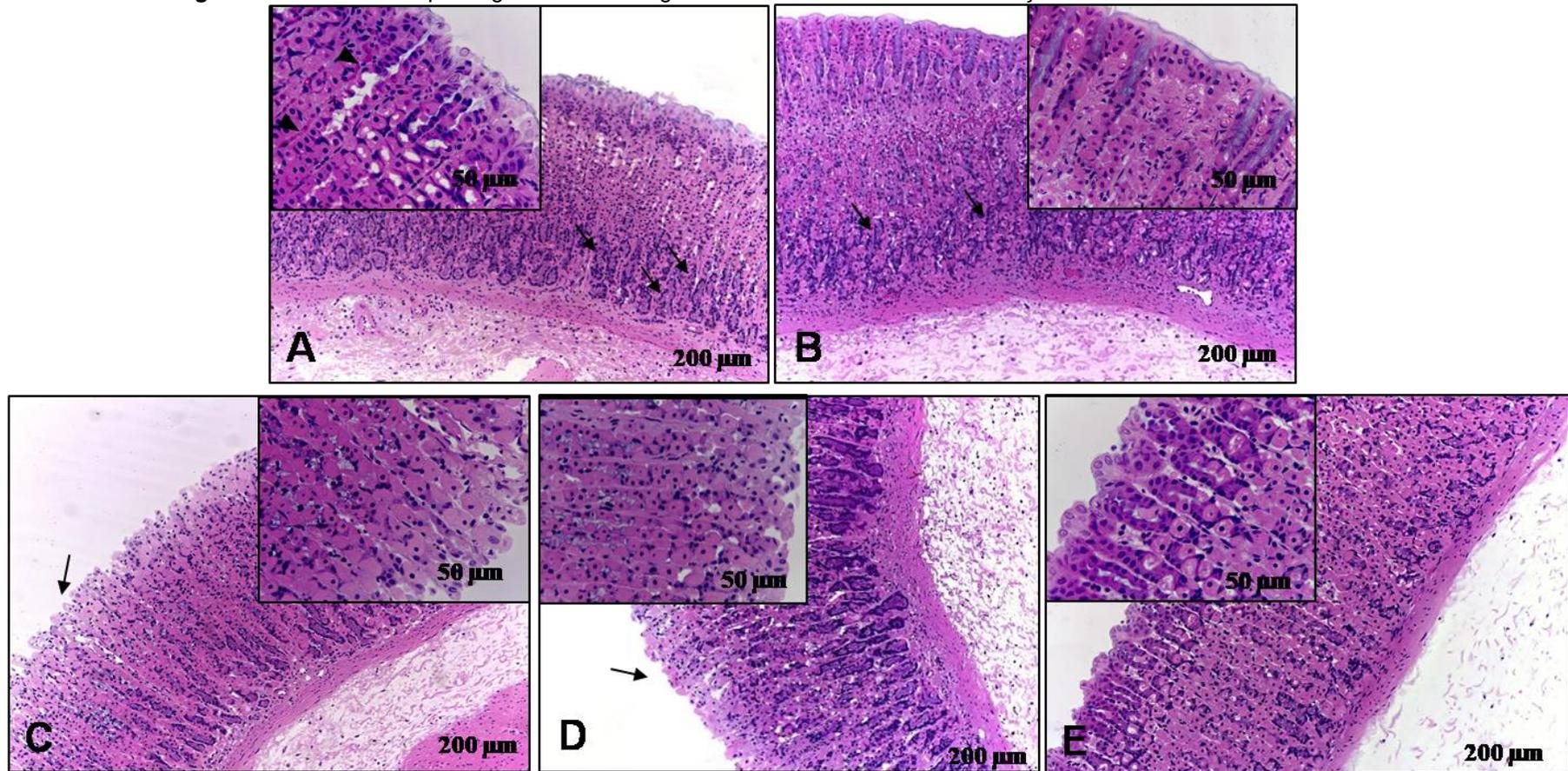
Assim, os achados macro e microscópicos corroboram a análise fitoquímica (ácido cafeico e epigallocatequina) e a atividade antioxidante, e a partir disto, foi possível sugerir que EHSp apresenta atividade antiulcerogênica promissora.

Figura 16 - Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos submetidos à indução de úlceras com HCl/etanol.



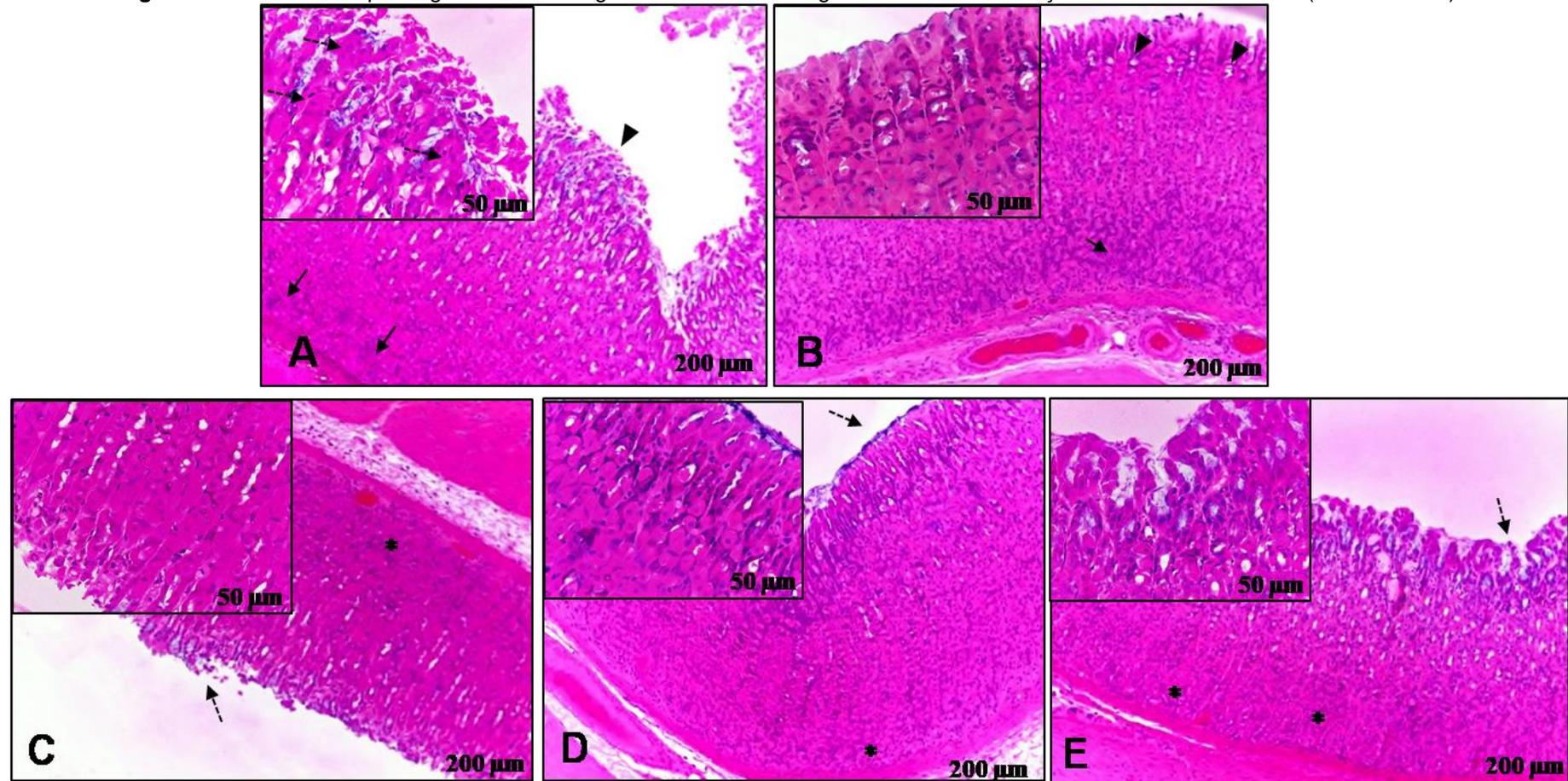
Os animais foram pré-tratados com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado (A), lansoprazol (B), 12,5 mg/kg EHSp(C), 25 mg/kg EHSp (D) e 50 mg/kg EHSp(E). Em A, observar a desorganização do epitélio simples colunar das fossetas (detalhe ampliado - cabeça de seta) e das glândulas gástricas (setas), a congestão dos capilares sanguíneos (detalhe ampliado - asteriscos) e a necrose de células da mucosa gástrica (detalhe ampliado); em B, notar epitélio simples colunar das fossetas (detalhe ampliado) e das glândulas gástricas (seta) bem preservados; em C, a mucosa gástrica se apresenta não preservada (seta) e com esfoliações do epitélio simples colunar (detalhe ampliado); em D, notar leve esfoliações focais do epitélio simples colunar (seta) e mucosa gástrica preservada (asteriscos); em E, verificar mucosa gástrica (seta) e epitélio simples colunar preservados (detalhe ampliado).

Figura 17 - Análise histopatológica da mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de úlceras com etanol absoluto.



Os animais foram pré-tratados com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado (A), lansoprazol (B), 12,5 mg/kg EHS (C), 25 mg/kg EHS (D) e 50 mg/kg EHS (E). Em A, observar a desorganização do epitélio simples colunar das fossetas (detalhe ampliado) e das glândulas gástricas (setas), a congestão dos capilares sanguíneos (detalhe ampliado – cabeças de seta) e a necrose de células da mucosa gástrica (detalhe ampliado); em B, notar epitélio simples colunar das fossetas (detalhe ampliado) e das glândulas gástricas (setas) bem preservados; em C, a mucosa gástrica se apresenta pouco preservada (seta) e com esfoliações do epitélio simples colunar e necrose do epitélio superficial (detalhe ampliado); em D, notar mucosa gástrica bem preservada, porém com presença de esfoliações discretas do epitélio simples colunar (seta); em E, verificar mucosa gástrica bem preservada (detalhe ampliado).

Figura 18 - Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos submetidos à indução de úlceras com AINE (indometacina).



Os animais foram pré-tratados com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado (A), ranitidina (B), 12,5 mg/kg EHS (C), 25 mg/kg EHS (D) e 50 mg/kg EHS (E). Em A, observar a desorganização das glândulas gástricas (setas), do epitélio simples colunar das fossetas (cabeça de seta) com necrose celular (detalhe ampliado - seta tracejada); em B, notar epitélio simples colunar das fossetas (cabeças de seta e detalhe ampliado) e das glândulas gástricas (seta) bem preservados; em C, a mucosa gástrica se apresenta não preservada (asterisco) e com esfoliações do epitélio simples colunar (seta tracejada e detalhe ampliado); em D, notar mucosa gástrica preservada (asterisco) com discretas esfoliações do epitélio simples colunar (seta tracejada e detalhe ampliado); em E, verificar mucosa gástrica (asteriscos) e epitélio simples colunar preservados (seta tracejada e detalhe ampliado).

5.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

5.5.1 Determinação da concentração de GSH

No combate aos radicais livres gerados por processos inflamatórios, como a úlcera gástrica, o organismo se utiliza de sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

A glutathiona é considerada o mais abundante tiol celular de baixo peso molecular e pode se apresentar na forma de glutathiona reduzida (GSH) (JOZEFCAK et al., 2012), um dos componentes do sistema não enzimático.

A GSH tem sua concentração diminuída quando reage diretamente com as EROs ou como doadora de elétrons nas células animais, sendo, então, transformada em glutathiona oxidada pela ação da enzima glutathiona peroxidase (HUBER et al., 2008; SOLMAZ et al., 2009; ALMASAUDI et al., 2016).

Os efeitos da administração do etanol sobre a mucosa estomacal resultam nos processos de peroxidação lipídica, formação de radicais livres, estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade e despolarização da membrana mitocondrial, que culminam com a morte da célula (SANNOMIYA et al., 2005; SUZUKI et al., 2012). Além disto, na reação de oxidação, o álcool gera um metabólito tóxico - o acetaldeído, que se complexa à glutathiona e diminui a disponibilidade deste componente na mucosa gástrica (SALASPURO, 2003).

No modelo de HCl/etanol, foi possível constatar que os homogenatos dos estômagos dos animais pré-tratados com EHSp nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg e com lansoprazol exibiram altas concentrações de GSH ($7,32 \pm 0,74$; $14,01 \pm 0,73$; $11,17 \pm 0,42$ e $4,11 \pm 0,65$ nmol/mg de proteína, respectivamente), quando comparados às concentrações do controle lesionado - CL ($2,45 \pm 0,41$ nmol/mg de proteína). O grupo controle não lesionado (NL) apresentou uma concentração de $8,22 \pm 0,83$ nmol/mg de proteína, conforme expresso na Figura 19 (A).

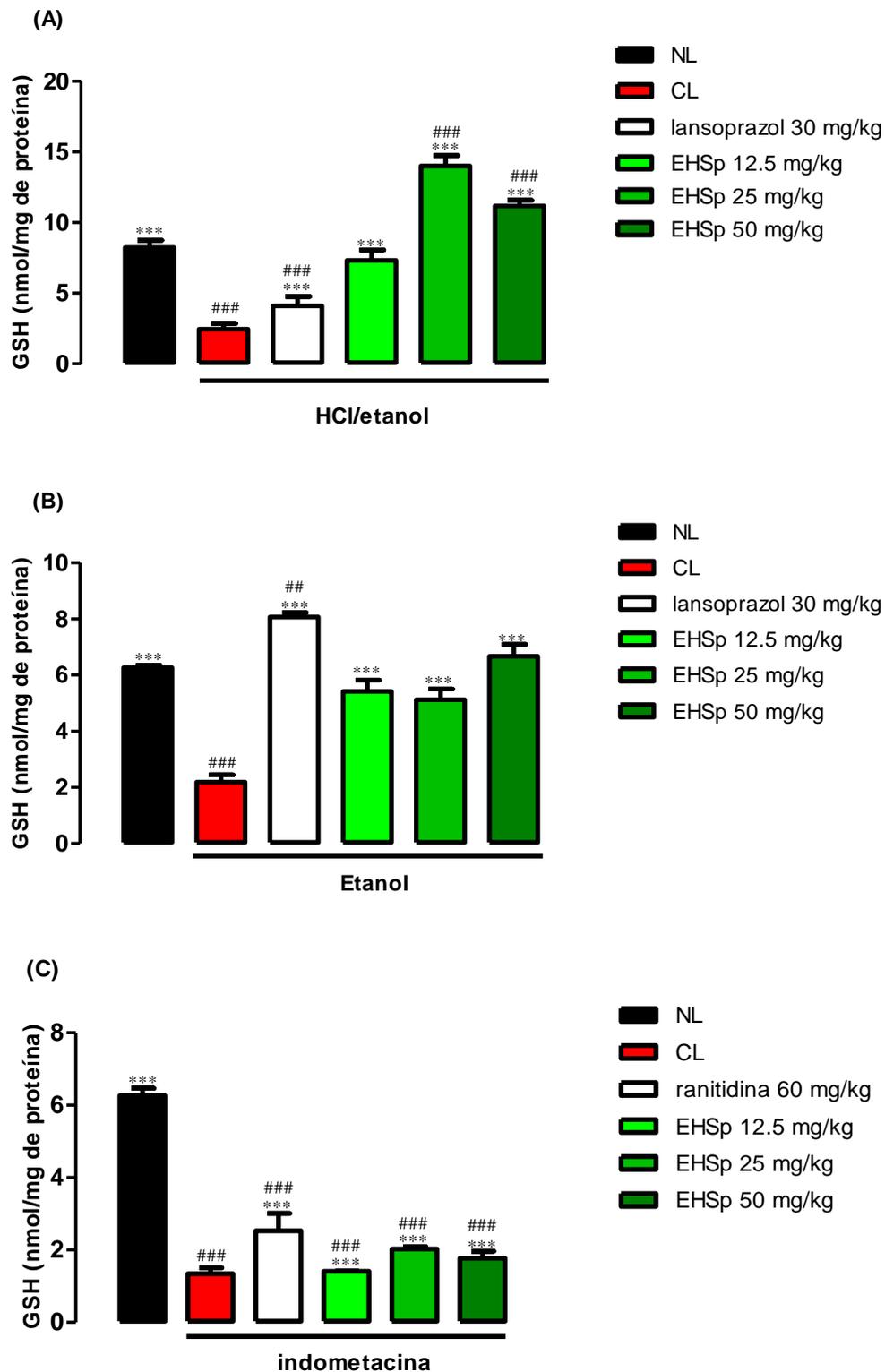
Para o modelo de etanol em ratos, os grupos pré-tratados com EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg) e lansoprazol também demonstraram elevadas concentrações de GSH ($5,42 \pm 0,89$; $5,12 \pm 0,92$; $6,67 \pm 0,94$ e $8,07 \pm 0,34$ nmol/mg de proteína, respectivamente), quando comparados às concentrações do CL = $2,18 \pm 0,59$ nmol/mg de proteína (NL = $6,26 \pm 0,20$ nmol/mg de proteína) [Figura 19 (B)].

O mecanismo de inibição das COXs gerado pelos AINES permite que o ácido araquidônico seja disponibilizado como substrato para a atuação das lipooxigenases. Assim, haverá a formação de LTB₄ que atuará com mediador importante no recrutamento de células polimorfonucleares, com consequente geração de radicais livres no local inflamado (SHIMOYAMA et al., 2013).

No modelo úlceras por AINE (indometacina), a Figura 19 (C) expressa que os grupos que receberam ranitidina e EHSp nas três doses crescentes revelaram significantes concentrações de GSH ($2,52 \pm 0,04$; $1,41 \pm 0,07$; $2,03 \pm 0,06$ e $1,77 \pm 0,19$ nmol/mg de proteína, respectivamente), em comparação ao CL = $1,34 \pm 0,16$ nmol/mg de proteína (NL = 6.26 ± 0.20 nmol/mg de proteína).

Estes resultados sugerem que EHSp apresenta significativa atividade antioxidante *in vivo* no modelo testado.

Figura 19 - Efeito da administração oral do EHSp nas concentrações de glutatona reduzida (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por HCl/etanol (A), etanol (B) e AINE (C).



Os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1% (controle lesionado, CL), lansoprazol (30 mg/kg) ou ranitidina (60 mg/kg) e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n= 5). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, ***p < 0,001, comparado com o grupo CL; ## p < 0,01; ### p < 0,001 quando comparado com o grupo controle não lesionado (NL).

5.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória

5.6.1 Determinação da concentração de TNF- α

No desenvolvimento da resposta inflamatória aguda, ocorre a ativação de neutrófilos, macrófagos e células endoteliais que liberam citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , um importante mediador envolvido no processo apoptótico da mucosa gástrica lesionada por diferentes agentes (NAGATA et al., 2006; NAKASHITA et al., 2013; ZHAO et al., 2017).

A apoptose está associada à perda da integridade da mucosa submetida ao estresse, hemorragia e comprometimento microvascular e representa um importante papel no desenvolvimento das úlceras (MUTHURAMAN; SOOD, 2010; MUTHURAMAN; RAMESH; CHAUHAN, 2011).

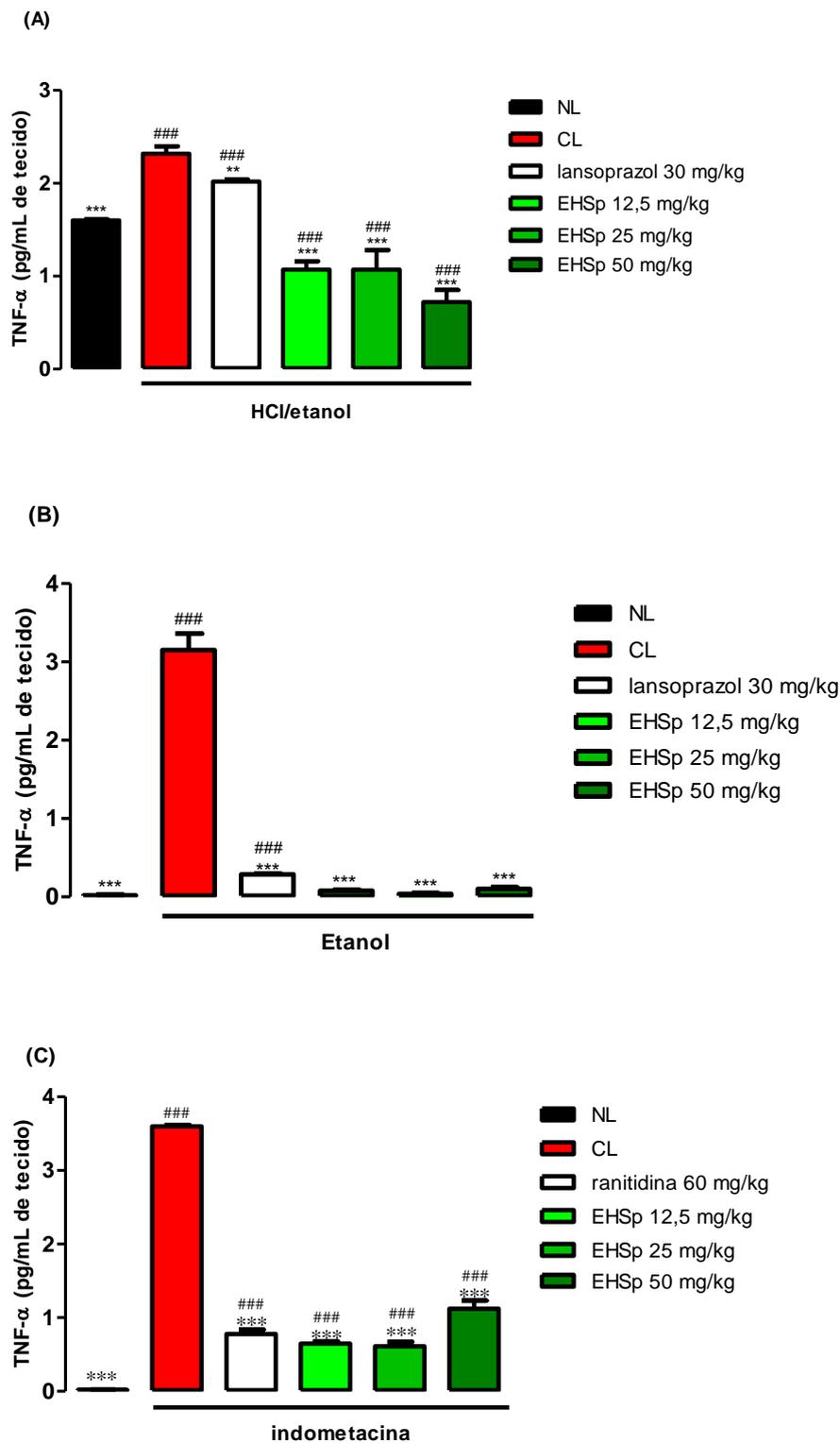
O etanol ativa o sistema imune inato e promove o aumento da concentração de TNF- α no tecido gástrico (SALGA et al., 2012). No modelo de HCl/etanol, o pré-tratamento com lansoprazol e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg) provocou uma redução significativa nas concentrações de TNF- α de 13, 44, 54 e 69%, respectivamente, quando comparado ao grupo CL [Figura 20 (A)].

Resultados semelhantes foram obtidos para o modelo de etanol, onde os grupos pré-tratados com o lansoprazol e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg) também apresentaram redução significativa nas concentrações de TNF- α (91, 98, 99 e 97%, respectivamente), quando em comparação ao grupo CL [Figura 20 (B)].

No modelo de indometacina, os grupos que receberam ranitidina e EHSp nas três doses crescentes tiveram uma redução nas concentrações de TNF- α (78, 82, 83 e 69%, respectivamente), em comparação ao CL [Figura 20 (C)].

Estes resultados sugerem que EHSp apresenta atividade anti-inflamatória nos estômagos ulcerados.

Figura 20 - Efeito da administração oral do EHSp nas concentrações de fator de necrose tumoral α (TNF- α) na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por HCl/etanol (A), etanol (B) e AINE (C).



Os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1% (controle lesionado, CL), lansoprazol (30 mg/kg) ou ranitidina (60 mg/kg) e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n= 5). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, ***p< 0,001, **p< 0,01, comparado com o grupo CL; ### p <0,001 quando comparado com o grupo controle não lesionado (NL).

5.6.2 Determinação da concentração de NO

O NO é um gás lipossolúvel e instável que desempenha um importante papel no reparo das lesões e no mecanismo de angiogênese (LUO; CHEN, 2005; ATEUFACK et al., 2015).

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a reação de oxidação de um nitrogênio guanidínico da L-arginina para formar óxido nítrico e L-citrulina. Existem pelo menos três isoformas desta enzima no organismo humano: NOS neuronal (nNOS), a qual é expressa no sistema nervoso central e periférico; NOS endotelial (eNOS), localizada principalmente nas células endoteliais; e NOS induzível (iNOS), que produz NO em elevadas concentrações em condições de inflamação e está presente nos macrófagos, neutrófilos, células da musculatura vascular e do endotélio (MUSUMBA et al., 2009; NAGESWARARAO et al., 2011; ROVERE-QUERINI; CLEMENTI; BRUNELLI, 2014).

Na úlcera, o NO apresenta efeito dual, tanto antiulcerogênico quanto ulcerogênico, o que depende da concentração da isoforma de NOS envolvida. As isoformas constitutivas eNOS e nNOS produzem baixas quantidades de NO e são responsáveis pela reparação e cicatrização da úlcera, aumento do fluxo sanguíneo da mucosa e angiogênese (MUSUMBA et al., 2009; SOBHIAN et al., 2011; MAGIEROWSKI et al., 2015) .

Nos modelos de HCl/etanol e etanol absoluto, foi possível observar que as concentrações de NO foram significativamente menores no grupo controle lesionado (CL) do que grupo não lesionado (NL), o que sugere a possível participação do NO como um protetor da mucosa gástrica, possivelmente devido à ativação das isoformas constitutivas da NOS na produção deste gás [Figura 21 (A) e (B)].

A Figura 21 (A) expressa que, no modelo de HCl/etanol, os grupos pré-tratados com EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg) e lansoprazol apresentaram elevadas concentrações de NO ($7,14 \pm 0,06$; $4,49 \pm 0,18$; $4,75 \pm 0,08$ e $4,47 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente), quando comparado ao grupo CL = $2,78 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido (NL = $4,00 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido) .

Para o etanol absoluto, a Figura 21 (B) expressa que os grupos pré-tratados com EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg) e lansoprazol também apresentaram altas concentrações de NO ($6,59 \pm 0,01$; $9,14 \pm 0,01$; $13,75 \pm 0,58$ e $9,18 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/g}$

tecido, respectivamente) quando em comparação ao CL ($5,88 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$ de tecido) (NL = $10,39 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$ de tecido).

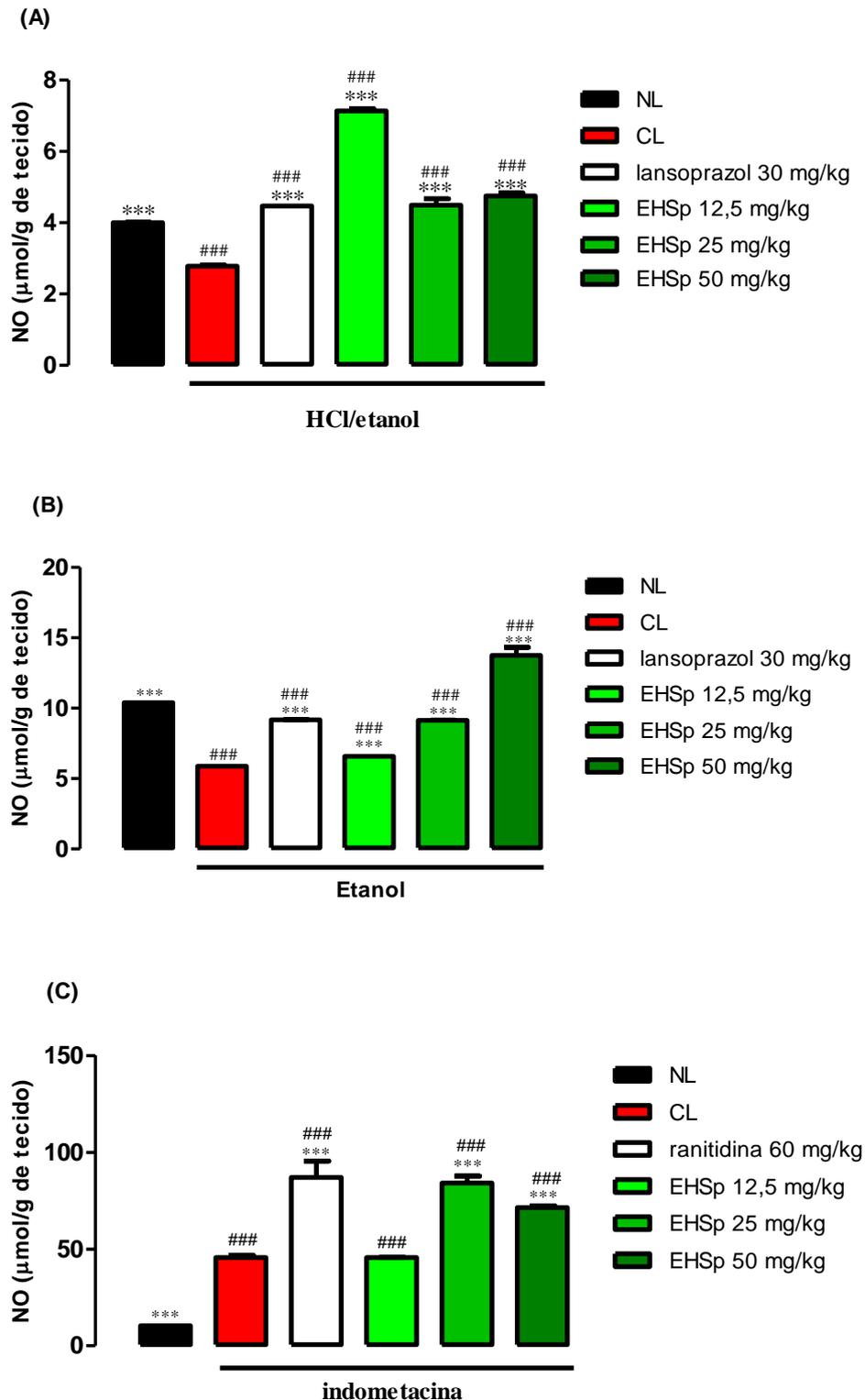
Assim, nas condições avaliadas, as diferentes doses do extrato foram capazes de estimular a produção de NO para o reparo tecidual.

Contudo, dados da literatura mostram que quando gerado a partir da isoforma iNOS, o NO pode promover a formação da lesão por estimular a apoptose, o que depende do estado redox do tecido, da quantidade e da duração da expressão enzimática (CALATAYUD et al., 2001; MUSUMBA et al., 2009).

No modelo de lesão gástrica induzida por AINE [Figura 21 (C)], o nível de NO da mucosa gástrica foi significativamente maior no grupo CL ($45,58 \pm 1,22 \mu\text{mol/g}$ de tecido) do que no grupo NL ($10,39 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$ de tecido). Os grupos que receberam ranitidina e SpHE (25 e 50 mg/kg) também apresentaram concentrações exacerbadas de NO ($87,04 \pm 8,50$; $84,14 \pm 3,61$ e $71,49 \pm 0,82 \mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparados ao grupo CL.

Assim, neste modelo, sugere-se que o EHSp apresentou efeito antiulcerogênico por mecanismos provavelmente independentes do NO.

Figura 21 - Efeito da administração oral do EHSp nas concentrações de fator de óxido nítrico (NO) na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por HCl/etanol (A), etanol (B) e AINE (C).



Os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1% (controle lesionado, CL), lansoprazol (30 mg/kg) ou ranitidina (60 mg/kg) e EHSp (12,5; 25 e 50 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n= 5). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, ***p < 0,001, comparado com o grupo CL; ### p < 0,001 quando comparado com o grupo controle não lesionado (CL).

5.7 Mecanismos de ação gastroprotetores de *Spondias purpurea*

Com o propósito de elucidar os mecanismos envolvidos na gastroproteção de *S. purpurea*, foram avaliadas as atividades antissecretória, a participação do óxido nítrico, dos grupamentos sulfidrílicos e do muco aderido à mucosa.

5.7.1 Atividade antissecretória após ligadura do piloro

O mecanismo de formação da úlcera gástrica pela ligação do piloro está relacionado ao estresse induzido pelo aumento da secreção ácida, mediada por reflexos vago-vagais independentes das células G e enterocromafins (BAGGIO et al., 2003; SCHUBERT et al., 2014).

Outrossim, a contensão deste ácido no lúmen estomacal favorece a autodigestão da mucosa e o rompimento de sua barreira de proteção (ADINORTEY et al., 2013), diminui os níveis de prostaglandinas, promove a peroxidação lipídica, reduz as concentrações de glutathione endógena e aumenta a concentração intracelular de cálcio que age como um gerador de radicais livres (LUTNICKI et al., 2006; MUTHURAMAN; SOOD, 2010).

Assim, a ligadura de piloro é o modelo mais eficiente para investigar o provável potencial antissecretório de uma amostra, a partir da análise das alterações do conteúdo gástrico, além de indicar um efeito local e/ou sistêmico de substâncias-teste (LAKSHMI et al., 2010).

Neste modelo, foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal dos ratos: pH, concentração de íons H^+ e peso do suco gástrico, após a administração intraduodenal. Esta via de administração investiga a atividade do composto quando administrado de forma sistêmica, pois evita o contato direto da substância com a mucosa gástrica (FARIA, 2009).

A administração de EHSp (25 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) - antagonista dos receptores do tipo H_2 para a histamina, reduziu significativamente o conteúdo secretório gástrico, quando comparado ao grupo controle, o que sugere que, nas condições estudadas, a gastroproteção está relacionada aos mecanismos antissecretórios, sendo necessários estudos mais aprofundados e específicos para avaliação da influência sobre a bomba de prótons. Todavia, não houve modificação na concentração de H^+ e no pH do grupo tratado com o extrato (Tabela 13).

Tabela 13 - Efeito da administração intraduodenal de EHSp e ranitidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura do piloro em ratos.

Tratamento	pH (unidades)	[H ⁺] (mEq/mL/4h)	Conteúdo gástrico (g)
Solução aquosa de Tween 80 1%	2,67 ± 0,24	15,9 ± 1,6	0,88 ± 0,09
EHSp (25 mg/kg)	3,25 ± 0,46	16,9 ± 1,6	0,76 ± 0,06*
Ranitidina (60 mg/kg)	4,57 ± 0,53***	11,6 ± 1,5***	0,19 ± 0,05***
Sham	3,93 ± 0,35***	4,43 ± 0,89***	0,15 ± 0,02***

Os resultados estão expressos em média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, *p<0,05, ***p<0,001 comparado ao controle (solução aquosa de Tween 80 1%) (n= 6-7).

5.7.2 Avaliação da participação do óxido nítrico

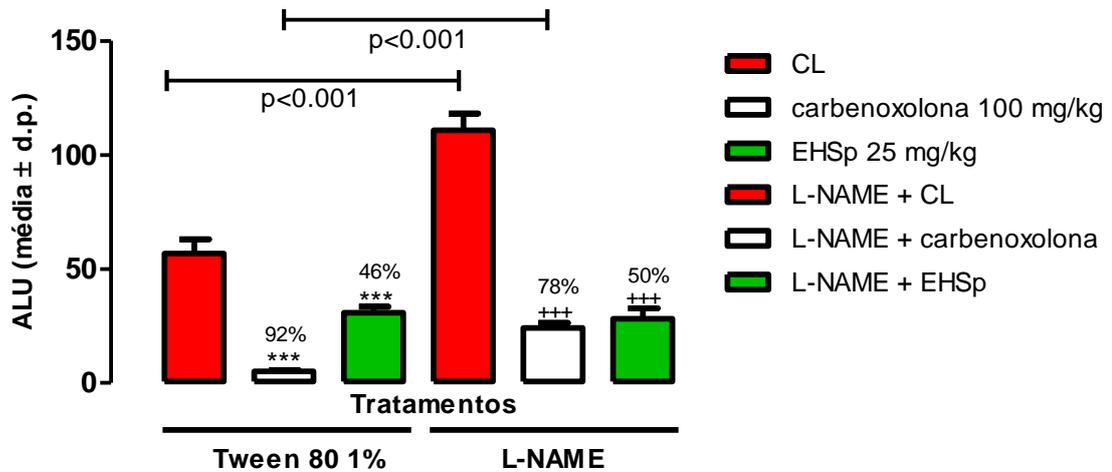
No protocolo experimental de participação do NO na proteção gástrica, foi realizado o modelo agudo de úlcera induzida por etanol em ratos na ausência e na presença de L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

A gastroproteção do EHSp (25 mg/kg) e da carbenoxolona (100 mg/kg) foi avaliada após o tratamento prévio dos animais pela via intraperitoneal (i.p.) com solução aquosa de Tween 80 1% (controle) ou L-NAME (70 mg/kg), utilizando como agente lesivo o etanol.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível observar que os animais pré-tratados com solução aquosa de Tween 80 1% e posteriormente tratados com carbenoxolona e EHSp apresentaram uma redução da ALU em 92 e 46%, respectivamente, quando comparados ao controle (solução aquosa de Tween 80 1%). Para os grupos pré-tratados com L-NAME e, em seguida, tratados com carbenoxolona e EHSp, a redução da ALU foi de 78 e 50%, respectivamente e em comparação ao controle (Figura 22).

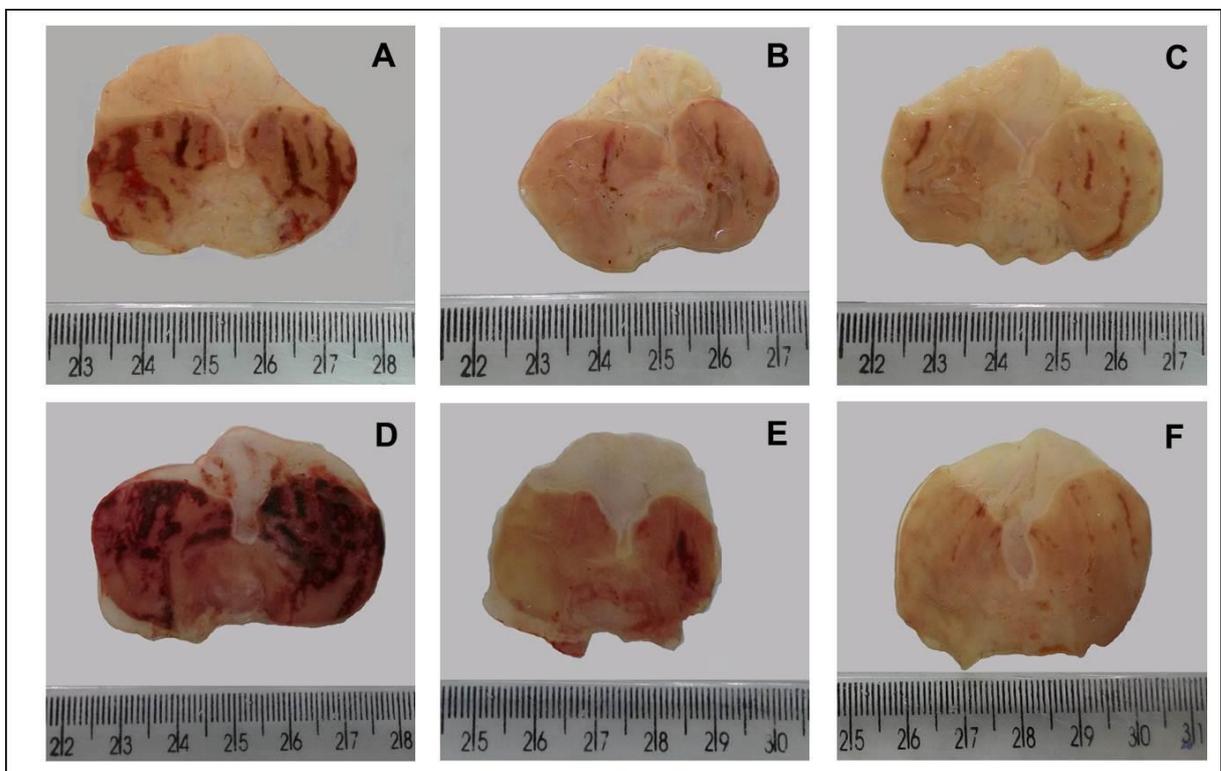
Entretanto, quando se comparou os animais pré-tratados (i.p.) com L-NAME com os não bloqueados pela enzima, houve exacerbação da ALU somente naqueles que foram tratados (v.o.) com controle e carbenoxolona, enquanto que o grupo EHSp manteve sua capacidade de proteger a mucosa gástrica das lesões promovidos pelo etanol, mesmo quando pré-tratado com o inibidor da NOS (Figura 23).

Figura 22 - Efeito da administração oral de EHSp e carbenoxolona após pré-tratamento com L-NAME (i.p.) na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.



Os resultados foram expressos como média \pm d.p. ($n = 5-6$). ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey: *** $p < 0,001$, comparados ao controle lesionado - CL (solução aquosa de Tween 80 1%); +++ $p < 0,001$, comparados ao L-NAME + CL. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo CL. A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste "t" de Student.

Figura 23 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução aquosa de Tween 80 1% e tratados com solução aquosa de Tween 80 1% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e EHSp (25 mg/kg) (C); ou pré-tratados com L-NAME e tratados com solução aquosa de Tween 80 1% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e EHSp (25 mg/kg) (F) no modelo de avaliação da participação do óxido nítrico na gastroproteção.



O óxido nítrico é um mediador endógeno envolvido com os mecanismos de integridade da mucosa gástrica, importante na regulação do ácido, secreção alcalina e na regulação do fluxo sanguíneo. Além disto, participa do processo de cicatrização da úlcera e estimula fatores de crescimento que favorecem a angiogênese (WALLACE, 2008; ARAGÃO et al., 2018).

Todavia, os resultados apontaram uma redução significativa das lesões ulcerativas induzidas por etanol absoluto exercida pelo EHSp, tanto na ausência quanto na presença de L-NAME, não havendo diferença significativa entre os dois. Isto sugere que o NO provavelmente não está envolvido na gastroproteção promovida por *Spondias purpurea*, de maneira similar ao observado no estudo realizado por Almeida (2013) com o EESp em ratos.

Vale ressaltar também que embora o NO exerça um importante papel na manutenção da integridade da mucosa, Rovere-Querini, Clementi e Brunelli (2014) destacam que muitos estudos demonstram seu desempenho bifásico relacionado ao efeito ulcerogênico. Assim, o NO pode promover proteção ou ação ulcerogênica, o que depende do tipo de isoenzima NOS ativada.

5.7.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos

Os grupamentos SHs são responsáveis por aumentar a produção e manter a estabilidade do muco, através das pontes de dissulfeto, e estão envolvidos na manutenção da integridade gástrica, particularmente quando as espécies reativas de oxigênio estão presentes na formação dos danos teciduais (CHANDRANATH, BASTAK; SINGH, 2002; ROZZA et al., 2014; ARAGÃO et al., 2018).

A glutathiona reduzida participa em muitos aspectos do metabolismo oxidativo, incluindo a neutralização de hidroperóxidos e a manutenção da condição fisiológica das proteínas dos grupamentos sulfidrílica (BESERRA et al., 2011). Sua concentração relativamente elevada indica suas possíveis implicações para gastroproteção (NAGY et al., 2007).

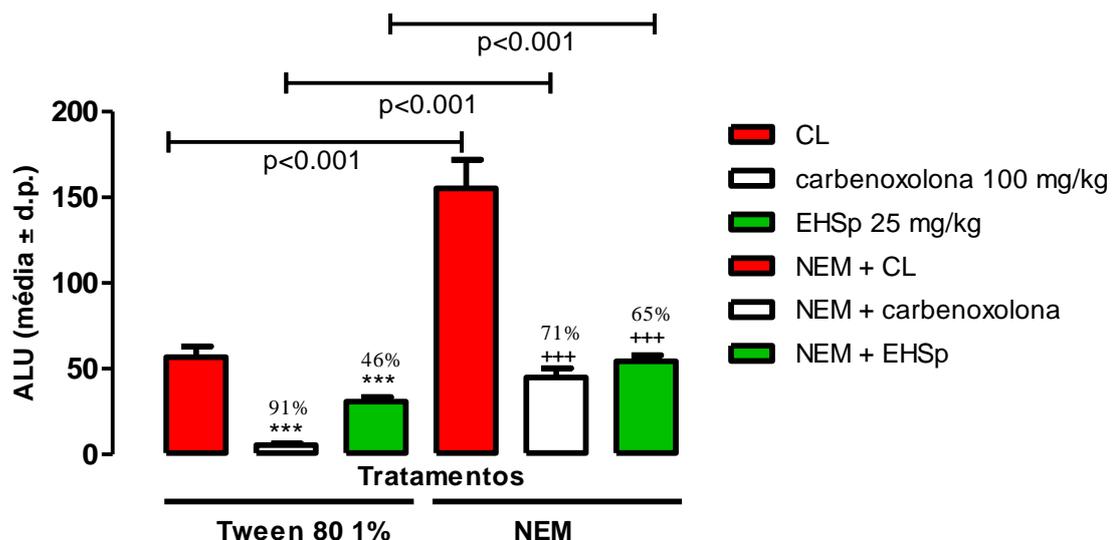
Neste experimento, realizou-se a investigação do envolvimento dos grupamentos SHs com o emprego do N-etilmaleimida (NEM), um agente bloqueador dos grupamentos capaz de potencializar as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol (RASTOGI; PATNAIK; DIKSHIT, 1998, MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999; FERREIRA et al., 2008).

Os resultados demonstraram que nos grupos previamente tratados via intraperitoneal com solução aquosa de Tween 80 1% (controle) e, em seguida, tratados com EHSp (25 mg/kg, v.o.) e carbenoxolona (100 mg/kg, v.o.), ocorreu uma redução significativa do ALU (91 e 46%, respectivamente), quando comparado ao seu controle. Já nos grupos pré-tratados com NEM, e que posteriormente receberam EHSp e carbenoxolona, o resultado foi semelhante e foi observada a redução do ALU (71 e 65%), quando comparado ao controle (Figuras 24 e 25).

Entretanto, foi observada uma exacerbação da ALU para os grupos de animais pré-tratados com NEM (i.p.), quando comparados aos grupos pré-tratados com controle (Figuras 24 e 25).

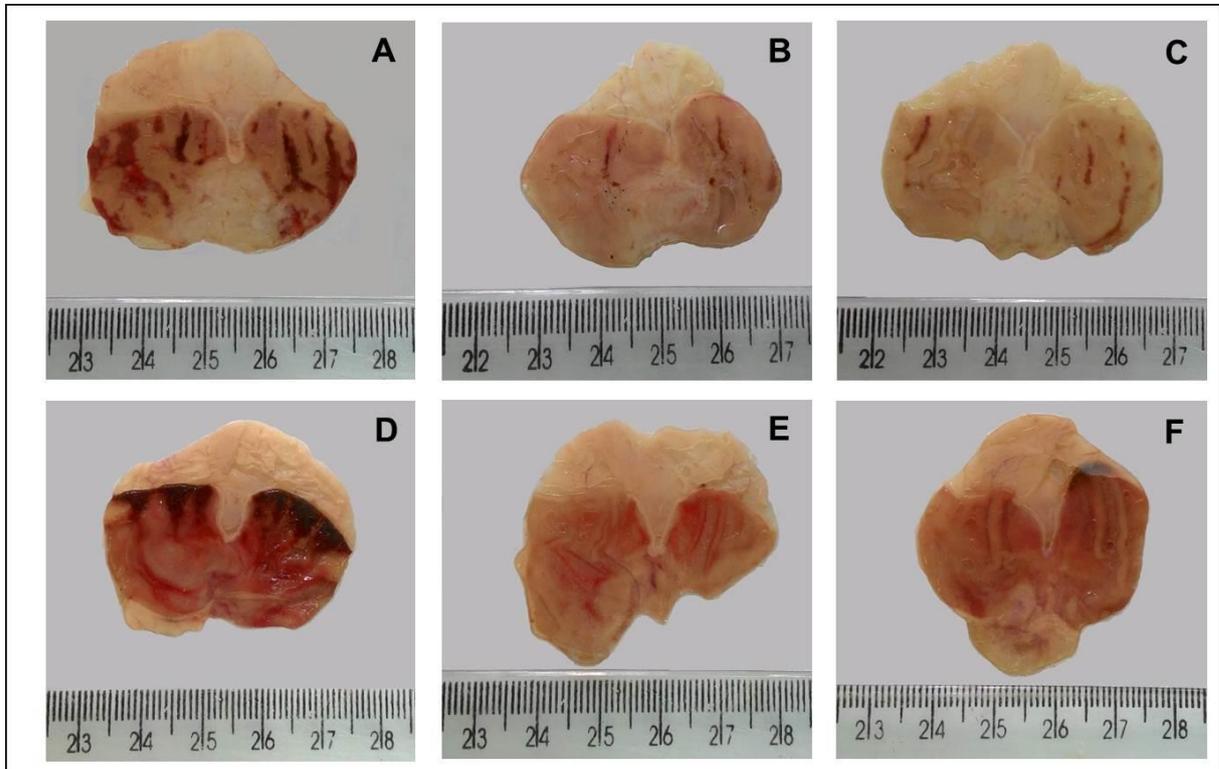
Assim, os resultados corroboram os achados para a GSH *in vitro* anteriormente citados (Figura 19) e indicam que os grupamentos sulfidrílicos estão envolvidos no mecanismo de ação gastroprotetor do EHSp e de acordo com Al-Mofleh et al. (2010), estes compostos antioxidantes são determinantes no tratamento da úlcera péptica. Vale ressaltar, ainda, que este mecanismo também foi observado para o extrato etanólico das folhas de *Spondias purpurea* (ALMEIDA, 2013).

Figura 24 - Efeito da administração oral de EHSp e carbenoxolona após pré-tratamento com NEM (i.p.) na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.



Os resultados foram expressos como média ± d.p. (n= 5-6). ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey: ***p<0,001, comparados ao controle lesionado - CL (solução aquosa de Tween 80 1%); +++p<0,001, comparados ao NEM + CL. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo CL. A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste "t" de Student.

Figura 25 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução aquosa de Tween 80 1% e tratados com solução aquosa de Tween 80 1% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e EHSp (25 mg/kg) (C); ou pré-tratados com NEM e tratados com solução aquosa de Tween 80 1% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e EHSp (25 mg/kg) (F) no modelo de avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção.



5.7.4 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica

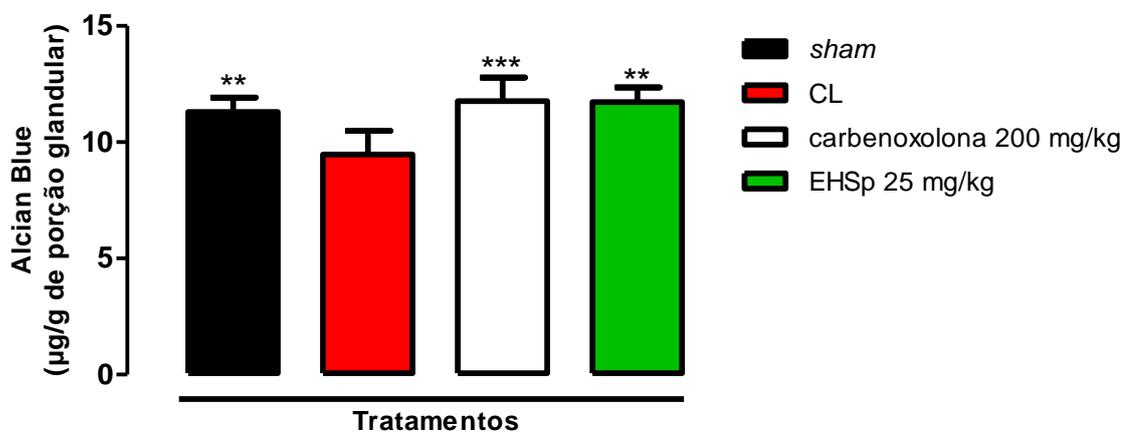
O muco presente no trato gastrointestinal é um importante fator de defesa tecidual, atua como um agente antioxidante e tem sua produção estimulada pelas prostaglandinas. Diferentes substâncias ulcerogênicas causam comprometimento do gel de muco e da camada fosfolipídica, levando à injúria da mucosa gástrica (BERENQUER et al., 2007; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; AL BATRAN et al., 2013).

A presença do muco e dos fosfolípidios de membrana formam uma camada física hidrofóbica que impede a difusão dos íons H^+ , e juntamente com os íons bicarbonato secretados pelo epitélio, atuam na contenção da ação da pepsina e do pH ácido da secreção gástrica, proporcionando um microambiente próximo da neutralidade. Esta barreira impede, ainda, a capacidade de penetração das bactérias no epitélio (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; WALLACE, 2008; MARTINS et al., 2014).

Com este modelo, foi possível avaliar a participação do muco na gastroproteção mediada pelo EHSp (25 mg/kg) e pela carbenoxolona (200 mg/kg), por meio da concentração de *alcian blue* ligado ao muco do estômago.

Os resultados expressos na Figura 26 mostram um aumento significativo nas concentrações de muco aderido à parede gástrica induzido pelo extrato e pela carbenoxolona, quando comparados ao controle (solução aquosa de Tween 80 1%).

Figura 26 - Efeito da administração oral do EHSp e carbenoxolona sobre o conteúdo de muco gástrico após ligadura do piloro em ratos.



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey: ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,001$ comparados ao controle lesionado - CL.

5.8 Avaliação da atividade cicatrizante de *Spondias purpurea*

Com a finalidade de avaliar o processo de cicatrização produzido pelo EHSp, foi realizado o teste *in vitro* de migração celular e o modelo *in vivo* de úlceras induzidas por ácido acético.

5.8.1 Teste de migração celular *in vitro*

A cicatrização é um processo contínuo e ordenado que envolve um conjunto de alterações teciduais importantes, tais como inflamação, quimiotaxia e reparo da lesão (PIZA, 2012).

As células endoteliais são células epiteliais escamosas e alongadas, que revestem as paredes dos vasos sanguíneos e estabelecem íntima relação entre o sangue e os tecidos. Na resposta ao dano tecidual, elas liberam o fator de

crescimento de fibroblastos, responsável por estimular a síntese de proteoglicanos e componentes da matriz extracelular, promover a migração e a proliferação das células, e permitir a remodelação tecidual. Além disto, desempenham um importante papel modulador sobre a vasomotricidade, hemostasia, angiogênese e expressão de moléculas de adesão, fator de Von Willebrand e fatores de crescimento endotelial vascular (BUACHAN; CHULAROJMONTRI; WATTANAPITAYAKUL, 2014; YEH et al., 2017).

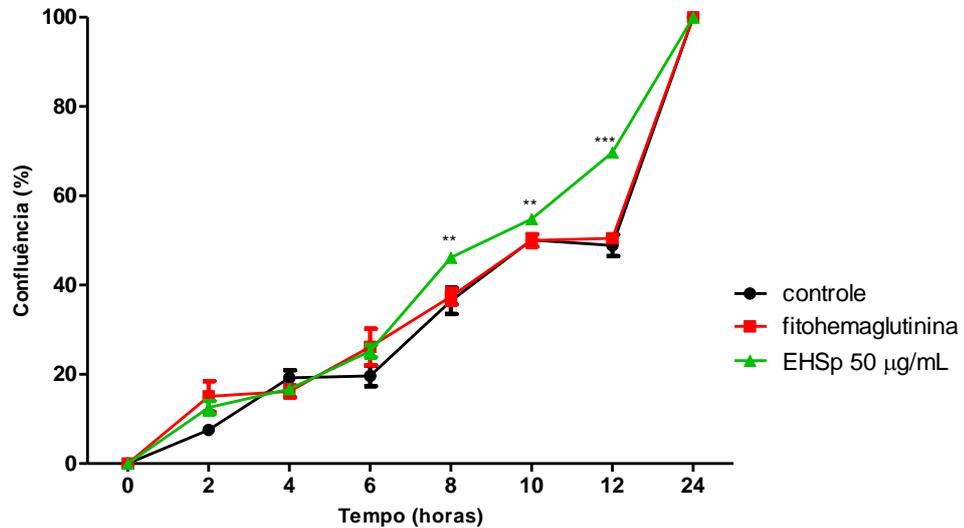
Ensaio com células endoteliais humanas primárias constituem um importante método de avaliar a cicatrização, sendo as da veia umbilical humana (HUVEC) as mais utilizadas, por serem de fácil obtenção e disponibilidade (ANDRADE, 2009).

O teste de *Scratch* (risco) é uma forma de mimetizar a ferida *in vitro* e avaliar a taxa de migração celular e proliferação celular, parâmetros importantes na cicatrização. Neste ensaio, a organização das células em monocamada é interrompida, e em decorrência da baixa interação entre as células, ocorre um aumento da concentração dos fatores de crescimento e citocinas (PITZ et al., 2016).

Neste experimento, a porcentagem de confluência indicou a taxa de fechamento endotelial da lesão em diferentes intervalos de tempo. Foi possível observar que EHSp promoveu a migração significativa das células HUVEC a partir da 8ª hora após a adição do extrato ao meio, quando comparado ao grupo controle (Figura 27). Também pode ser constatado o fechamento total da injúria provocada no teste após 12 horas, o que sugere que EHSp exerce uma importante atividade proliferativa.

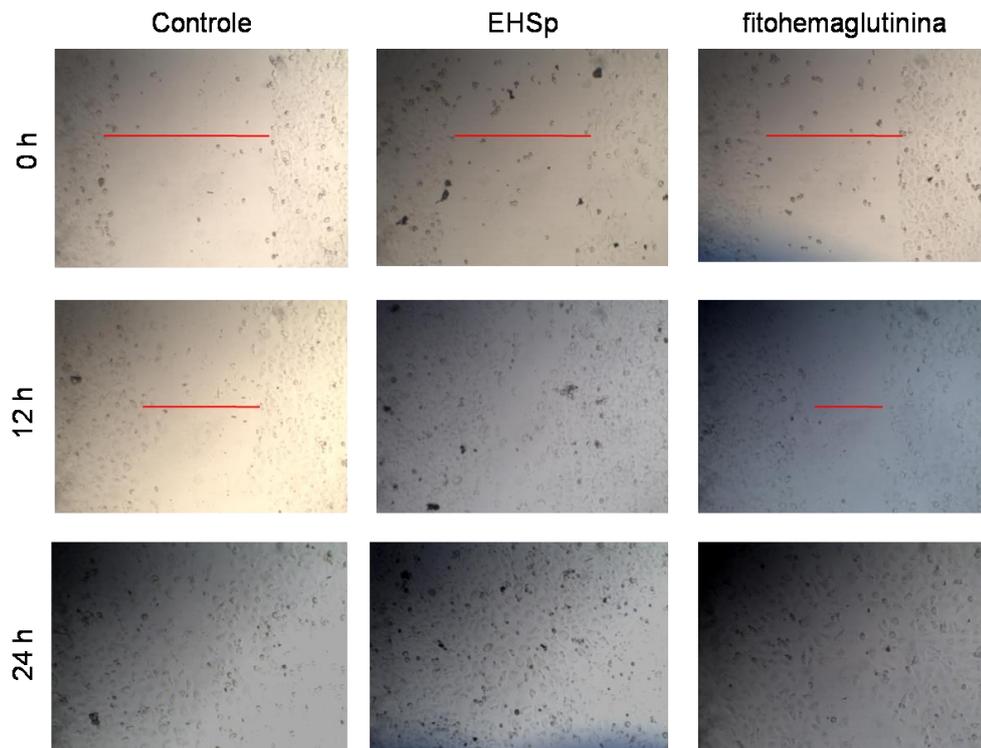
Figura 27 - Efeito do EHSp no fechamento da injúria endotelial e migração celular.

(A)



A porcentagem de confluência indica a taxa de fechamento endotelial da lesão em diferentes intervalos de tempo. Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey: ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,001$ comparados ao controle.

(B)



Imagens microscópicas da migração de células endoteliais (HUVEC) após injúria em diferentes intervalos de tempo (0, 12 e 24 h).

5.8.2 Avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*

No modelo de ácido acético, foi determinada a área de lesão ulcerativa (ALU), seguida das análises histopatológica e imunohistoquímica, e como parâmetro adicional, foi avaliada a toxicidade por doses repetidas durante 14 dias.

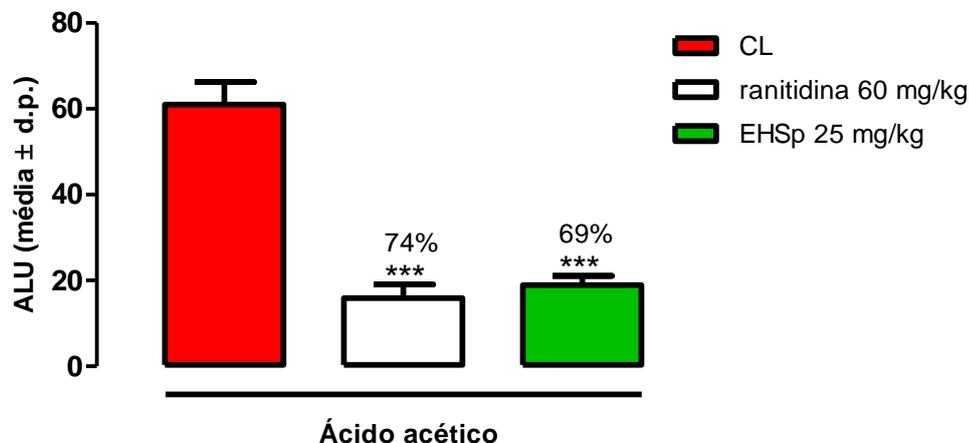
O modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos é um método reprodutível e considerado o que mais se assemelha à úlcera no homem, tanto em seus aspectos patológicos quanto em relação aos mecanismos de cicatrização (OKABE; AMAGASE, 2005, SARKAR et al., 2015).

O ácido acético estimula a liberação de histamina, permite a retrodifusão de íons H⁺ e aumenta permeabilidade capilar na região lesionada (TAKAGI, OKABE; SAZIKI, 1969; UMAMAHESWARI et al., 2007). Ademais, a úlcera é composta por duas regiões: a base, formada por tecido de granulação, rica em macrófagos e fibroblastos; e a região da margem, formada por uma mucosa não necrosada com sinais de cicatrização (TARNAWSKI, 2005).

Neste modelo, foi observada uma redução na ALU em 69 e 74%, após tratamento de 14 dias com ranitidina (60 mg/kg) e EHSp (25 mg/kg), respectivamente. O grupo *sham*, constituído por animais em que a úlcera não foi induzida, não apresentou lesão, conforme o esperado. De acordo com os resultados ilustrados na Figura 28, foi possível afirmar que EHSp apresentou atividade cicatrizante da úlcera gástrica induzida por ácido acético.

Em um estudo com o chá rico em epigallocatequina, um dos compostos majoritários de EHSp, demonstrou que resultados semelhantes foram alcançados para este modelo (HAMAISHI; KOJIMA; ITO, 2006).

Figura 28 - Efeito da administração oral de ranitidina e EHSp nas úlceras induzidas por ácido acético em ratos.



Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n= 6-7). ***p < 0,001. Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do pós- teste de Tukey, comparando ao grupo controle (CL).

5.8.3 Análise histopatológica

A renovação do epitélio gástrico é contínua, ocorre em um curto intervalo de tempo e envolve o equilíbrio entre os fatores de perda e regeneração (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

A análise histológica da mucosa gástrica do grupo *sham* (não exposto ao agente lesivo) revelou as camadas mucosa e submucosa preservadas, bem como a presença da barreira protetora de muco basal [Figura 29 (A) e (B)].

Quando lesionada ou ulcerada, a mucosa gástrica inicia um processo de cicatrização que engloba uma reação inflamatória, reepitelização, angiogênese e remodelação tecidual (LIU et al., 2015).

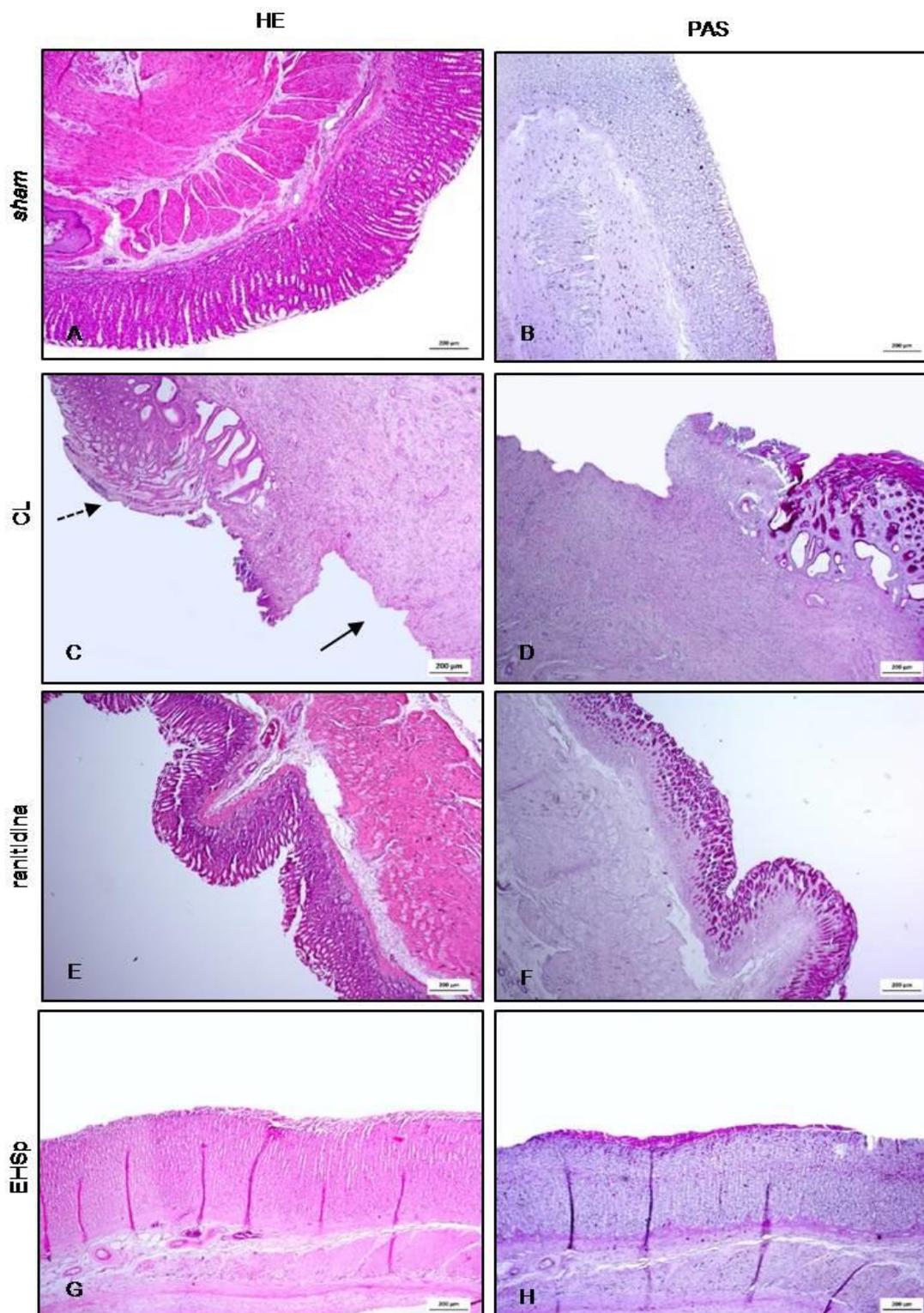
Nos estudos histológicos das mucosas gástricas lesionadas com ácido acético e coradas com HE e PAS, foi possível observar uma evidente destruição das camadas mucosa e submucosa no grupo controle lesionado – CL, com intensa esfoliação epitelial, edema, vasodilatação [Figura 29 (C)]. Houve, também, a perda de células de revestimento superficial e de células mucosas do colo, produtoras de muco, com conseqüente redução na quantidade de muco e comprometimento da barreira protetora [Figura 29 (D)].

Contudo, a presença de agentes terapêuticos pode acelerar este processo de reparo (SHAHROKHI; KESHAVARZI; KHAKSARI, 2015).

Nos estômagos tratados com ranitidina e EHSp, as análises demonstraram uma regeneração da mucosa gástrica, com reaparecimento da camada epitelial e estromal, em comparação com CL [Figura 29 (E) e (G)]. Na coloração de PAS - que destaca a presença ou ausência de muco nas glândulas da mucosa gástrica, as fossetas e glândulas gástricas aparecem bem preservadas e foi possível constatar a evidente presença da barreira protetora de muco, representada pelas áreas de intensa coloração roxa na camada epitelial superficial da mucosa [Figura 29 (F) e (H)].

Assim, estes resultados sugerem que, além de proteger a mucosa gástrica contra lesões, EHSp também acelerou o processo de cura da úlcera induzida por ácido acético.

Figura 29 - Análise histopatológica das mucosas gástricas coradas com HE e PAS de ratos submetidos à indução de úlceras com ácido acético.



Os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado, ranitidina e EHSp (25 mg/kg) durante 14 dias. Em A e B, observar mucosa e submucosa preservadas; em C e D, notar a ausência da camada epitelial (seta tracejada), desorganização do epitélio restante (seta tracejada) e ruptura da barreira de muco; de E a H, observar regeneração da mucosa gástrica, reaparecimento da camada epitelial e produção de muco evidente. Hematoxilina/eosina (HE) e coloração com ácido periódico de Schiff (PAS), ampliação 40x.

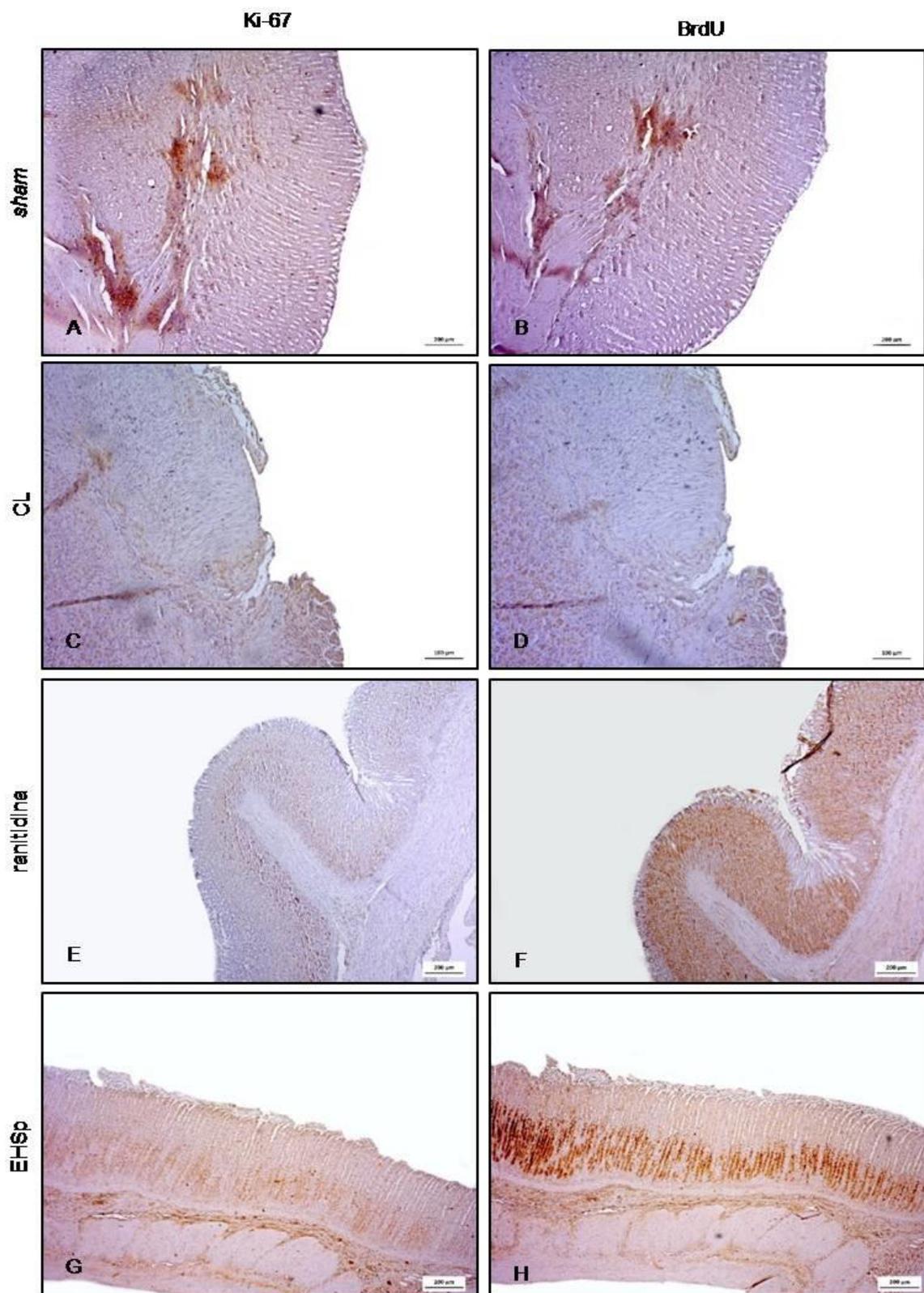
5.8.4 Análise imunohistoquímica

A regeneração tecidual foi avaliada a partir das análises imunohistoquímicas com anticorpos monoclonais contra Ki-67 e BrdU, marcadores indicados para avaliar a proliferação celular e o reparo do DNA. A proteína Ki-67 está presente exclusivamente no núcleo da célula nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2). Já na mitose, parte desta proteína é direcionada para os cromossomos, e nas células em estado de repouso (fase G0) está ausente (CUYLEN et al., 2016). Assim, apenas as células em proliferação ativa são positivas para a coloração com Ki-67 (MUSKHELISHVILI et al., 2003).

O BrdU é um nucleosídeo sintético, análogo da timidina, que é incorporado no núcleo da célula na fase S do ciclo celular. As células positivas para BrdU são detectadas devido à incorporação de BrdU no lugar da timidina, durante a replicação do DNA (WEBSTER et al., 2016).

Nesta análise, foi possível constatar que no grupo controle lesionado (CL) não houve reatividade para os marcadores, em decorrência da destruição da camada epitelial. No tratamento com ranitidina, houve forte reatividade para marcação com BrdU, mas moderada para Ki-67. Nos grupos tratados com EHSp, os anticorpos contra Ki-67 e BrdU demonstraram forte reatividade (intensa coloração marrom) na mucosa gástrica, o que indica uma acentuada atividade proliferativa das células na reconstrução da região lesionada pelo ácido acético (Figura 30).

Figura 30 - Análise imunohistoquímica por Ki-67 e BrdU das mucosas gástricas de ratos submetidos à indução de úlceras com ácido acético.



Os animais foram tratados via oral com solução aquosa de Tween 80 1% - controle lesionado, ranitidina e EHSp (25 mg/kg) durante 14 dias. As microfotografias representam a imunorreatividade para para Ki-67 e BrdU, ampliação 200x.

5.8.5 Avaliação da toxicidade de doses repetidas durante 14 dias

Na avaliação dos consumos de água e ração, os animais tratados com doses repetidas de EHSp e ranitidina não apresentaram qualquer alteração quando em comparação ao controle negativo, conforme evidenciado na Tabela 14. Entretanto, nos animais do grupo *sham* foi observado um aumento significativo nestes consumos, visto que não foram submetidos ao processo cirúrgico, acompanhado de um consequente aumento de massa corporal.

A administração de EHSp e ranitidina não promoveu alterações na massa corporal (Tabela 15) nem no índice relativo de órgãos dos ratos (Tabela 16), quando comparados ao controle.

Portanto, EHSp promoveu uma toxicidade mínima em ratos, nas condições testadas, corroborando os dados obtidos na toxicidade aguda em camundongos.

Tabela 14 - Efeito da administração oral do EHSp da ranitidina durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.

Tratamento	Dose	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
<i>Sham</i>	-	484,20 ± 49,92***	223,70 ± 13,17***
Solução aquosa de Tween 80 1%	10 mL/kg	327,30 ± 36,95	147,60 ± 10,00
ranitidina	60 mg/kg	302,50 ± 29,89	157,70 ± 10,25
EHSp	25 mg/kg	372,5 ± 37,06	160,00 ± 5,95

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n= 6-7). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. ***p< 0,001, comparados ao grupo controle (solução aquosa de Tween 80 1%).

Tabela 15 - Efeito da administração oral do EHSp e da ranitidina durante 14 dias sobre a massa dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.

Tratamento	Dose	Massa inicial (g)	Massa final (g)
<i>Sham</i>	-	246,60 ± 32,39***	303,60 ± 27,02***
Solução aquosa de Tween 80 1%	10 mL/kg	206,70 ± 12,00	230,90 ± 21,59
ranitidina	60 mg/kg	227,00 ± 12,74	238,30 ± 11,03
EHSp	25 mg/kg	210,00 ± 15,90	224,80 ± 16,41

Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n= 6-7). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey. ***p< 0,001, comparados ao grupo controle (solução aquosa de Tween 80 1%).

Tabela 16 - Efeito da administração oral da ranitidina e do EHSp durante 14 dias sobre o índice relativo dos órgãos dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.

Índice de órgãos (g/g)	Tratamentos			
	<i>Sham</i>	Solução aquosa de Tween 80 1%	ranitidina (60 mg/kg)	EHSp (25 mg/kg)
Fígado	35,73 ± 3,36	37,88 ± 3,18	34,83 ± 3,41	37,72 ± 2,19
Rins	8,26 ± 0,23	8,74 ± 0,45	7,92 ± 0,71	9,29 ± 0,71
Baço	3,00 ± 0,11	3,21 ± 0,32	2,84 ± 0,20	3,51 ± 0,59

Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n= 6-7). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

- ✓ Os extratos de *Spondias purpurea* contêm flavonoides, derivados cinâmicos, terpenos e esteroides;
- ✓ O ácido cafeico e a epigalocatequina foram identificados no extrato hexânico e o ácido tânico foi encontrado nos extratos acetato de etila e etanólico;
- ✓ Os extratos das folhas de *S. purpurea* indicaram relevante atividade antioxidante *in vitro*;
- ✓ EHSp e EASp revelaram baixa toxicidade nas condições e parâmetros avaliados;
- ✓ EHSp, nas doses estudadas, apresentou atividade gastroprotetora em modelos de lesão gástrica aguda induzida por etanol acidificado em camundongos, etanol absoluto e indometacina em ratos, bem como reduziu os níveis de TNF- α e aumentou as concentrações de GSH;
- ✓ EHSp reduziram o conteúdo secretório gástrico de forma significativa no modelo de ligadura de piloro, o que sugere um mecanismo antissecretório;
- ✓ A atividade gastroprotetora exercida por EHSp não envolve a participação do óxido nítrico;
- ✓ O efeito citoprotetor do EHSp é promovido por grupos sulfidrílicos e pelo aumento na produção de muco;
- ✓ EHSp demonstrou atividade cicatrizante *in vitro* em células endoteliais, e *in vivo*, no modelo de lesão induzida por ácido acético.

Referências

REFERÊNCIAS

ACHARYYA, S.; DASH, G.; MONDAL, S.; DASH, S. K. Antioxidative and antimicrobial study of *Spondias mangifera* willd root. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, 2010.

ADINORTEY, M. B.; ANSAH, C.; GALYUON, I.; NYARKO, A. In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. **Ulcers**, v. 2013, 2013.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AKINMOLADUN, A. C.; OBUOTOR, E. M.; FAROMBI, E. O. Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities of Some Nigerian Indigenous Medicinal Plants. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 444-451, 2010.

AL BATRAN, R; AL-BAYATY, F; AL-OBAIDI; ABDUALKADER, A. M.; HADI, H. A.; ALI, M. H.; ABDULLA, M.A. In vivo antioxidant and antiulcer activity of *Parkia speciosa* ethanolic leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **PLoS ONE**, v.8, 2013.

ALMASAUDI, S. B.; EL-SHITANY, N. A.; ABBAS, A. T.; ABDEL-DAYEM, U. A.; ALI, S. S.; AL JAOUNI, S. K.; HARAKEH, S. Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antiulcer Potential of *Manuka honey* against Gastric Ulcer in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

ALMEIDA, A. L.; BELEZA, M. L. M. L.; CAMPOS, A.; ROSA, R. L.; ANDRADE, S. F.; FILHO, V. C.; NESELLO, L. A. N. Phytochemical profile and gastroprotective potential of *Myrcianthes pungens* fruits and leaves. **Nutrire**, v. 42, p. 24, 2017.

ALMEIDA, C. L. F. **Atividade gastroprotetora de *Spondias purpuea* L. (Anacardiaceae) em modelos animais**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

ALMEIDA, L. L.; TEIXEIRA, A. A. C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Histopathological analysis of the small intestine of pregnant rats exposed to sub-lethal doses of herbicides and treated with melatonin. **Experimental Pathology and Health Sciences**, v. 6, p. 63, 2014.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANAS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. de F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALRASHDI, A. S.; SALAMA, S. M.; ALKIYUMI, S. S.; ABDULLA, M. A.; HADI, A. A. H.; ABDELWAHAB, S. I.; TAHA, M. M.; HUSSIANI, J.; ASYKIN, N. Mechanisms of Gastroprotective Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Jasminum sambac* against HCl/Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2012, p. 1-15, 2012.

ANDRADE, C. M. **Avaliação do efeito-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ARAGÃO, T. P.; PRAZERES, L. D. K. T.; BRITO, S. A.; ROLIM NETO, P. J.; ROLIM, L. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ROCHA CALDAS, G. F.; WANDERLEY, A. G. Contribution of secondary metabolites to the gastroprotective effect of aqueous extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 1-18, 2018.

ARIF, M.; ZAMAN, K.; FAREED, S.; HUSSAIN, S. Antibacterial, antidiarrhoeal and ulcer-protective activity of methanolic extract of *Spondias mangifera* bark. **International Journal of Health Research**, v. 1, n. 4, p.177-182, 2008.

ARUMUGAM, R.; NATESAN, V. Urea cycle pathway targeted therapeutic action of naringin against ammonium chloride induced hyperammonemic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 1028–1037, 2017.

ASLAM, B.; ANWAR, H.; JAVED, I.; KHALIQ, T.; RAZA, A.; SHAMSHAD-UL-HASSAN. Gastroprotective potential of *Artemisia parviflora* on aspirin induced gastric ulcers in albino rabbits. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 44, p. 561-566, 2017.

ATEUFACK, G.; MOKAM, E. C. D.; MBIANTCHA, M.; FEUDJIO, R. B. D.; DAVID, N.; KAMANYI, A. Gastroprotective and ulcer healing effects of *Piptadeniastrum africanum* on experimentally induced gastric ulcers in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p. 1-10, 2015.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMUB, M. A.; UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 166–175, 2006.

BACHELIER, J. B.; ENDRESS, P. K. Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae and Burseraceae (Sapindales), with a special focus on gynoecium structure and evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, n. 4, p. 499-571, 2009.

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.

BALAN, T.; SANI, M. H. M.; AHMAD, S. H. M.; SUPPAIAH, V.; MOHTARRUDIN, N.; ZAKARIA, Z. A. Antioxidant and anti-inflammatory activities contribute to the prophylactic effect of semi-purified fractions obtained from the crude methanol extract of *Muntingia calabura* leaves against gastric ulceration in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 1-15, 2015.

BANERJEE, A.; HARUN AL RASHID, M. D.; RAHMAN, A.; PAL, T. K. *In-vivo* screening of ethanolic extract of *Biophytum sensitivum* DC leaves on peptic ulcer induced by aspirin in wistar albino rats. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 3, n. 6, p. 418-422, 2014.

BANSAL, V. K.; GOYAL, S. K.; GOSWAMI, D. S.; SINGLA, S.; RAHAR, S.; KUMAR, S. Herbal approach to peptic ulcer disease - REVIEW. **Journal of Bioscience and Technology**, v. 1, n. 1, p. 52-58, 2009.

BATISTA, M. T. A.; RODRIGUES, H. G.; FONSECA, L. C.; BONETTI, A. M.; PENHA-SILVA, N.; NERES, A. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 22- 24, 2007.

BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. L.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 227-232, 2004.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERENGUER, B.; TRABADELA, C.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; QUÍLEZ, A.; MIÑO, P.; DE LA PUERTA, R.; MARTÍN-CALERO, M. J. The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. Protect against NSAID-induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 153-160, 2007.

BERI, C. L.; SOOD, R.; HEMRAJ; GUPTA, A. Stomach specific mucoadhesive microspheres as controlled drug delivery system – a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 21-26, 2013.

BERNHARDT, E. Medicinal Plants of Costa Rica. **Costa Rica: Zona Tropical Publications**. 2008.

BERRIDGE, M. J. Cell Signalling Biology – Module 7. 2012, 12-24, doi: 10.1042/csb0001007. Available online: <http://www.cellsignallingbiology.org/csb/007/csb007.htm> (Accessed on 01 February 2018).

BESERRA, F. P. **Determinação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antiulcerogênico, antidiarreico e anti-inflamatório da insulina vegetal (Cissus sicyoides Linneu) em modelos animais**. 2014. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo.

BJARNASON, I.; SCARPIGNATO, C.; TAKEUCHI, K.; RAINSFORD, K. D. Determinants of the shortterm gastric damage caused by NSAIDs in man. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 95–106, 2007.

BLANDIZZI, C.; COLUCCI, M. T. R. FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; GHISU, N.; TACCAC, M. D. Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 90–100, 2009.

BORGES, S. V.; MAIA, M. C. A.; GOMES, R. D. C. M.; CAVALCANTI, N. B. Chemical composition of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) seeds. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 49-52, 2007.

BRANDÃO, I. C.; SUZUKI, M. S.; LAS CASAS, L.; PETERS, V. M. Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas gestantes tratadas com extrato aquoso de piper methysticum: observações preliminares. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 4, p. 18-22, 2009.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASSEUR, T.; ANGENOT L. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: Le melange diphenylborate d'aminoethanol - PEG 400. **Bulletin Liaison Groupe Polyphenols**, v. 13, pp. 139-141, 1986.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2011.

BUACHAN, P.; CHULAROJMONTRI, L.; WATTANAPITAYAKUL, S. K. Selected Activities of *Citrus Maxima* Merr. Fruits on Human Endothelial Cells: Enhancing Cell Migration and Delaying Cellular Aging. **Nutrients**, v. 6, p. 1618- 1638, 2014.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, p. 287-299, 2009.

CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 55-73, 1990.

CALATAYUD, S.; BARRACHINA, D.; ESPLUGUES, J. V. Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 325-335, 2001.

CALDAS-FILHO, M. R. D. **Avaliação da atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (CELASTRACEAE)**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2013.

CARVALHO, E. B.; BORGES, E. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.; MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÁ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrado de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

CEVA-ANTUNES, P. M.; BIZZO, H. R.; SILVA, A. S.; CARVALHO, C. P. S.; ANTUNES, O. A. C. Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea*

L.) by solid phase microextraction (SPME). **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 437-443, 2006.

CHALISE, J. P.; ACHARYA, K.; GURUNG, N.; BHUSAL, R. P.; GURUNG, R.; SKALKO-BASNET, N.; BASNET, P. Antioxidant activity and polyphenol content in edible wild fruits from Nepal. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 425-432, 2010.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M.; SINGH, J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p.173-180, 2002.

CHEN, H.; LIAO, H.; LIU, Y.; ZHENG, Y.; WU, X.; SU, Z.; ZHANG, X.; LAI, Z.; LAI, X.; LIN, Z.; SU, Z. Protective effects of pogostone from *Pogostemonis herba* against ethanol-induced gastric ulcers in rats. **Fitoterapia**, v. 100, p. 110-117, 2015.

CHETIA, B.; GOGOI, S. Antibacterial activity of the methanolic extract of stem bark of *Spondias pinnata*, *Moringa oleifera* and *Alstonia scholaris*. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 6, n. 4, 2011.

CHINEDU, O.; IBRAHIM, K.G. Menthol Ameliorates Secretagogue-Induced Gastric Acid Secretion in the Rat. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 5, n.6, p. 113-118, 2017.

CHU, S.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Co-gastroenterology**, v. 28, n. 6, 2012.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p.1231–1234. 2002.

CUYLEN, S.; BLAUKPOF, C.; POLITI, A. Z.; MULLER-REICHERT, T.; NEUMANN, B.; POSER, I.; ELLENBERG, J.; HYMAN, A. A.; GERLICH, D. W. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature**, v. 535, n. 7611, p. 308, 2016.

DADUANG, J.; VICHITPHAN, S.; DADUANG, S.; HONGSPRABHAS, P.; BOONSIRI, P. High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 5, p. 608-615, 2011.

DAS, J.; MANNAN, A.; RAHMAN, M.; DINAR, A. M.; UDDIN, M. E.; KHAN, I.N.; HABIB, R.; HASAN, N. Chloroform and Ethanol Extract of *Spondias pinnata* and its Different Pharmacological activity Like- Antioxidant, Cytotoxic, Antibacterial Potential and Phytochemical Screening through In-Vitro Method. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 4, 2011.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DE JESUS, N. Z.; DE SOUZA FALCÃO, H.; GOMES, I. F.; DE ALMEIDA LEITE, T. J.; DE MORAIS LIMA, G. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; DE ATHAYDE-FILHO, P. F.; BATISTA, L. M. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, n. 3, p. 3203–3228, 2012.

DEVAULT, K. R.; TALLEY, N. J. Insights into the future of gastric acid suppression. **Natural Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, p. 524–532, 2009.

DIAS, J. A. B. **Avaliação das atividades gastropotetora, anti-inflamatória e antinociceptiva de *Spondias tuberosa* Arr. Cam. (Anacardiaceae)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

DJAHANGURI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, p.265-267,1969.

ENGELS, C.; GRÄTER, D.; ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M.; GÄNZLE, M. G.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 557-562, 2012.

FARIA, F. M. **Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante de *Rhizophora mangle* L.** 2009. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

FARZAEI, M. H.; ABDOLLAHI, M.; RAHIMI, R. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 21, p. 6499-6517, 2015.

FEHER, J. Quantitative Human Physiology: An introduction - **The stomach**. Editora Elsevier. v.1, p. 701-710, 2012.

FERREIRA, M. P.; NISHIJIMA, C. M.; SEITO, L. N.; DOKKEDAL, A. L.; LOPES-FERREIRA, M.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 170-174, 2008.

FIRMINO, C. B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2007.

FRAZIER, J. M. In vitro Toxicity testing. Applications to safety evaluation. New York, Marcel Dekker, Inc., 1992.

FRY, C. Secretions of the salivary glands and stomach. **Surgery** (Oxford), v. 27, p. 503-506, 2009.

GBOLADE, A. A.; ADEYEMI, A. A. Anthelmintic activities of three medicinal plants from Nigeria. **Fitoterapia**. v. 79, p. 223–225, 2008.

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Exotic Fruits and Commercial Frozen Pulpes from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 3, 207-214, 2008.

GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. **Methods in enzymology**, v. 440, p. 361-380, 2008.

GONDIM, P. J. S.; SILVA, S. M.; PEREIRA, W. E.; DANTAS, A. L.; NETO, J. R. C.; SANTOS, L. F. Qualidade de frutos de acessos de umbu-cajazeira (*Spondias* sp.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.11, p.1217–1221, 2013.

GOUVÊA-E-SILVA, L. F. 2006. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

GUERRERO, M. G. M. Obtencion y aprovechamento de extractos vegetales de la flora Salvadorena. 2.ed. San Salvador, El salvador: Ed. Universitaria, Universidad de El Salvador, 564p, 1994.

GUSTAFSSON, B. I.; BAKKE, I.; HAUSO, Y.; KIDD, M.; MODLIN, I. M.; FOSSMARK, R.; BRENNAN, E.; WALDUM, H. L. Parietal cell activation by arborization of ECL cell cytoplasmic projections is likely the mechanism for histamine induced secretion of hydrochloric acid. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 46, p. 531-537, 2011.

HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2206-13, 2006.

HARBORNE, J. B. **Textbook of Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. Chapman and Hall Ltd, 5.ed, London, 1998.

HIRUMA-LIMA, C. A.; BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 406–409, 2009.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

IDOWU, O. A.; SONIRAN, O. T.; AJANA, O.; AWORINDE, D. O. Ethnobotanical survey of antimalarial plants used in Ogun State, Southwest Nigeria. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 055-060, 2010.

IWEALA, E. E. J.; OLUDARE, F. D. Hypoglycemic effect, biochemical and histological changes of *Spondias mombin* Linn. and *Parinari polyandra* Benth. seeds ethanolic extracts in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 6, n. 2, p. 101-112, 2011.

JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S. M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J. R.; BHOSALE, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of

acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.

JANBAZ, K.H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. **Phytomedicine**, v. 11, p. 424-430, 2004.

JOZEF CZAK, M.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 3145-3175, 2012.

KASTL, J. T. Renal function in the fetus and neonate - The creatinine enigma. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 83-89, 2017.

KAZMI, M.; ALI, H.; AZIZ, S. Gastroesophageal Reflux Disorder: Difficulties in Diagnosis and Treatment in Infants. **Annals Abbasi Shaheed Hospital & Karachi Medical & Dental College**, v. 22, n.1, p. 54-59, 2017.

KHALED-KHODJA, N.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; MADANI, K. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 41-48, 2014.
KOPIC, S.; GEIBEL, J. Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health. *American Physiological Society*, v. 93, p. 189-268, 2013.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Reviews in Basic and a Clinical Gastroenterology*. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41-60, 2008.

LAKSHMI, V.; SINGH, N.; SHRIVASTVA, S.; MISHRA, S. K.; DHARMANI, P.; MISHRA, V.; PALIT, G. Gedunin and photogedunin of *Xylocarpus granatum* show significant anti-secretory effects and protect the gastric mucosa of peptic ulcer in rats. **Phytomedicine**, v. 17, p. 569-574, 2010.

LEMOS, A. J. J. M.; PEIXOTO, C. A.; TEIXEIRA, A. A. C.; LUNA, R. L. A.; ROCHA, S. W. S.; SANTOS, H. M. P.; SILVA, A. K. S.; NUNES, A. K. S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Effect of the combination of metformin hydrochloride and melatonin on oxidative stress before and during pregnancy, and biochemical and histopathological analysis of the livers of rats after treatment for polycystic ovary syndrome. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 280, p. 159-168, 2014.

LEMOS, A. J. J. M.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; SILVA, F. C. A.; OLIVEIRA, J. V.; SIQUEIRA, H. A. A. Response of blastocyst - endometrium interactions in albino rats to sublethal doses of biological and synthetic insecticides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2541-2547, 2011.

LI, H. B.; WONG, C. C.; CHENG, K. W.; CHEN, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008.

LI, X.; WU, X.; HUANG, L. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix *Angelicae sinensis* (Danggui). **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5349-5361, 2009.

LIU, J.; WEI, X. Y.; WANG, Y. G.; ZHANG, D. D.; WANG, T. M.; LV, J. H.; GUI, J.; MENG, Q.; ZONG, Z. M. Mild oxidation of *Xiaolongtan lignite* in aqueous hydrogen peroxide-acetic anhydride. **Fuel**, v. 142, p. 268-273, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUO J.; CHEN, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 3, p. 259-264, 2005.

LUTNICKI, K.; SZPRINGER, E.; WRÓBEL, J.; JAWORSKA-ADAMU, J. in: Verapamil and calcium ions in ethanol evoked gastric mucosa injury, *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Sect. DDD XIX*, p. 275-281, 2006.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules**, v. 20, p. 9099 – 9123, 2015.

MARTINS, J. L. R.; RODRIGUES, O. R. L.; SILVA, D. M.; GALDINO, P. M.; DE PAULA, J. R.; ROMÃO, W.; DA COSTA, H. B.; VAZ, B. G.; GHEDINI, P. C.; COSTA, E. A. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargeton gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1616-1624, 2014.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by

mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesion in rats. **Life Science**, v. 65, p. 27-32, 1999.

MEHTA, D. Ulcer - Review on types, anti-ulcer drugs, anti-ulcer medicinal plants, anti-ulcer drug market, diagnostics and current global clinical trials status. **Pharmacy Practice**, v. 2016, n. 2, p. 1-8, 2016.

MEJIA, A.; KRAFT, W. K. Acid peptic diseases: Pharmacological approach to treatment. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 259-314, 2009.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MESSIAS, J. B.; CARACIOLO, M. C. M.; DE OLIVEIRA, I. M.; MONTARROYOS, U. R.; BASTOS, I. V.G.A.; GUERRA, M. O.; SOUZA, I. A. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas no segundo terço da gestação submetidas à ação do extrato metanólico de *Cereus jamacaru* DC. Cactaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 478-483, 2010.

MILLER, A.; SCHAAL, B. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. **PNAS**, v. 102, p. 12801–12806, 2005.

MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A. Gastric epithelial stem cells. **Gastroenterology**, v. 140, p. 412-424, 2011.

MITCHELL, S. A.; AHMAD, M. H. A Review of Medicinal Plant Research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948–2001. **West Indian Medical Journal**, v. 55, n. 4, p. 243, 2006.

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

MONTENEGRO, C. A.; LIMA, G. R. M.; GOMES, I. F.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. Gastroprotective Effect of *Xylopija langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae): Involvement of Endogenous Sulfhydryls Compounds and Nitric Oxide. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 2, p. 165-183, 2014.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.

MUHAMMAD, A.; RAHMAN, S.; KABIR, H.; KABIR, S.; HOSSAIN, K. Antibacterial and cytotoxic activities of *Spondias pinnata* (Linn. f.) Kuirz fruit extract. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 2, p. 265-267, 2011.

MURAKAMI, S., MURAMATSU, M.; OTOMO, S. Inhibitory effect of tannic acid on gastric H⁺, K⁺-ATPase. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 4, p. 513-516, 1992.

MUSKHELISHVILI, L.; LATENDRESSE, J.R.; KODELL, R.L.; HENDERSON, E.B. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67 (MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51, n. 12, p. 1681-1688, 2003.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 30, p. 517-531, 2009.

MUTHURAMAN, A.; RAMESH, M.; CHAUHAN, A. Mitochondrial dependent apoptosis: ameliorative effect of flunarizine on ischemia-reperfusion of celiac artery-induced gastric lesions in the rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 8, p. 2244-2251, 2011.

MUTHURAMAN, A.; SOOD, S. Antisecretory, antioxidative and antiapoptotic effects of montelukast on pyloric ligation and water immersion stress induced peptic ulcer in rat. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 83, n. 1, p. 55-60, 2010.

NAGATA, H.; AKIBA, Y.; SUZUKI, H.; OKANO, H.; HIBI, T. Expression of Musashi-1 in the rat stomach and changes during mucosal injury and restitution. **FEBS letters**, v. 580, n. 1, p. 27-33, 2006.

NAGESWARARAO, K.B.; LAKSHMI, K.; RAMAKRISHNA, R. Nitric oxide: A novel therapeutic target. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 7, p. 1603-1615, 2011.

NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 14, p. 2053-2060, 2007.

NAJM, W.I. Peptic ulcer disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 38, p. 383-394, 2011.

NAKAHARA, R.; HARADA, H.; SUEHIRO, S. Polyglycolic acid sheets for rectal ulcer caused by aluminum potassium sulfate and tannic acid sclerotherapy. **Digestive Endoscopy**, v. 29, n.7, p. 813-814, 2017.

NAKASHITA, M.; SUZUKI, H.; MIURA, S.; TAKI, T.; UEHARA, K.; MUZUSHIMA, T.; NAGATA, H.; HIBI, T. Attenuation of acetic acid-induced gastric ulcer formation in rats by glucosylceramide synthase inhibitors. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 2, p. 354-362, 2013.

NASCIMENTO, R. F.; SALES, I. R. P.; FORMIGA, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOBRAL, M. V.; TAVARES, J. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M. Activity of alkaloids on peptic ulcer: what's new? **Molecules**, v. 20, n.1, p. 929-950, 2015.

NATESAN, V.; MANI, R.; ARUMUGAM, R. Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p.192-202, 2016.

NESELLO, L. A. N.; CAMPOS, A.; ROSA, R. L.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL FILHO, V. Screening of wild fruit trees with gastroprotective activity in different experimental models. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 54, n. 2, p. 135-138, 2017.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. *Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*. Guideline: 423. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDGL423.pdf>. Acesso em fevereiro de 2018.

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

OLIVEIRA, M. A. **Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de Spondias purpúrea L. (Anacardiaceae)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

OLIVEIRA, M. C.; LEMOS, L. M.; OLIVEIRA, R. G.; DALL'OGGIO, E. L.; DE SOUSA JÚNIOR, P. T.; DE OLIVEIRA MARTINS, D. T. Evaluation of toxicity of *Calophyllum brasiliense* stem bark extract by *in vivo* and *in vitro* assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 30–38, 2014.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K. V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 56-67, 2000.

OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. S.; RABELO, L. A.; MANO, C. M.; BECHARA, E. J. H.; SAWAYA, A. C. H. F.; TREVISAN, M. T. S.; COSTA, J. G.; FERREIRA, R. C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 334-344, 2012.

O'NEIL, D. H. R.; LEONARD, A. Gastric disorders: modifications of gastric content, antacids and drugs influencing gastric secretions and motility. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 13, n. 2, 2011.

OYAGI, A.; OGAWA, K.; KAKINO, M.; HARA, H. Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 45, 2010.

PALLE, S.; KANAKALATHA, A.; KAVITHA, C. N. Gastroprotective and antiulcer effects of *Celastrus paniculatus* seed oil against several gastric ulcer models in rats. **Journal of Dietary Supplements**, p. 1-13, 2017.

PARK, S.; HAHM, K.; OH, T.; JIN, J.; CHOUE, R. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 3, p. 384-394, 2004.

PELL, S.K., MITCHELL, J.D., MILLER, A.J. & LOBOVA, T.A. Anacardiaceae, In K. Kubitzki (ed.) The families and genera of vascular plants. X. Flowering plants. Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales. Springer, Berlin, p. 7-50, 2011.

PINCHUK, I.; SHOVAL, H.; DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 638-647, 2012.

PITZ, H. D. S.; PEREIRA, A.; BLASIUS, M. B.; VOYTENA, A. P. L.; AFFONSO, R. C. L. FANAN, S.; TREVISAN, A. C. D.; RIBEIRO- DO-VALLE, R. M.; MARASCHIN, M. *In Vitro* Evaluation of the Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) Fruit Peel Hydroalcoholic Extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1- 6, 2016.

PIZA, Ana Rita de Toledo. **Avaliação e caracterização proteica do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos, células endoteliais e em modelos de cicatrização.** 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, University of São Paulo, São Paulo, 2012. doi:10.11606/T.87.2012.tde-21092012-102841. Acesso em: 2018-03-31.

PRABHU, K.; RAJAN S. Assessment of Antiulcer Activity of Ethanolic Extract of *Mangifera indica* Seed Kernel Using Acid Ethanol Induced Ulcer Model. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 4, p. 854-860, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PROCTOR, M. J.; DEANS, C. Complications of peptic ulcers. **Surgery**, 2014.

QADER, S. W., ABDULLA, M. A., CHUA, L. S., & HAMDAN, S. Potential bioactive property of *Polygonum minus* Huds (kesum) review. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 2, p. 90-93, 2012.

RABELO A. S.; OLIVEIRA, I. D.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; PRATA, A. P. N.; GELAIN, D. P.; VENCESLAU, E. M.; SANTOS, J. P. A.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SANTOS, A. D. C.; NOGUEIRA, P. C. L.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; ARAÚJO, A. A. S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 11-17, 2013.

RAFFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M. A.; MOSSA, J. S.; AGEEL, A. M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p 25-34, 1990.

RAJEH, M. A.; KWAN, Y. P.; ZAKARIA, Z.; LATHA, L. Y.; JOTHY, S. L.; SASIDHARAN, S. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 3, p. 170-177, 2012.

RAMOS, K. R. L. P. **Avaliação da atividade antidiarreica de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) em modelos animais**. 2013. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

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, p. 125-132, 1998.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REBAYA, A.; BELGHITH, S. I.; BAGHDIKIAN, B. Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Bizerte, Tunisi, v. 5, n. 2, p. 52-57, 2014.

ROBERTS, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p. 72-80, 1957.

ROCHA CALDAS, G. F.; OLIVEIRA, A. R. S.; ARAÚJO, A. V.; LAFAYETTE, S. S. L.; ALBUQUERQUE, G. S.; SILVA-NETO, J. C.; COSTA-SILVA, J. H.; FERREIRA, F.; COSTA, J. G. M.; WANDERLEY, A. G. Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, mar./abr. 2010.

ROVERE-QUERINI, P.; CLEMENTI, E.; BRUNELLI, S. Nitric oxide and muscle repair: multiple actions converging on therapeutic efficacy. **European Journal of Pharmacology**, v. 730, p. 181-185, 2014.

ROZZA, A. L.; MEIRA DE FARIA, F.; SOUZA BRITO, A. R.; PELLIZZON, C. H. The gastroprotective effect of menthol: involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SALASPURO, M. P. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 679-694, 2003.

SALGA, M. S.; ALI, H. M.; ABDULLA, M. A.; ABDELWAHAB, S. I. Gastroprotective activity and mechanism of novel dichlorido-zinc (II)-4-(2-(5-methoxybenzylideneamino) ethyl) piperazin-1-iumphenolate complex on ethanol-induced gastric ulceration. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 2, p. 144-153, 2012.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2005.

SANTOS, V. L. **Avaliação da atividade antiulcerogênica, antidiarreica e antiespasmódica do extrato etanólico bruto e fase acetato de etila obtidos da entrecasca do caule de *Maytenus rigida* mart. (celastraceae) em modelos animais.** Tese (doutorado) - Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

SARKAR, S.; SENGUPTA, A.; MUKHRJEE, A.; GURU, A.; PATIL, A.; KANDHARE, A. D.; BODHANKAR, S. L. Antiulcer potential of morin in acetic acid-induced gastric ulcer via modulation of endogenous biomarkers in laboratory animals. **Pharmacologia**, v. 6, n. 7, p. 273-281, 2015.

SATPATHY, G.; TYAGI, Y. K.; GUPTA, R. K. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. **Food Research International**, v. 44, p. 2076–2087, 2011.

SAUNDERS, F. R.; HUGHES, A.; WALLACE, H. M. Investigating the effects of NSAIDs on the expression of regulatory components of the polyamine pathway. **Toxicology**, v. 253, p.22-23, 2008.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111-125, 2015.

SCHIAR, V. P. P.; SANTOS, D. B.; LUDTEK, D. S.; VARGAS, F.; PAIXÃO, M. W.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 1, p. 139-145, 2007.

SCHLESIER, K.; HARWAT, M.; BOHM, V.; BITSCH, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. **Free Radical Research**, v. 36, n. 2, p. 177–187, 2002.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, p. 536–542, 2011.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n. 6, p. 578-582, 2014.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 134, p.1842-1860, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SENDRA, J. M.; SENTANDREU, E.; NAVARRO, J. L. Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 615–624, 2006.

SHAHROKHI, N.; KESHAVARZI, Z.; KHAKSARI, M. Ulcer healing activity of *Mumijo aqueous* extract against acetic acid induced gastric ulcer in rats. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 56, 2015.

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

SHEEBA, M. S.; PHILIP, S.; TOM, G.; GAYATHRI, L. T.; ASHA, V. V. Comparative evaluation of the efficacy of *Cardiospermum halicacabum* Linn. on Indomethacin, Pylorus ligation and *Helicobacter pylori* induced gastric ulcer in rats. **Annals of Phytomedicine**, v. 1, p. 63-72, 2016.

SHIMOYAMA, A. T.; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; SILVA, A. M. O.; MELO, I. L. P. M.; MANCHNI-FILHO, J.; FASKY, S. H. P. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 1, p. 5-14, 2012.

SIKIRIC, P.; SEIWERTH, S.; GRABAREVIC, Z. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N^G-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. **European Journal of Pharmacology**, v. 332, p. 23-33, 1997.

SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. Anacardiaceae. **Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro**, 2012.

SOBHIAN, B.; JAFARMADAR, M.; REDL, H.; BAHRAMI, S. Nitric oxide-supplemented resuscitation improves early gastrointestinal blood flow in rats subjected to hemorrhagic shock without late consequences. **The American Journal of Surgery**, v. 20, p. 100-110, 2011.

SOLMAZ, A.; SENER, G.; CETINEL, S.; YUSKEL, M.; YEGEN, C.; YEGEN, B. C. Protective and therapeutic effects of resveratrol on acetic acid-induced gastric ulcer. **Free Radical Research**, v. 43, n. 6, p. 594-603, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA-BRITO, A. R. M. **Manual De Ensaio Toxicológicos *in vivo***. Campinas - SP: Editora UNICAMP, p. 122, 1994.

SRINIVASAN, K.; KEMPAIAH, R. K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 471- 478, 2006.

STENGEL, A.; HOFMAN, T.; GOEBEL-STENGEL, M.; AHNIS, A.; ELBELT, U.; LAMBRECHT, N. W. G.; ORDEMANN, J.; KLAPP, B. F.; KOBELT, P. Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 are expressed in the same gastric cell and differentially correlated with body mass index in obese subjects. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 139, n. 6, p. 909-918, 2013.

STEWART, D. J.; ACKROYD, R. Peptic ulcers and their complications. **Oesophagus and Stomach**, v. 29, n. 30, p. 568-574, 2011.

SUMBUL, S.; AHMAD, M. A.; MOHD, A.; MOHD, A. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An Overview. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 3, p.361-367, 2011.

SUNG, J. J. Y.; KUIPERS, E. J.; EL-SERAG, H. B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 938-946, 2009.

SUN-WATERHOUSE, D.; ZHOU, J.; MISKELLY, G. M.; WIBISONO, R.; WADHWA, S. S. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1049-1056, 2011.

SUZUKI, R. B.; COLA, R. F.; COLA, L. T. B.; FERRARI, C. G.; ELLINGER, F.; THEREZO, A. L.; SILVA, L. C.; ETEROVIC, A.; SPERANÇA, M. A. Different risk factors influence peptic ulcer disease development in a Brazilian population. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 38, p. 5404-5411, 2012.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Archives of Toxicology**, v. 41, p. 99-105, 1978.

TAKAGI, K., OKABE, S, SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 19, p. 418-426, 1969.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: Cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 126-132, 2013.

THAKKAR, N.; SLIZGI, J. R.; BROUWER, K. L. R. Effect of Liver Disease on Hepatic Transporter Expression and Function. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 9, p. 2282-2294, 2017.

THORSEN, K.; SOREIDE, J.A.; KVALOY, J.T.; GLOMSAKER, T.; SOREIDE, K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: Age-and gender-adjusted analysis of incidence and mortality. **World Journal of Gastroenterology**. v. 19, n. 3, p. 347-354, 2013.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, p. 2326–2331, 2011.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TU, P. S.; TUNG, Y. T.; LEE, W. T.; YEN, G. C. Protective Effect of Camellia Oil (*Camellia oleifera* Abel.) against Ethanol-induced Acute Oxidative Injury of the Gastric Mucosa in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 24, p. 4932-4941, 2007.

UMAMAHESWARI, M.; ASOKKUMAR, K.; RATHIDEVI, R.; SIVASHANMUGAM, A. T.; SUBHADRADEVI, V.; RAVI, T. K. Antiulcer and *invitro* antioxidant activities of *Jasminum grandiflorum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 464-470, 2007.

VAGHASIYA, Y.K.; SHUKLA, V. J.; CHANDA, S. V. Acute oral toxicity study of *Pluchea arguta* Boiss extract in mice. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 6, n. 2, p. 113-123, 2011.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 18, p. 464-471, 2008.

VIDAL, C. S.; MARTINS, A. O. B. P. B.; DE ALENCAR SILVA A, DE OLIVEIRA, M. R. C.; RIBEIRO-FILHO, J.; ALBUQUERQUE, T. R.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA ALMEIDA, J. R. G.; JUNIOR, Q. L. J.; MENEZES, I. R. A. Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 47-55, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**, Springer, 2.ed, Munich, 1996.

WALDUM, H. L.; HAUSO, O.; FOSSMARK, R. The regulation of gastric acid secretion – clinical perspectives. **Acta physiologica**, v. 210, p. 239-256, 2014.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W.; REUTER, B. K.; VERGNOLLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, v. 119, p. 706–714, 2000.

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

WANG, X. Y.; YIN, J. Y.; ZHAO, M. M.; LIU, S. Y.; NIE, S. P.; XIE, M. Y. Gastroprotective activity of polysaccharide from *Hericium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer, and its antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 100-109, 2018.

WANNAN, B. S. Analysis of generic relationships in Anacardiaceae. **Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**, v. 51, n. 1, p. 165-195, 2006.

WEBSTER, A. F.; WILLIAMS, A.; RECIO, L.; YAUK, C. L. Gene expression analysis of livers from female B6C3F1 mice exposed to carcinogenic and non-carcinogenic doses of furan, with or without bromodeoxyuridine (BrdU) treatment. **Genomics data**, v. 2, p. 117-122, 2014.

WIART, C. Medicinal plants of Asia and the Pacific. Taylor and Francis Group, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, p. 12, 2011.

YEH, C. J.; CHEN, C. C.; LEU, Y. L.; LIN, M. W.; CHIU, M. M.; WANG, S. H. The effects of artocarpin on wound healing: *in vitro* and *in vivo* studies. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.

ZELICKSON, M. S.; BRONDER, C. M.; JOHNSON, B. L.; CAMUNAS, J. A.; SMITH, D. E.; RAWLINSON, D.; VON, S.; STONE, H. H.; TAYLOR, S. M. *Helicobacter pylori* is not the predominant etiology for peptic ulcers requiring operation. **The American Surgeon**, v. 77, p. 1054-1060, 2011.

ZENGIN, G.; UYSAL, A.; GUNES, E.; AKTUMSEK, A. Survey of Phytochemical Composition and Biological Effects of Three Extracts from a Wild Plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. et Mey.): A Potential Source for Functional Food Ingredients and Drug Formulations. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-13, 2014.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHAO, X.; ZHU, K.; YI, R.; PENG, D.; SONG, J. L. Total flavonoid from *Balotus* leaf protected the reserpine-induced gastric ulcer in mice. **Biomedical Research**, v. 28, n. 1, p. 345-352, 2017.

Anexos

ANEXOS

Anexo A – Comitê de ética



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br

Recife, 10 de setembro de 2015

Ofício nº 87/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: Prof.ª Norma Buarque de Gusmão
 Departamento de Antibióticos
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.0185496/2015-22

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **“Spondias Purpúrea L. (ANACARDIACEAE): mecanismos antiulcerogênicos e estudo toxicológico do extrato etanólico e frações**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos e Departamento de Fisiologia e Farmacologia ; Animal Camundongo heterogênico; Linhagem; Swiss; idade; 60 dias; peso; 25-30g; nº de animais 66 (macho e fêmea) e ratos heterogênico; Linhagem wistar; idade; 90 dias; peso; 180-250g; nº de animais 180 (macho e fêmea); total de animais a ser utilizado; 246

Atenciosamente

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCB - UFPE
 UFPE SIAPE 1801584

Anexo B – Tabela de toxicidade

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos				
	(0) sem efeito, até 30'	(-) efeito diminuído, 1h	(+) efeito presente, 2h	(++) efeito intenso, 3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Prose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações complementares.: _____

Responsável Técnico

Anexo C – Aceite do artigo

13/02/2018

Gmail - Your article has been published



Cynthia Layse <cynthialayse@gmail.com>

Your article has been published

1 mensagem

Nourhan Mabrouk <Nourhan.Mabrouk@hindawi.com>

26 de outubro de 2017 23:16

Para: cynthialayse@gmail.com

Dear Dr. de Almeida,

I am pleased to let you know that your article has been published in its final form in "Oxidative Medicine and Cellular Longevity."

Cynthia Layse Ferreira de Almeida, "Spondias purpurea L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 8593073, 14 pages, 2017. doi:10.1155/2017/8593073.

You can access this article from the Table of Contents of Volume 2017, which is located at the following link:

<https://www.hindawi.com/journals/omcl/contents/>

Alternatively, you can access your article directly at the following location:

<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/8593073/>

"Oxidative Medicine and Cellular Longevity" is an open access journal, meaning that the full-text of all published articles is made freely available on the journal's website with no subscription or registration barriers.

Best regards,

Nourhan Mabrouk
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Hindawi
<https://www.hindawi.com/>