



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

SAMARA ALVES BRITO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DAS FOLHAS E FRUTOS
DE *Spondias mombin* L. (ANACARDIACEAE)

Recife
2018

SAMARA ALVES BRITO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DAS FOLHAS E FRUTOS
DE *Spondias mombin* L. (ANACARDIACEAE)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para obtenção do título doutora em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves
Wanderley**

**Coorientadora: Dr^a. Germana Freire Rocha
Caldas**

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

B862a Brito, Samara Alves.
Avaliação da atividade antiulcerogênica das folhas e frutos de *spondias mombin* L. (ANACARDIACEAE) / Samara Alves Brito. – Recife: o autor, 2018.
133 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências, quadros, figuras, tabelas e gráficos.

1. Spondias. 2. Úlcera péptica. 3. Cicatrização. I. Wanderley, Almir Gonçalves. (orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 157)

SAMARA ALVES BRITO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DAS FOLHAS E FRUTOS
DE *Spondias mombin* L. (ANACARDIACEAE)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para obtenção do título doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 28/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
(Presidente da Banca)

Prof. Dra. Ana Cristina Lima Leite
(Avaliadora Interna)

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim
(Avaliadora Interna)

Prof. Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho
(Avaliador Externo)

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva-Neto
(Avaliador Externo)

Ao meu pequeno Marcos Antônio,
alegria da minha vida, minha
inspiração, meu coração fora de
mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria, tranquilidade, paz e por ter colocado pessoas maravilhosas ao longo dessa caminhada!

Aos meus pais: Cândida de Brito e Orlando de Brito pelo grandioso amor, apoio e ombro amigo. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, entendendo minhas ausências e me fazendo bastante feliz.

A minha querida irmã Cynthia Rejane, que tanto amo e admiro! Obrigada por sua sinceridade, lealdade e por estar sempre ao meu lado comemorando minhas conquistas e me ajudando a superar minhas limitações...

Ao meu noivo, amigo e companheiro de vida, Marcos Pontes, obrigada por toda ajuda, amor e paciência!

Ao meu orientador, prof. Dr. Almir Wanderley, pela oportunidade de realizar este trabalho, por sua disponibilidade, incentivo e amizade. Seus ensinamentos, confiança e palavras sábias foram capazes de me motivar a buscar sempre o crescimento acadêmico, pessoal e social. Obrigada por ser esse exemplo de professor, pesquisador e ser humano que tanto admiro e respeito.

A Cynthia Layse por sua amizade, atenção e disposição em escutar e me ajudar sempre independente de dia e hora. Com você aprendi que não importa o tempo... amigos viram irmãos e que somos os principais responsáveis para tornar nossos sonhos realidade... Irmãzona que Deus colocou em minha vida, obrigada por tudo!

A Simone Santos por sua amizade e irmandade! Uma grande amiga que Recife me deu.

A Profa. Dr^a Germana Caldas por sua amizade e atenção para tornar esse trabalho possível!

Aos meus grandes amigos do LFTPPB - UFPE: Jéssica Figueiredo, Amanda Silva, Allysson Rocha, Alisson Rodrigo, Isabela Silva, Anne Catharine, Daillo Augusto, Jamilka Silva, Carolina Santos, Mirella Maciel, Juliano Silva, Anita Brito e Bruno Santos por terem proporcionado momentos produtivos, agradáveis e descontraídos durante esse período de convivência. Com vocês aprendi o quanto é bom ter amigos de verdade e principalmente conviver com eles... vocês são bastante especiais em minha vida!

Agradeço também a Cláudia Costa (veterinária) pela amizade e carinho nos trabalhos prestados.

Aos professores do Programa em Ciência Farmacêutica - UFPE pelos ensinamentos, dedicação e incentivo transmitidos.

A professora Teresinha Silva e seus alunos do BIOFARMATOX pela parceria e amizade! Em especial Cynthia Layse, Temístocles Ítalo e Henrique Bandeira pelos bons momentos de experimentos e pela amizade cultivada!

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, pela catalogação da exsicata e identificação botânica.

A secretária Nerilin Trajano pelos auxílios prestados no decorrer do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ pela concessão das linhagens de bactérias padrão.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e sucesso deste trabalho.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

Spondias mombin L. é usada na etnomedicina para o tratamento de inflamações e doenças gastrointestinais. Esse estudo investigou a atividade antiulcerogênica e o possível mecanismo de ação do extrato etanólico das folhas (EESm) e dos seus principais compostos ácidos gálico (AG) e elágico (AE), do extrato hexânico das folhas (EHSm) e do sumo dos frutos (SFSm) de *S. mombin*. A caracterização fitoquímica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A atividade antiulcerogênica do EESm, AG, AE, GA + EA, EHSm e SFSm foram avaliadas por modelos de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado, etanol absoluto e indometacina. Posteriormente avaliou-se a capacidade antissecretora, a participação do muco e a influência dos grupos sulfidrilas (SH), óxido nítrico (ON) e prostaglandinas (PG) no efeito gastroprotetor. A atividade cicatrizante foi avaliada pelo modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético e por análises histológicas e imuno-histoquímicas (Ki-67 e BrdU). A atividade anti-*H. pylori* foi realizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do EESm (64-1024 µg/mL). Os resultados mostram que na CLAE identificou no EESm, ácido gálico e ácido elágico; no EHSm, rutina, epicatequina entre outros e no SFSm, epicatequina e quercetina. O EESm (50, 100 e 200 mg/kg) reduziu o índice de lesão ulcerativa induzida pelo etanol acidificado em 59,0; 71,2 e 74,4% em relação ao controle. Na úlcera induzida por etanol foi observado que o EESm reduziu a área de lesão ulcerativa (ALU) em 23,8; 90,4 e 90,2%, respectivamente, O AG (10 mg/kg), o AE (7 mg/kg) ou AG + AE (10 + 7 mg/kg) reduziram as ALUs em 71,8; 70,9 e 94,9%, respectivamente, o EHSm (5, 10 e 20 mg/kg) reduziu ALU em 93,9; 90,3 e 92,6% respectivamente e o SFSm (25, 50 e 100%) reduziu a ALU em 42,4; 45,0 e 98,2% respectivamente. Na úlcera induzida por indometacina foi observado somente para o EESm (três doses) reduziu a ALU em 36,8; 49,4 e 49,9%, respectivamente e para-o SFSm (100%) redução da ALU em 58,9%. Quanto ao mecanismo de ação gastroprotetor verificou-se que o EESm aumentou o pH, diminuiu a secreção de ácido e a concentração de H⁺ no conteúdo gástrico, aumentou os níveis de muco e, mostrou-se dependente dos grupos -SH e NO sobre a proteção do mucosa gástrica. O EHSm reduziu a secreção de H⁺ no conteúdo gástrico e, mostrou-se dependente dos grupos -SH e NO sobre a proteção do mucosa gástrica. O SFSm reduziu o conteúdo gástrico e a acidez total. No modelo de úlcera crônica, os extratos reduziram a área da lesão gástrica com regeneração do epitélio da mucosa. EESm mostrou atividade anti-*H. pylori*. Em conclusão, os extratos são antiulcerogênicos com mecanismo de

ação antissecretor. O EESm e EHSm dependem do grupos -SH e NO na gastroproteção. O EESm estimula a produção de muco e tem ação anti *H. pylori*. Os extratos das folhas e o sumo dos frutos são cicatrizantes gástricos e a ação antiulcerogênica do EESm estar relacionada a presença e ao sinergismo dos ácidos gálico e elágico.

Palavras-chave: *Spondias*. Úlcera peptica. Cicatrização.

ABSTRACT

Spondias mombin L. is used in ethnomedicine for the treatment of inflammation, and gastrointestinal diseases. Our study investigated the antiulcer activity and potential mechanism of action of *Spondias mombin* ethanolic extract (SmEE) and its majorities compounds gallic acid (GA) and ellagic acid (EA), hexanic extract (SmEH) and fruit juic (SmFJ). Phytochemical characterization was performed by HPLC. The antiulcer activity of SmEE, GA, EA, GA + EA, SmEH, FJSm were evaluated by using gastric lesion models induced by acidified ethanol, absolute ethanol, and indomethacin. Following this, was evaluated its capacity to stimulate mucus production, anti-secretory capacity and the influence of sulphhydryl groups (SH), nitric oxid (NO) and prostaglandins (PG) in gastroprotective effect. Its healing activity was demonstrated by using an acetic acid-induced chronic ulcer model and by histological and immunohistochemical analyses (Ki-67 and BrdU). Anti-*Helicobacter pylori* activity was assessed by determining the MIC of the SmEE (64-1024 µg/mL). The results show that in the HPLC identified in the SmEE, gallic acid and ellagic acid; in SmEH, rutin and epicatechin and in FJSm, epicatechi and quercetin. SmEE (50, 100 e 200 mg/kg) reduced the index of ulcerative injury induced by acidified ethanol to 59.0, 71.2 and 74.4% in relation to the control. In ethanol-induced ulcer, it was observed that SmEE reduced the ulcerative lesions area (ULA) in 23.8, 90.4 and 90.2%, respectively. GA (10 mg/kg), EA (7 mg/kg) or GA + EA (10 + 7 mg/kg) reduced ULA s by 71.8, 70.9 and 94.9%, respectively, SmEH (5, 10 and 20 mg/kg) reduced ULA by 93.9, 90.3 and 92.6% respectively and the SmFJ (25, 50 and 100%) reduced ULA in 42.4, 45.0 and 98.2% respectively when compared to the control group. In the indomethacin-induced ulcer, it was observed only for the SmEE (three doses) reduced the ULA in 36.8, 49.4 and 49.9%, respectively. The SmFJ (100%) reduced the ULA by 58.9%. About the mechanism of gastroprotective action, it was verified that SmEE decreased acid secretion and H^+ concentration in gastric contents increased the levels of mucus and, it was dependent on the -SH and NO groups on the protection of the gastric mucosa. SmEH reduced H^+ secretion in gastric contents and was dependent on the -SH and NO groups on the protection of the gastric mucosa. SmFJ reduced gastric contents and total acidity by 71.9 and 57.3%, respectively. In the chronic ulcer model, the extracts reduced the area of the gastric lesion with regeneration of the mucosal epithelium. SmEE showed anti-*H. pylori* activity (CIM = 256 µg/mL). In conclusion, the EESm, EHSm and SmFJ are antiulcerogenic with antisecretory mechanism of action. SmEE and SmFJ

depend on the -SH and NO groups on gastroprotection. The SmEE stimulates the production of mucus and has anti-*H. pylori* action. The leaf extracts are gastric healings and the antiulcerogenic action of the SmEE is related to the presence and synergism of the gallic acid and ellagic acid.

Keywords: *Spondias*. Peptic ulcer. Healing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Espécie <i>Spondias mombin</i> .	28
Quadro 1- Partes da planta de <i>Spondias mombin</i> utilizada na medicina tradicional	28
Quadro 2- Atividades biológicas com <i>Spondias mombin</i>	30
Figura 2 –Mecanismos de ações das drogas no tratamento de úlceras pépticas.	34
Fluxograma 1- : Estudos realizados com as folhas e os frutos de <i>S. mombin</i>	41
Figura 3- Cromatograma comparativo entre o EESm e os ácidos gálico e elágico.	61
Figura 4- Análise cromatográfica do EHSm.	62
Figura 5- Análise cromatográfica do SFSm.	64
Figura 6- Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com EESm sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em rato.	74
Figura 7- Histopatologia da mucosa gástrica de ratos – EESm.	76
Figura 8- Efeito do pré-tratamento oral com ácido gálico, ácido elágico e ácido gálico + ácido elágico em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.	77
Figura 9 - Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e associação ácido gálico + ácido elágico (AG+AE) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.	78
Figura 10- Histopatologia da mucosa gástrica de ratos AG, AE e AG+AE.	79
Figura 11- Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com EHSm sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.	80
Figura 12- Efeito do pré-tratamento oral do EHSm em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.	80
Figura 13- Efeito do pré-tratamento oral do SFSm em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.	80
Figura 14- Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com SFSm sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.	80
Figura 15- Efeito do pré-tratamento por via oral do EESm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.	82
Figura 16- Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com EESm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.	83
Figura 17- Efeito do pré-tratamento por via oral do EHSm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.	83

Figura 18 -Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com EHSm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.	84
Figura 19 -Efeito do pré-tratamento por via oral do SFSm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.	84
Figura 20 -Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com SFSm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.	85
Figura 21 -Efeito do EESm na produção de muco gástrico.	89
Figura 22 - Efeito do EHSm na produção de muco gástrico.	89
Figura 23 - Efeito do SFSm na produção de muco gástrico.	90
Figura 24 -Efeito da administração oral do EHSm sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar, antes (não bloqueadas) e após tratamento (bloqueado) com L-NAME (70 mg/kg).	92
Figura 25 - Efeito da administração oral do EHSm sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar, antes (não bloqueadas) e após tratamento (bloqueado) com NEM (10 mg/kg).	92
Figura 26 - Efeito da administração oral do SFSm sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar, antes (não bloqueadas) e após tratamento (bloqueado) com NEM (10 mg/kg).	93
Figura 27 - Efeito da administração oral do SFSm sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar, antes (não bloqueadas) e após tratamento (bloqueado) com indometacina (30 mg/kg).	94
Figura 28 -Efeito cicatrizante gástrico do EESm na mucosa gástrica em ratos.	95
Figura 29 - Fotomicrografias da mucosa gástrica coradas com HE e PAS dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado), a ausência da camada epitelial (área da úlcera interna) e a seta tracejada indica a camada epitelial restante (borda da úlcera). Hematoxilina/eosina (HE) e coloração com ácido periódico-Schiff (PAS), ampliação, 40x.	96
Figura 30 - Análise imuno-histoquímica para Ki-67 e BrdU da mucosa gástrica dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado), ranitidina (60 mg/kg) ou EESm (100 mg/kg) por 14 dias. A seta cheia indica a	

- ausência da camada epitelial (área da úlcera interna) e a seta tracejada indica a camada epitelial restante (borda da úlcera). As microfotografias representam a imunorreatividade para Ki-67 e BrdU nos grupos, ampliação 200x. 98
- Figura 31-** Efeito do EHSm na cicatrização da mucosa gástrica em ratos Wistar. 99
- Figura 32-** Efeito do SFSm na cicatrização da mucosa gástrica em ratos Wistar. 99
- Figura 33-** Fotomicrografias da mucosa gástrica coradas com HE e PAS dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado), a ausência da camada epitelial (área da úlcera interna) e a seta tracejada indica a camada epitelial restante (borda da úlcera). Hematoxilina / eosina (HE) e coloração com ácido periódico-Schiff (PAS), ampliação, 40x. 100
- Figura 34-** Análise imuno-histoquímica para Ki-67 e BrdU da mucosa gástrica dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado), ranitidina (60 mg/kg) ou SFSm (100%) por 14 dias. A seta cheia indica a ausência da camada epitelial (área da úlcera interna) e a seta tracejada indica a camada epitelial restante (borda da úlcera). As microfotografias representam a imunorreatividade para Ki-67 e BrdU nos grupos, ampliação 200x. 101
- Figura 35-** Efeito do EESm na produção de LPS-induzir NO em macrófagos. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização fitoquímica dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Spondias mombin</i>	42
Tabela 2- Classes de metabólitos secundários encontradas no extrato etanólico e hexânico das folhas secas de <i>Spondias mombin</i>	59
Tabela 3- Efeito dos extrato etanólico (EESm) e hexânico (EHSm) das folhas de <i>Spondias mombin</i> sobre os consumos de água, ração e massa corporal em camundongos após 14 dias da administração única	68
Tabela 4- Efeito do extrato etanólico (EESm) e hexânico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EESm) em parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos após 14 dias da administração única	69
Tabela 5- Efeito do pré-tratamento por via oral do EESm sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol em camundongos.	72
Tabela 6- Efeito do pré-tratamento oral com extrato etanólico das folhas de (EESm) sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos – ALU	73
Tabela 7- Efeito do pré-tratamento orais com extrato etanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EESm) sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos – LPO e GSH	74
Tabela 8- Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EESm e ranitidina por via i.d.	86
Tabela 9- Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EHSm e ranitidina por via i.d.	87
Tabela 10- Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro, tratados com SFSm e ranitidina por via i.d.	87
Tabela11- Efeito da administração oral de extrato etanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EESm) sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar pré-tratados com éster metílico de N ω -nitro-Larginina (L-NAME, 70 mg/kg) ou N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg)	90 91
Tabela 12- Percentagem de inibição induzida por EESm no ensaio de eliminação de NO.	103

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

Aaa	absorbância do ácido ascórbico
ABTS	2,2-azobis-(3-wtilbenzotiazolina-6-sulfonato)
Ac	absorbância do controle
As	absorbância na presença do extrato
AINE	anti-inflamatório não esteroide
ALU	área de lesão ulcerativa
ANOVA	análise de variância de uma via
CAT	Catalase
CE ₅₀	concentração efetiva 50%
CL ₅₀	concentração letal 50%
Cl ⁻	íon cloreto
COX	Ciclooxigenase
DNA	ácido desoxirribonucleico
DL ₅₀	dose letal 50%
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	equivalente ácido gálico
EC	células enterocromafins
ECL	células semelhantes às enterocromafins
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EESm	extrato etanólico de <i>Spondias mombin</i>
EHSm	extrato hexânico de <i>Spondias mombin</i>
EPM	erro padrão da média
EQ	equivalente de quercetina
EROs	espécies reativas de oxigênio
FSH	hormônio folículo-estimulante
GSH	Glutathione
ILU	índice de lesão ulcerativo
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
i.p.	Intraperitoneal

IP ₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina-metil-éster
LH	hormônio luteinizante
LB	Liebermann-Burchard
NADH	dinucleotídeo de adenina e nico
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NEM	n-etilmaleimida
NEU	acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, água
NOS	óxido nítrico sintase
NQO1	quinona oxidoreductase
SOD	superóxido dismutase
SFSm	sumo dos frutos de <i>Spondias mombin</i>
TAC	atividade antioxidante total
TGI	trato gastrintestinal
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UP	úlceras pépticas
v.o.	via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

IP_3	1,4,5-trisfosfato de inositol
K^+	íon potássio
KOH	hidróxido de potássio
Mn^{2+}	íon manganês
Mo^{4+}	íon molibdato (IV)
Mo^{5+}	íon molibdato (V)
Na^+	íon sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
2.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	26
2.1.1 Espécie: <i>Spondias mombin</i>	27
2.1.2 Etnofarmacologia de <i>spondias mombin</i>	28
2.1.3 Atividades biológicas confirmadas para <i>Spondias mombin</i>	29
2.2 TRATO GASTRINTESTINAL	31
2.2.1 Úlceras pépticas	31
2.2.2 Câncer gástrico causado pela bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.2.3 Terapêutica	33
2.2.4 Atividade antioxidante de substâncias gastroprotetoras	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 GERAL.....	37
3.2 ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	39
4.2 PREPARAÇÃO E PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E DOS FRUTOS	39
4.2.1 Dosagem de fenóis totais - EESm	43
4.2.2 Dosagem de flavonoides	43
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO	43
4.3.1 Avaliação da atividade antioxidante total-fosfomolibdênio	44
4.3.2 Avaliação da atividade antioxidante por sequestro de radical livre.....	44
4.3.2.1 (2,2-difenil1-picrilhidrazil)- DPPH	44
4.3.2.2 (2,2-azobis- (3-wtilbenzotiazolina-6-sulfonato) - ABTS	44
4.3.2.3 Redução de ferro – FRAP.....	45
4.4 ESTUDOS IN VIVO	45
4.4.1 Animais	45
4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda (OECD, 2001).....	46
4.4.3 Avaliação da atividade antiulcerogênica	46
4.4.3 .1 Modelos de indução aguda	46

4.4.3.1.1 Úlcera gástrica induzida por HCl/Etanol (MIZUI e DOTEUCHI, 1983)	46
4.4.3.1.2 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto (MORIMOTO et al., 1991 com modificações) e análise histopatológica.....	47
4.4.3.1.3 Úlcera gástrica induzida por indometacina (DJAANGURI, 1969 modificado)	49
4.4.3.2 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Spondias mombin</i>	49
4.4.3.2.1 Atividade antissecretora ácida gástrica – por meio do método da ligadura pilórica (SHAY et al. 1945)	49
4.4.3.2.2 Avaliação da participação de muco aderido à parede gástrica (RAFATULLAH et al., 1990) com modificações	50
4.4.3.2.3 Avaliação da participação do óxido nítrico (MATSUDA et al., 1999)	51
4.4.3.2.4 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (MATSUDA et al., 1999)	51
4.4.3.2.5 Avaliação da participação das prostaglandinas na gastroproteção.....	52
4.4.3.3 Avaliação da propriedade cicatrizante gástrica de <i>Spondias mombin</i>	52
4.4.3.3.1 Indução de úlcera gástrica por ácido acético (TAKAGI et al., 1969) com modificações	52
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	54
4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	54
4.5.2 Ensaio de inibição da urease.....	54
4.5.3 Inibição da produção de Óxido Nítrico (ON).....	55
4.5.4 Avaliação da capacidade de eliminação do óxido nítrico.....	55
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO	58
5.1.1 Screening fitoquímico dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Spondias mombin</i>	58
5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das folhas e frutos de <i>Spondias mombin</i>	60
5.1.3 Teor de fenóis totais do EESm	63
5.1.4 Teor de flavonoides do EESm	64
5.2 ANTIOXIDANTE IN VITRO DO EESM	64
5.2. 1 Fosfomolibdênio.....	64
5.2.2 DPPH (2,2-difenil1-picrilhidrazil).....	65
5.2.3 ABTS (2,2-azobis- (3-wtilbenzotiazolina-6-sulfonato)	65

5.2.4 Redução do ferro - FRAP	65
5.3 ESTUDOS IN VIVO	66
5.3.1 Modelos de indução aguda.....	69
5.3.1.1 Atividade antiulcerogénica do EESm em úlcera induzida por etanol acidificado em camundongos	69
5.3.1.1.1 Teor de TNF e ON	69
5.3.1.2 Atividade gastroprotetora em úlcera induzida por etanol em ratos	71
5.3.1.2.1 Avaliação da atividade gastroprotetora do EESm em úlcera induzida por etanol...	71
5.3.1.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido gálico, ácido elágico isolados e em associação em úlcera induzida por etanol	76
5.3.1.2.3 Avaliação da atividade gastroprotetora do EHSm em úlcera induzida por etanol ..	78
5.3.1.2.4 Avaliação da atividade gastroprotetora do SFSm em úlcera induzida por etanol ...	79
5.3.1.3 Atividade gastroprotetora em úlcera induzida por indometacina em ratos.....	81
5.3.1.3.1 Avaliação da atividade gastroprotetora do EESm em úlcera induzida por indometacina	81
5.3.1.3.2 Avaliação da atividade gastroprotetora do EHSm em úlcera induzida por indometacina	82
5.3.1.3.3 Avaliação da atividade gastroprotetora do SFSm em úlcera induzida por indometacina	83
5.3.2 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Spondias mombin</i>	84
5.3.2.1 Efeito dos extratos das folhas e frutos de <i>S. mombin</i> sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em ratos.....	84
5.3.2.1.1 Efeito do EESm sobre a secreção gástrica.....	85
5.3.2.1.2 Efeito do EHSm sobre a secreção gástrica	85
5.3.2.1.3 Efeito do SFSm sobre a secreção gástrica	86
5.3.2.2 Avaliação da participação de muco aderido à parede gástrica	87
5.3.2.2.1 Avaliação da participação de muco aderido no efeito gastroprotetor do EESm.....	87
5.3.2.2.2 Avaliação da participação de muco aderido no efeito gastroprotetor do EHSm	88
5.3.2.2.3 Avaliação da participação de muco aderido no efeito gastroprotetor do SFSm	88
5.3.2.3 Avaliação da participação do óxido nítrico e grupamentos sufridílicos.....	89
5.3.2.3.1 Avaliação da participação do óxido nítrico e grupamentos sufridílicos na capacidade gastroprotetora do EESm.....	89

5.3.2.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico na capacidade gastroprotetora do EHSm	90
5.3.2.3.3 Avaliação da participação do grupamento sulfidrílico na capacidade gastroprotetora do SFSm	92
5.3.2.4 Avaliação da participação das PGs na capacidade gastroprotetora do SFSm	93
5.3.3 Avaliação da capacidade cicatrizante gástrica	94
5.3.3.1 Avaliação da capacidade cicatrizante gástrica do EESm	94
5.3.3.2 Avaliação da capacidade cicatrizante gástrica do EHSm	97
5.3.3.3 Avaliação da capacidade cicatrizante gástrica do SFSm	98
5.4 ATIVIDADE ANTI- HELICOBACTER PYLORI DO EESM	101
6 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A úlcera péptica (UP) é um problema de saúde pública com alta taxa de morbidade (MALFERTHEINER *et al.*, 2009), e tornou-se foco de experimentos e investigações clínicas, principalmente devido à sua alta prevalência na população mundial (CALAM E BARON, 2001).

As Ups geralmente são agravadas por um desequilíbrio entre os fatores destrutivos (endógenos e exógenos) e defensivos no estômago (CALAM E BARON, 2001). Os fatores destrutivos endógenos do estômago são: HCl, pepsina, refluxo biliar, peroxidação lipídica e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os fatores destrutivos exógenos são: uso excessivo de etanol, uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteróides, estresse, tabagismo e infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (ALQASOUMI *et al.*, 2009; PRABHA *et al.*, 2009, GASPARETTO, PESCARIN E GUARISO, 2012; BALAN *et al.*, 2015). Os fatores defensivos são: barreira de muco e bicarbonato, fosfolípidos de superfície, prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO), fluxo sanguíneo mucoso, renovação celular, fatores de crescimento e enzimas antioxidantes (CALAM E BARON, 2001; ALQASOUMI *et al.*, 2009; PRABHA *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo, presente no processo de ulceração gástrica, aumenta a formação de EROs que podem destruir a integridade das células epiteliais. Além disso, o excesso dos metabólitos provenientes das EROs podem reduzir os antioxidantes endógenos (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014). As EROs ainda acumulam neutrófilos nos tecidos da mucosa durante a ulceração gástrica. Estudos demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias induzem a ativação de neutrófilos e são fortes contribuintes para danos ulcerativos (ANTONISAMY *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017).

Terapias eficazes para o tratamento das UPs incluem alternativas que controlam a hipersecreção da acidez e seus efeitos diretos sobre a mucosa gástrica. As classes de medicamentos mais usadas para tratar distúrbios relacionados ao ácido gástrico incluem: inibidores da bomba de prótons (IBP), que inibem diretamente a bomba de hidrogênio na célula parietal, independentemente de qualquer estimulação do receptor de membrana e antagonistas dos receptores de histamina tipo 2 (H₂RAs), que bloqueiam o receptor de histamina em células parietais, reduzindo assim a liberação de íons de hidrogênio

(SAVARINO *et al.*, 2017). IBP estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo, no entanto, pode levar ao desenvolvimento de hiperplasia das células parietais e das glândulas gástricas (THOMSON *et al.*, 2010).

O uso prolongado de H₂RAs pode estar associado ao desenvolvimento de efeitos indesejáveis como, ginecomastia e galactorréia, bem como, alteração da flora bacteriana do trato gastrointestinal (ZAMORA RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

Spondias mombin L. família Anacardiaceae, é nativa do Brasil (CABRAL *et al.*, 2016), encontrada principalmente nas regiões norte e nordeste (TIBURSKI *et al.*, 2011). Esta espécie apresenta uma demanda crescente por conta de seus frutos e produtos processados (polpa, suco, sorvete), despertando assim interesse nos setores do agronegócio e dos produtores para operações comerciais (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

As folhas são usadas na etnomedicina para o tratamento de inflamações sistêmicas e doenças gastrointestinais (NWORU *et al.*, 2011, SAMEH *et al.*, 2018). Certas propriedades farmacológicas, incluindo anti-inflamatórios e atividade antioxidante foram atribuídas a *S. Mombin* (NWORU *et al.*, 2011; CABRAL *et al.*, 2016).

Considerando o uso desta espécie na etnomedicina, como anti-inflamatório e com potencial antioxidante e a importância da busca por novos agentes terapêuticos que podem auxiliar no tratamento da úlcera péptica, nosso estudo investigou a atividade antiulcerogênica e os possíveis mecanismos de ação dos extratos etanólico (e seus compostos majoritários: ácido gálico e ácido elágico) e hexânico das folhas e do sumo dos frutos de *Spondias mombin*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

A família Anacardiaceae é constituída por cerca de 70 gêneros e 600 espécies com distribuição tropical, subtropical e regiões temperadas (VOGL E MITCHELL,—1996; ENGELS *et al.*, 2012). Destes, 14 gêneros, 57 espécies e 10 variedades ocorrem no Brasil. Dentre estas, 14 espécies são endêmicas e a maioria sincronopátricas da Caatinga (JARDIM BOTÂNICO, 2015), bioma exclusivo do Brasil com grande patrimônio biológico para a região Semiárida (VIEIRA *et al.*, 2009).

Do ponto de vista econômico, diversas anacardiáceas são conhecidas por serem frutíferas de alto valor econômico (WANNAN, 2006; BACHELIER E ENDRESS 2009), tais como *Anacardium occidentale* L., (caju), *Mangifera indica* L. (manga) e *Pistacia vera* L., (pistache) e por produzirem boa madeira para construção civil (*Astronium fraxinifolium* Schott, *A. lecointei* Ducke, muiiraquatiara, *A. urundeuva* Engl., *Schinopsis brasiliensis* Engl., baraúnma). Além disto, algumas substâncias isoladas de plantas desta família são utilizadas na indústria farmacêutica no tratamento de doenças (*Pistacia cabulica* Stocks, *P. lentiscus* L., *Schinopsis lorentzii*) (BARROSO, 1978, BARROS 1995).

Estudo descreve que as classes fitoquímicas mais comuns para a família Anacardiaceae são os flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas e, principalmente lipídios e derivados fenólicos (CORREIA *et al.*, 2006). O ácido anacárdico é o composto característico das espécies dessa família, atua como antioxidante na prevenção de doenças crônico-degenerativas (ITOKAWA, 1987). Além disso, aproximadamente 25% dos seus gêneros (restritas às tribos Anacardieae, Rhoeae e Semecarpeae) são considerados tóxicos por serem causadoras de dermatite de contato severa e isso pode estar atribuído à presença de compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias - lipídios fenólicos, comumente encontradas em espécies do gênero *Rhus* (SCHMIDT e EVANS , 1980).

O gênero *Spondias* é constituído por aproximadamente 14 espécies distribuídas mundialmente, e dentre estas, 4 a 7 são encontradas nas Américas. A maioria dos vegetais pertencentes a esse gênero são cultivados e comercializados por conta de seus frutos que são consumidos *in natura* ou processados na forma de polpas, sucos e outros produtos alimentícios (WANNAN, 2006, BACHELIER e ENDRESS, 2009).

No Brasil, estudos realizados com esse gênero se limitam principalmente à descrição das características físico-químicas, maturação, estabilidade e constituintes químicos dos seus frutos, destacando-se as espécies *S. mombin* (cajazeira), *S. tuberosa* (umbu) e *S. mombin* x *S. tuberosa* (cajá-umbu) (BORA, *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2007; JORGE *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2010; ALMEIDA, ALBUQUERQUE e CASTRO, 2011). Além do uso comercial, diferentes partes destas plantas também são citadas na medicina tradicional para o tratamento de desordens infecciosas e como abortivas.

2.1.1 Espécie: *Spondias mombin*

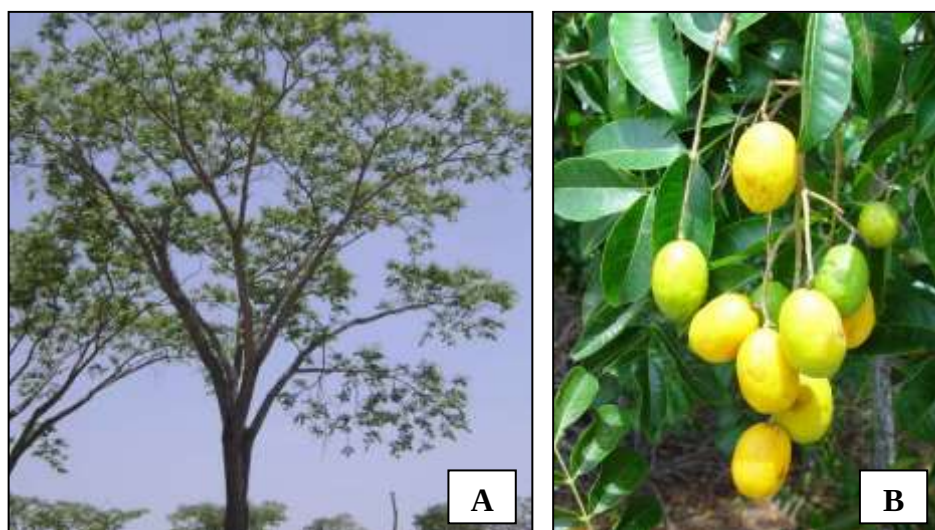
Spondias mombin L. (Figura 1) (Anacardiaceae), apresenta sinonímia com *Spondias brasiliensis* e *Spondias aurantiaca* (PLANTA MED, 2015), sendo conhecida popularmente como cajazeira (HAMANO e MERCADANTE, 2001), está distribuída na América do Sul e Antilhas, encontrando-se dispersa desde o sul do México até o Brasil (PRANCE e SILVA, 1975). Em território brasileiro, essa espécie é encontrada principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde seus frutos são conhecidos por cajá, cajá verdadeiro, cajá-mirim ou taperebá e são utilizados no preparo de polpas, sucos, picolé, sorvetes, néctares e geleias (SACRAMENTO, 2000).

A cajazeira é uma árvore caducifólia, tem altura que varia de 20 a 30 m, diâmetro de tronco de 0,5 a 2,0 m e desprovida de ramos. A casca é rugosa, de cor bege claro que libera uma resina branca, pegajosa e sabor amargo. As folhas apresentam de quatro a doze pares de folíolos oblongos e um terminal, e as inflorescências são do tipo panícula (VIILACHICA, 1996). Os frutos apresentam-se em forma elíptica com 3-4 cm de comprimento, cultivados principalmente na região nordeste do Brasil. Sua utilização comercial está associada à sua acessibilidade, disponibilidade durante todo o ano e o fácil preparo (HAMANO e MERCADANTE, 2001).

A espécie é considerada como de múltiplo uso e tolerante a condições adversas, como o estresse hídrico causado por longos períodos de estiagem e por solos de baixa fertilidade, condições que são encontradas no nordeste brasileiro. (DO BRASIL, 2015).

No Brasil, a espécie tem sido cultivada principalmente para o consumo dos frutos, preferencialmente maduros, como fonte de vitaminas, minerais e proteínas e suas diferentes partes são bastante utilizadas na medicina popular (Sacramento *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2012).

Figura 1- Espécie *Spondias mombin*



A) Imagem da cajazeira; B) Folhas e frutos de *Spondias mombin*

Fonte: Sementes do Brasil

2.1.2 Etnofarmacologia de *Spondias mombin*

Os principais usos etnofarmacológicos de *S. mombin* estão descritas no quadro 1 abaixo.

Quadro 1: Partes da planta de *Spondias mombin* utilizada na medicina tradicional

Parte da planta	Forma de preparo	Utilização popular	Referência
Folhas	Infusão	Desordens neurológicas	AYOKA <i>et al.</i> , 2013;
		Anti-inflamatório	VILLEGAS <i>et al.</i> , 1997
		Infecções pós-natal do útero	TAYLOR, 2004
		Parto de pequenos ruminantes	UCHENDU e CHOUDHARY, 2004
		Infecções bacteriana, prevenção de infecções virais e antifúngico	OLUFUNKE <i>et al.</i> , 2014
Folhas e flores		Constipações do ventre, dores do estômago, complicações pós-parto e certas enfermidades dos olhos e da laringe	PIO CORRÊA, 1926

Casca	Decocção	Contração uterina	TAYLOR, 2004
	<i>In natura</i>	Vômito	PIO CORRÊA, 1926
Cascas e raízes	Decocção	Antidiarreica, antidesintérica, anti-hemorragica e anti-hemorroidária	
Frutos	Suco	Diurético e febrífugo	AYOKA, 2008
Folhas e frutos	Infusão	Intensificador de memória e antienvhecimento	ELUFIOYE et al., 2012

2.1.3 Atividades biológicas confirmadas para *Spondias mombin*

Spondias mombin vem sendo estudada em relação aos seus constituintes fixos. Através de estudos fitoquímicos realizados com as folhas da espécie, Corthout e colaboradores (1992 e 1994) isolaram a partir das folhas dessa espécie substâncias com atividade antiviral comprovada como a geranina e o ácido hidroxycítrico.

O quadro 2 mostra o registro de atividades biológicas comprovadas para as folhas e frutos de *S. mombin*. O quadro disponibiliza a parte da planta utilizada, material de uso, as atividades biológicas e a referência.

Quadro 2: Atividade biológicas com *Spondias mombin*

Parte da planta	Material de uso	Atividade biológica	Referência
Folhas	Extrato butanólico	Induz a contração uterina	UCHENDU AND CHOUDHARY, 2004
	Extrato etanólico	Abortivo	IGWE <i>et al.</i> , 2012; OLOYE <i>et al.</i> , 2013
		Redução da atividade espermatogênica em túbulos seminíferos e nos níveis de LH, FSH e testosterona em ratos	ASUQUO <i>et al.</i> , 2012a; ASUQUO <i>et al.</i> , 2012b
	Extrato metanólico	Antibacteriana	ABO, 1999
		Antiprotzoário	TRAORE <i>et al.</i> , 2014
		Inibidor de colinesterase	ELUFIOYE <i>et al.</i> , 2017)
	Extrato aquoso	Antibacteriana e cicatrizante	NJOKU; AKUMEFALA, 2007, COUTHOUT <i>et al.</i> , 1994
		Moluscicida	COUTHOUT <i>et al.</i> , 1994
		Hepatoprotetor	SAHEED <i>et al.</i> , 2017
	Diferentes frações	Atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	ACCIOLY, 2009
	Extrato hidrometanólico	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> e antibacteriano	SILVA <i>et al.</i> , 2012 AKINMOLADUN <i>et al.</i> , 2010
	Extrato etanólico e aquoso	Anti-helmíntico	ADEMOLA <i>et al.</i> , 2005
	Frações e isolados	Antiepilético e antipsicótico / Potencialização da transmissão adrenérgica e dopaminérgica e inibição dos receptores opioides	AYOKA <i>et al.</i> , 2008,2013
	Extrato aquoso e alcoólico	Ansiolítico, sedativo, antiepiléptico e antipsicótico	ASUQUO <i>et al.</i> , 2013
	Extrato aquoso	Contração uterina de cobaias, anti-inflamatório, hipnótico, sedativo	AKUBUE <i>et al.</i> , 1983; OFFIAH e ANYANWU, 1989
		Gastroprotetor em úlcera	SABIU <i>et al.</i> ,

		induzida por indometacina	2015
	Extrato hidroalcolico	Anticoncepcional	CHUKWUKA e ISEK, 2008
Frutos	<i>In natura</i>	Fonte de vitamina C	KESHINRO, 1985
	Extrato metanólico	Antioxidante	SILVA <i>et al.</i> , 2012
	Extrato aquoso	Anti-inflamatório	VILLEGAS <i>et al.</i> , 1997

A partir deste levantamento foi possível verificar o potencial biológico de *S. mombin* no tratamento e cura de diversas enfermidades. No que diz respeito à avaliação da atividade gastroprotetora desta espécie, a literatura dispõe somente de um estudo em modelo agudo induzido por indometacina. A investigação dessa atividade por outros modelos e a sua determinação de segurança de uso é de suma importância, tendo em vista que a espécie é largamente utilizada na medicina tradicional para este fim.

2.2 TRATO GASTRINTESTINAL

2.2.1 Úlceras pépticas

A úlcera péptica é uma doença milenar que acompanha o homem desde a pré-história (traduzidas nas expressões “estômago que arde”, “fogo do estômago”). Somente no século XVI, esta doença foi reconhecida como entidade mórbida e passou a despertar maior interesse a partir de observações anatomopatológicas em necropsias e especulações teóricas sobre a sua etiopatogenia (AQUIOLA *et al.*, 1987).

A UP é uma área de escoriação da mucosa gástrica causada pela ação digestiva do suco ácido-péptico gástrico. A parte inicial do duodeno é o local mais comum da sua ocorrência (úlceras duodenais), sendo também perceptível ao longo da pequena curvatura do estômago (úlceras gástricas) (MATON, 1999).

O desequilíbrio entre a velocidade de secreção do ácido/pepsina e o grau de proteção oferecido pela barreira da mucosa gastroduodenal de se proteger contra as propriedades digestivas do complexo ácido-pepsina são as principais causas que se atribuíam ao surgimento desta doença, ocasionando irritação, ulceração e sangramento da mucosa. Somente a minoria dos pacientes com úlcera diagnosticada apresentam a hiperacidez (mas quando presente é um fator fortemente lesivo) (SAIRAM *et al.*, 2002).

Dentre outros fatores relevantes para o surgimento da UP, destacam-se a infecção por *Helicobacter pylori* (responsável por 99,9% dos casos de úlceras duodenais e 70% das úlceras gástricas), redução do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, retardo do esvaziamento gástrico, (BANSAL *et al.*, 2009), uso crônico de anti-inflamatório do tipo não-esteróide (AINE), uso de outros fármacos como bisfosfonatos, anticoagulantes e quimioterápicos, a idade, a hereditariedade, o estresse, o uso abusivo de álcool, o fumo, os maus hábitos alimentares (STEWART; ACKROYD, 2008). Apesar de *H. pylori* ser foco de muitas pesquisas que buscam novas fontes de substâncias gastroprotetoras, Chey e colaboradores (2007) afirmam que muitos indivíduos possuem esse microrganismo no estômago, mas não desenvolvem úlcera ou gastrite.

Halla e colaboradores (2006) relatam que a UP e suas complicações como hemorragia, perfuração e ou obstrução ocorrem em todas as idades. Porém, é crescente e mais comum a incidência em pessoas com mais de 50 anos. A este fato, os autores atribuem à infecção por *H. pylori* e a ingestão de álcool, fumo e ao uso contínuo de AINE. Estes últimos fatores também aumentam o risco para ulceração péptica provocada por *H. pylori* (CHEY *et al.*, 2007).

2.2.2 Câncer gástrico causado pela bactéria *Helicobacter pylori*

O câncer gástrico (CG) é o quinto mais comum câncer no mundo e o terceiro com maior taxa de mortalidade, com ocorrência para ambos os sexos. Em 2012, cerca de 1.000.000 novos casos foram diagnosticados, e 723.000 mortes foram atribuídas ao CG. (FERLAY *et al.*, 2015).

A bactéria *Helicobacter pylori* desempenha um papel predominante na etiologia da doença e foi caracterizado como um agente carcinogênico de classe I pelo mundo. De acordo com a Organização da Saúde em 1994, *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa microaerofílica que coloniza a mucosa gástrica de 50% da população mundial, porém apenas de 0,5 a 2% das pessoas infectadas desenvolvem câncer gástrico (OLUWASOLA, 2014).

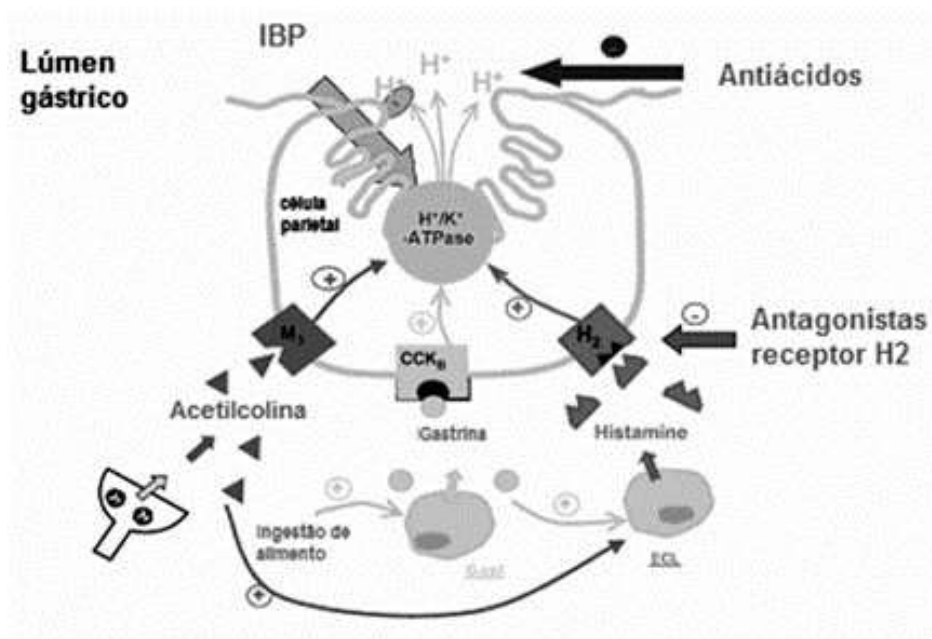
Fatores genéticos e epigenéticos têm sido atribuídos ao risco de desenvolvimento dessa doença. Dentre eles estão fatores de virulência de *H. pylori*, polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em genes-chave do hospedeiro e eventos epigenéticos (FU *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2015).

A bactéria produz enzimas que ajudam na degradação da camada de muco para aderir a superfície epitelial. Dessa forma inicia-se o processo inflamatório local, que somando as lesões celulares culmina no desenvolvimento de gastrite, úlcera gástrica podendo evoluir para o câncer gástrico (WEEKS et al., 2000).

2.2.3 Terapêutica

O manejo farmacológico para o tratamento de UP envolve o uso de diferentes classes de fármacos. Os antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas do receptor H_2 para a histamina e inibidores da bomba de prótons são os mais prescritos (JAIN et al., 2007) (Figura 2).

Figura 2—Mecanismos de ações dos fármacos no tratamento de úlceras pépticas



Fonte: DAL-PAZ, K. et al., 2008

Os antiácidos são o modo mais simples de tratar os sintomas da secreção excessiva de ácido gástrico. Eles neutralizam diretamente o ácido, que também tem o efeito de inibir a atividade das enzimas (MATON, 1999). Os mais comuns são o hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, carbonato de sódio e carbonato de cálcio. Entretanto, os efeitos colaterais causados incluem alcalose, náuseas, distensão abdominal, flatulência, diarreia e constipação (JAIN et al., 2007).

Os anticolinérgicos (pirenzepina e telenzepina) bloqueiam os receptores muscarínicos dos gânglios intramurais da parede do estômago, reduzindo a dor e a motilidade duodenal. Porém, os efeitos secundários são variados e incluem boca seca, visão turva e constipação (JAIN *et al.*, 2007).

A descoberta e o desenvolvimento de fármacos bloqueadores do receptor H_2 foram um avanço marcante no tratamento de UP - uma condição que era tratada com intervenção cirúrgica (PARSONS, 2006 e SMIT, 1996). Antagonistas seletivos do receptor H_2 inibem completamente a interação de histamina com os receptores, reduzindo a concentração de íons H^+ . Os fármacos cimetidina, ranitidina e famotidina inibem a secreção de ácido basal noturna e induzida pela gastrina e pelos agonistas muscarínicos. São fármacos seguros, entretanto seus efeitos colaterais incluem tonturas, náuseas, erupções cutâneas, sonolência, confusão, impotência, ginecomastia, efeitos hematológicos e alterações imunológicas (JAIN *et al.*, 2007).

Os inibidores da bomba de prótons reduzem a secreção ácida basal estimulada por alimentos e são caracterizados por serem bases fracas em meio ácido dos canalículos da célula parietal estimulada e só assim eles são ativados. Os representantes desta classe incluem: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, esomeprazol, rabeprazol. Os efeitos adversos incluem dores de cabeça, diarreia, náusea, constipação, prurido, hipergastrinemia, hipersecreção ácida rebote, má absorção, infecção e câncer (O'NEIL e LEONARD, 2011).

A infecção pelo *H. pylori* vem sendo considerada como fator causal para o surgimento de úlceras e/ou desenvolvimento de câncer duodenais. A terapia antimicrobiana dupla ou tripla combinada com drogas antissecretórias (omeprazol ou antagonista do receptor H_2 , a exemplo da ranitidina) são utilizadas com sucesso no tratamento de úlceras pépticas. Os compostos de bismuto podem ser incluídos no esquema provavelmente devido à sua ação citoprotetora. A terapia tripla com metronidazol, e um composto de bismuto ou tetraciclina ou amoxicilina, durante duas semanas é recomendado no tratamento de infecções por *H. pylori* que garante uma remissão de úlcera por longo prazo. No entanto, as limitações terapêuticas incluem náuseas, diarreia e tonturas (BRUNTON, 2001).

2.2.4 Atividade antioxidante de substâncias gastroprotetoras

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são átomos ou moléculas altamente reativas que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Nos seres vivos, EROs são originadas principalmente durante a produção de ATP (SEIFRIZ, 2008).

A geração desses oxidantes e suas possíveis modificações oxidativas de biomoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) são inevitáveis. Esses efeitos nocivos são denominados estresse oxidativo (ALLIWELL, 2006) e são considerados um pré-requisito para que ocorra apoptose celular (KAGAN *et al.*, 2002).

Como mecanismo de defesa contra os compostos oxidantes, as células utilizam os antioxidantes enzimáticos, que atuam em duas linhas: I) como detoxificadora do agente, antes que ele cause lesão, sendo constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; II) tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E (tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS e MOLDEUS, 1991).

Ao correlacionar a atividade antioxidante com o efeito gastroprotetor, estudos mostram que as defesas antioxidantes exercem um papel complementar na proteção da mucosa gástrica ao impedir o estresse oxidativo provocado pelo aumento nos níveis intracelulares de EROs, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MATÉS, 2000). As defesas incluem os antioxidantes enzimáticos e outras enzimas, como a NAD (P) H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e a glutathiona S-transferase (GST). Em condições fisiológicas normais, esses mecanismos de defesa protegem as células mantendo baixos os níveis de radicais livres (MICHIELS *et al.*, 1994).

Outras moléculas que auxiliam o processo enzimático são os antioxidantes naturais que atuam como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais. O aumento no uso da avaliação de produtos naturais antioxidantes começou a expandir a partir da década de 90 quando começou a ser constatada a influência benéfica de muitos vegetais na saúde humana. Além disso, apresentam baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos (GOLVEIA, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Conhecer a composição fitoquímica e investigar a atividade antioxidante e antiulcerogênica dos extratos etanólico e hexânico obtidos das folhas e dos frutos de *Spondias mombin* (Anacardiaceae).

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *S. mombin* por diferentes métodos (redução do complexo fosfomolibdênio, ABTS, FRAP e DPPH);
- Estimar a toxicidade aguda dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *S. mombin*;
- Determinar a atividade antiulcerogênica, *in vivo*, dos extratos etanólico (e seus marjoritarios) e hexânico das folhas e do sumo dos frutos de *S. mombin*, por meio de modelos agudos de úlcera;
- Investigar o possível mecanismo de ação envolvidos na gastroproteção *in vivo*, dos extratos etanólico e hexânico das folhas e do sumo dos frutos de *S. mombin*;
- Analisar a atividade cicatrizante, *in vivo*, dos extratos etanólico e hexânico das folhas e do sumo dos frutos de *S. mombin*, por meio de um modelo crônico de lesão induzida por ácido acético;
- Determinar atividade anti *Helicobacter pilory* do extrato etanólico das folhas de *S. mombin*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos utilizados neste estudo foram realizados conforme o fluxograma experimental 1.

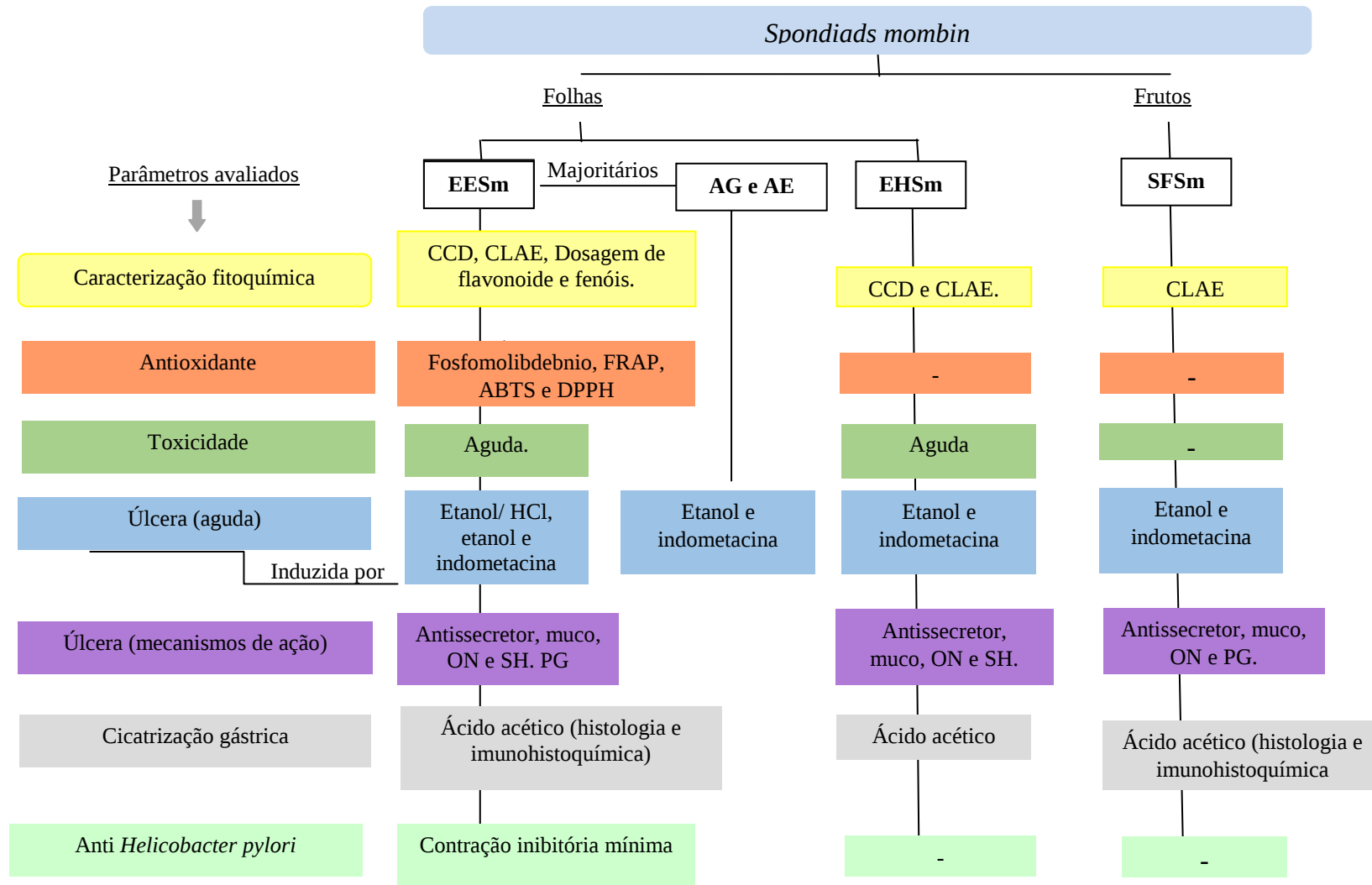
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A coleta das folhas de *S. mombin* foi realizada em julho de 2014, no município de Cajazeirinhas – PB (S 6°58.34.558” – W 37°48.21.424”). Os frutos foram coletados em dezembro de 2015, no município de Crato – CE (S 7°13.00.6” – W 39°22.15.1”). Em seguida, uma amostra representativa de ambas as coletas da espécie contendo flor e fruto foram depositadas e identificadas no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco, com registros #89987 e #91073, respectivamente, para as coletas de folhas e frutos.

4.2 PREPARAÇÃO E PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E DOS FRUTOS

Os extratos etanólico (EESm) e hexânico (EHSm) foram preparados a partir de 2000 g de folhas secas de *S. mombin*. O material previamente triturado foi macerado com hexano, acetato de etila e etanol, sob agitação durante 3 horas por três vezes consecutivas. Os extratos foram filtrados e os solventes foram completamente removidos com a ajuda de um evaporador rotativo de baixa pressão. Em seguida, realizou-se um rastreio fitoquímico para os dois extratos. Na avaliação dos resultados, foi possível observar que, dentre os três extratos, o extrato etanólico apresentou a melhor composição fitoquímica de interesse para a atividade antiulcerogênica (compostos fenólicos) e o extrato hexânico apresentou uma melhor atividade experimental em um screen realizado previamente.

A presença dos grupos de metabólitos secundários nos extratos foi avaliada por cromatografia em camada delgada, utilizando reveladores químicos específicos (ensaios cromáticos) – Tabela1(WAGNER e BLADT, 1996).

Fluxograma 1: Estudos realizados com as folhas e os frutos de *S. mombin*

Nota: EESm: extrato etanólico de *Spondias mombin*, AG: ácido gálico, AE: ácido elágico, EHSm: extrato hexânico de *Spondias mombin*, SFSm: sumo dos frutos de *Spondias mombin*, CCD: cromatografia em camada delgada, CLAE: cromatografia líquida em alta eficiência, FRAP: redução do ferro, ABTS: 2,2-azobis-(3-wtilbenzotiazolina-6-sulfonato e DPPH: 2,2-difenil1-picrilhidrazil, ON: óxido nítrico, SH: grupamento sulfidríla, PG: prostaglandina e -: parâmetro não avaliado.

Tabela 1- Caracterização fitoquímica dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Spondias mombin*.

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Revelador	Referência
flavonoides, derivados cinâmicos e zenilpropanoglicosídeos	quercetina, rutina e ácido clorogênico	NEU	WAGNER; BLADT, 1996; BRASSEUR; ANGENOT, 1986
triterpenos e esteroides mono e sesquiterpenos	β -sitosterol Timol	LB anisalaldeído sulfúrico	HARBORNE, 1998 HARBORNE, 1998
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	KOH	WAGNER; BLADT, 1996
Alcaloides	Pilocarpina	Dragendorff	WAGNER; BLADT, 1996
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	Catequina	Vanilina clorídrica	ROBERTS <i>et al.</i> , 1957

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

O sumo dos frutos de *S. mombin* (SFSm, 5000 g) foi desidratado com auxílio de um liofilizador.

Além da identificação das classes de metabolitos secundários dos extratos das folhas da espécie em estudo, foi também realizado uma caracterização fitoquímica dos extratos das folhas e frutos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito a seguir.

➤ Análise cromatográfica por CLAE do EESm-

A análise cromatográfica foi realizada por duas metodologias diferentes com solventes ultrapuros. A primeira metodologia foi a seguinte: Na fase móvel foi utilizada água Mili-Q (Millipore). O EESm foi analisado por cromatógrafo líquido (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipada com bombas LC-10ADvp, controlador SCL-10Avp, degaseificador DGU-20A3, detector SPD-M20A, injetor automático SIL-20A HT. Coluna C18 (Shimadzu, Kyoto, Japão) (150 × 4,6 mm; 5 μ m), o sistema solvente utilizado continha A: água Milli-Q e B: MeOH, com fluxo de gradiente de eluição de 1 mL/min e volume de injeção de 20 μ L, 5% - 100% B 0-15 min, 100% B 15-20 min e 5% B 25 min. Antes de injetar no cromatógrafo, o material foi filtrado em filtro de seringa Millipore Millex-HV com 0,45 μ m de fluoreto de

polivinilideno (PVDF). As substâncias padrão foram fornecidas pela Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha): ácido elágico, ácido tânico, ácido gálico e catequina. Padrões e extratos foram preparados a uma concentração de 1 mg/mL. A amostra foi comparada ao tempo de retenção, ao espectro UV e à coeluição $\lambda = 260$ nm.

Foi realizada também a análise por CLAE pela seguinte metodologia: Na fase móvel foi utilizado solvente A (ácido trifluoracético 0,01% diluído em água ultrapurificada) e no solvente B (100% de acetonitrila) com fluxo de 0,8 mL/min. Os marcadores fitoquímicos para EHSm e o SFSm foram analisados pelo sistema UFLC de cromatografia líquida LC-20 (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de bomba quaternária LC-20ADVP, desgaseificador DGU-20A, detector SPD-20AVP PDA, forno CTO-20ASVP, SIL-20ADVP transmissor automático e controlador SCL - 20AVP acoplado a um detector de matriz de diodos (DAD) (Shimadzu, Tóquio, Japão). As substâncias padrão foram fornecidas pela Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha): Ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido tânicoapigenina, crisina, fisetina, hesperidina, miricetina, narigenina, resveratrol, rutina, scopoletina, vintexina, harmana, quercetina. Uma coluna de octadecilsilano (250 × 4,6 mm; 5 μ m; Ascentis C18; Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Reino Unido) foi utilizada a 30 ° C. As condições de gradiente foram as seguintes: 90 a 60% A – 10a40% B (0-40 min), 60% A - 40% B (40 - 50 min) e 60 - 90% A – 40-10% B (60 - 0 min). Foram injectados 40 μ L de EESm (1 mg/mL) e produtos químicos de referência (200 μ g/mL) e os cromatogramas foram registados a $\lambda = 340$.

➤ Análise cromatográfica por CLAE EHSm e SFSm

A análise cromatográfica foi realizada com solventes ultrapuros. Na fase móvel foi utilizado solvente A (0,1% de solução de ácido fosfórico em água ultrapura) e no solvente B (100% de acetonitrila) com caudal de 0,6 mL/min. Os marcadores fitoquímicos para EHSm e o SFSm foram analisados pelo sistema UFLC de cromatografia líquida LC-20 (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de bomba quaternária LC-20ADVP, desgaseificador DGU-20A, detector SPD-20AVP PDA, forno CTO-20ASVP, SIL-20ADVP transmissor automático e controlador SCL - 20AVP acoplado a um detector de matriz de diodos (DAD) (Shimadzu, Tóquio, Japão). As substâncias padrão foram fornecidas pela Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha): apigenina, borneol, ácido cafeico, catequina, ácido clorogênico, crisina, ácido ellagico, epicatequina, epigallocatequina, fisetina, ácido

gálico, galocatequina, kaempferol, lupeol, miricetina, naringenina, ácido p-coumarico, ácido protocatequico, quercetina, quercetina 3 β , resveratrol, rutina, scopoletin e ácido tânico. Uma coluna de octadecilsilano (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μ m; Ascentis C18; Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Reino Unido) foi utilizada a 40 ° C. As condições de gradiente foram as seguintes: 95% A - 5% B (0 min), 5% A - 95% B (60 min), 95% A - 5% B (70 min) e 95% A - 5% B (75 min). Foram injectados 40 μ L de amostra para amostra (1 mg/mL) e produtos químicos de referência (200 μ g/mL) e os cromatogramas foram registados a λ = 200-400 nm.

4.2.1 Dosagem de fenóis totais - EESm

A dosagem de fenóis totais do extrato etanólico foi determinada utilizando o reagente de protocolo de Folin-Ciocalteu (LI *et al.*, 2008) com algumas modificações e em triplicata. EESm [1 mg/mL] foi adicionado em tubos de ensaios contendo 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:1 v/v) e 2,5 mL de carbonato de sódio a 20%. A mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente e permaneceu em repouso por mais 30 minutos. Em seguida, a absorbância foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda λ = 765 nm e o teor foi expresso em grama (g) de ácido gálico por grama (g) de extrato, através da interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (GeneQuant 1300, GE Healthcare).

4.2.2 Dosagem de flavonoides

O teor de flavonoides do EESm [100 mg/mL] foi determinado de acordo com o método descrito por Woisky e Salatino (1998). O experimento foi realizado em triplicata. Uma alíquota da amostra foi solubilizada em uma solução de cloreto de alumínio 2%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, utilizando-se de um comprimento de onda de 420 nm. Para o cálculo do teor de flavonoides foi utilizada uma curva de calibração de equivalente de quercetina em concentrações que variaram de 50 a 500 μ g/mL.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

As atividades antioxidantes (total e por sequestro de radicais livres) do EESm foram determinadas pelos seguintes métodos fotolorimétricos *in vitro*:

4.3.1 Avaliação da atividade antioxidante total-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 (PIETRO *et al.*, 1999). Aliquotas de 0,1 mL do extrato (10 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 95 °C por 90 min. Após resfriamento, à temperatura ambiente, foi determinada a absorbância a 695 nm. A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela fórmula: % TAC = $(\text{As} - \text{Ac}) \times 100 / (\text{Aaa} - \text{Ac})$, onde Ac foi a absorbância do controle (branco sem extrato), (As) a absorbância na presença do extrato e (Aaa) a absorbância do ácido ascórbico.

4.3.2 Avaliação da atividade antioxidante por sequestro de radical livre

4.3.2.1 (2,2-difenil1-picrilhidrazil)- DPPH

Neste ensaio a atividade sequestradora de radical livre do extrato, foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) (BLOIS, 1958). Foram misturados 250 μL da solução de DPPH (1 mM) a 40 μL de diferentes concentrações do EESm (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$). Após 25 minutos foi medido a absorbância com o auxílio de um espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm. O ácido ascórbico foi o composto de referência e o controle foi uma solução de DPPH adicionado a 40 μL de etanol. A eliminação de radicais de DPPH foi calculada pela fórmula:

$$\text{Eliminação [DPPH] (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle})}{\text{Abs controle}}$$

4.3.2.2 (2,2-azobis- (3-wtilbenzotiazolina-6-sulfonato) - ABTS

Para realização deste ensaio, foi utilizado a metodologia descrita por Reet *al.* (1999). Inicialmente, foi formado o radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$, a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45

mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 16 horas. 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. Para realizar as análises, foram adicionados 40 μ L da amostra diluída a 1960 μ L da solução contendo o radical e determinou-se a absorvância em espectrofotômetro a 734 nm, após 20 minutos de reação. Como solução-padrão, será utilizado o antioxidante sintético Trolox nas concentrações de 0; 500; 1000; 1500; 2000 e 2500mM em etanol. Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em mM de Trolox por grama do extrato

4.3.2.3 Redução de ferro – FRAP

O teste antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi realizado conforme metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) 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.

O EESm na concentração de 1 mg/mL foi diluído em metanol nas concentrações de 500, 250, 150, 75 e 50 μ g/mL. Em seguida, foi misturado 30 μ L de cada amostra, 90 μ L de água destilada e 900 μ L 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 absorvância a 595 nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μ M Trolox por grama do extrato.

4.4 ESTUDOS IN VIVO

4.4.1 Animais

Foram utilizados Ratos da linhagem Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com idade de 2-3 meses, pesando entre 200 – 230g e camundongos (*Mus musculus*) albinos machos e fêmeas, da linhagem Swiss, pesando entre 25-35 g. Os ratos foram oriundos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e os camundongos, do Biotério do Departamento de Antibióticos, 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. Todos os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPE com processos nº. 23076.013615/2015-11, 23076.013615 e 23076.019290/2016-52 respectivamente para EESm, EHSm e SFSm.

4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda (OECD, 2001)

A determinação da DL₅₀ do EESm e da EHSm pela via oral foi realizada por meio do método estabelecido pela OECD n. 423, 2001, definido por meio do número de ocorrência de mortes.

Os animais foram submetidos a um jejum 12 horas e divididos em 3 grupos. Os grupos receberam veículo (NaCl 0,9%) como controle negativo, EESm ou EHSm 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).

Durante os 14 dias de observação, foram mensurados diariamente o consumo de água, ração e a massa 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.

4.4.3 Avaliação da atividade antiulcerogênica

4.4.3.1 Modelos de indução aguda

4.4.3.1.1 Úlcera gástrica induzida por HCl/Etanol (MIZUI e DOTEUCHI, 1983)

Cinco grupos de animais (n = 5-7/grupo) foram pré-tratados por via oral, após 16 horas de jejum com EESm (50, 100 e 200 mg/kg), o grupo controle negativo recebeu o veículo (NaCl 0,9%) e controle positivo, lansoprazol (30 mg/kg). Após 50 minutos dos tratamentos, 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 ratos 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 NaCl 0,9% e fixados em placa de vidro para melhor visualização. Em seguida, foi determinado o índice de lesão ulcerativo (ILU) (SZELENYI e THIEMER, 1978).

Em seguida, a porção glandular do estômago foi pesada e homogeneizada em solução tampão, centrifugada a 790g e o sobrenadante foi recolhido para a quantificação dos níveis de citocina pró-inflamatória (fator de necrose tumoral - TNF) e óxido nítrico (ON).

a) DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TNF

Neste experimento, foi realizada a quantificação dos níveis de TNF pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando kit específico para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (*eBioscience*, San Diego, Califórnia, EUA).

b) DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO

Para avaliar a produção de NO, as concentrações de nitrito (metabólito estável do ON) foram medidas 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 à 0,1%, H₃PO₄ à 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).

4.4.3.1.2 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto (MORIMOTO *et al.*, 1991 com modificações) e análise histopatológica

Após jejum de 18 h, os ratos (n = 6 / grupo) foram pré-tratados por via oral (gavage) com EESm (50, 100 ou 200 mg/kg), EHSm (5, 10 ou 20 mg/kg), SFSm (25,50 ou 100%), controle negativo (NaCl 0,9%) e lansoprazol (30 mg/kg). Os grupos ácido gálico (AG, 10 mg/kg), ácido elágico (AE 7 mg/kg) e a associação AG+AE (10 + 7 mg/kg) foram avaliados. Estes correspondem aos compostos majoritários do EESm. Após uma hora, foi administrado etanol P.A. (4 mL/100g de massa corporal, v.o.) e uma hora depois, os animais foram eutanasiados (câmara de CO₂). Os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura e

processados. Em seguida, foram fotografados, as lesões contadas com o auxílio do Programa *ImageJ* (Bethesda, MD, USA) e uma parte foi selecionada para a realização dos cortes histológicos. Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (ALU) (mm²) em relação à área total do corpo gástrico.

Em seguida, parte da porção glandular dos estômagos pré-tratados com EESm foram pesadas e homogeneizada separadamente em solução tampão, centrifugada a 790g e o sobrenadante foi recolhido para a quantificação dos níveis glutaciona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica e a outra parte foram utilizadas para estudo histopatológico. Os estômagos dos grupos AG, AE e AG+AE também foram analisados por histologia.

a) DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA

Para a quantificação da concentração da glutaciona reduzida (GSH), 50 µL do sobrenadante do tecido do estômago e 40 µL de ATC (ácido tricloroacético) 12% foram misturados a amostra, seguida por agitação e centrifugação por 15 minutos a 790 g. Do sobrenadante, 10 µL foi distribuído em microplaca seguido da adição de 290 µL de tampão TRIS 0,4M (pH 8,9). A reação foi iniciada com a adição de 5 µL de DTNB (5,5-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) 0,01 M, e 5 min após foi iniciada a leitura espectrofotométrica com comprimento de onda de 415 nm. O resultado foi expresso em µg de GSH/mg de proteína (SEDLAK E LINDSAY, 1968).

b) DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPIDICA

A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). O tecido foi homogeneizado em solução de KCl (0,15 mol/L) para análise. A absorvância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de proteína.

c) ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Para realização da análise histopatológica, amostras da mucosa gástrica 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, Wetzlar, Germany). Os cortes de 4 µm foram obtidos em micrótomo (Leica, Wetzlar, Germany) modelo RM 2245 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 (H.E). As lâminas em duplicatas/animal foram analisadas em microscópio de luz, da marca Leica (Wetzlar, Germany) modelo DM500 e fotografadas mediante o uso de câmera Leica modelo EC3 acoplada ao microscópio, bem como do software LeicaApplicationSuite (LAS) EZ para análise histopatológica (BENEDITTI et al., 2004; LEMOS et al., 2011, 2014; ALMEIDA et al., 2014).

4.4.3.1.3 Úlcera gástrica induzida por indometacina (DJAHANGURI, 1969 modificado)

Após jejum de 18 h, os ratos (n = 6/grupo) foram pré-tratados por via oral (gavagem) com EESm (50, 100 ou 200 mg/kg), EHSm (5, 10 ou 20 mg/kg), SFSm (25,50 ou 100%) controle negativo (NaCl 0,9%) e ranitidina (60 mg/kg, v.o). Após uma hora dos pré-tratamentos, foi administrada indometacina (30 mg/kg, s.c.). Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os estômagos retirados e lavados. Em seguida, os estômagos foram abertos pela grande curvatura, o conteúdo gástrico desprezado, a mucosa lavada cuidadosamente com solução NaCl 0,9 % e prensados em placa de vidro para melhor visualização das lesões. Os estômagos foram fotografados e as lesões contadas com o auxílio do Programa *ImageJ* (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (mm²) em relação à área total do corpo gástrico.

4.3.2.2 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de Spondias mombin

4.4.3.2.1 Atividade antissecretora ácida gástrica – por meio do método da ligadura pilórica (SHAY et al. 1945)

Este método permite a avaliação do conteúdo gástrico acumulado durante 4 horas, em termos de volume secretado, pH e acidez total. Os animais foram colocados em jejum durante 16 horas, com acesso livre a solução de glicose 5%. Foram pesados, marcados e separados em 6 grupos de animais ($n = 5-6/\text{grupo}$). Em seguida foram anestesiados com (cetamina, 60 mg/kg e xilazina, 6 mg/kg, i.p.) e fixados em decúbito dorsal a uma placa de cortiça, e realizada a tricotomia da parede abdominal. Por intermédio de uma incisão de 2 cm na região epigástrica o estômago foi localizado e o piloro ligado com fio de sutura. Imediatamente após a ligadura do piloro, os grupos foram tratados por via intraduodenal com o EESm (100 mg/kg), EHSm (5 mg/kg), SFSm (100%), solução NaCl a 0,9% (controle) e ranitidina (60 mg/kg). Após 4 h da cirurgia, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, o esôfago foi pinçado para evitar a perda do material secretado e o estômago removido. O conteúdo gástrico foi coletado, centrifugado a 3000 x *g* e foram determinados o volume (mL) e o pH. No suco gástrico, a acidez total (mEq[H⁺]/L/4h) foi determinada no sobrenadante por titulação em pH 7,0 usando uma solução de NaOH a 0,1N (padronizado com biftalato de potássio) e fenolftaleína como indicador.

4.4.3.2.2. Avaliação da participação de muco aderido à parede gástrica (RAFATULLAH et al., 1990) com modificações

Os animais ($n=7-8$) foram submetidos ao jejum de 18 horas com acesso livre a solução de glicose 5%, distribuídos em grupos e posteriormente tratados (v.o.) com EESm (100 mg/kg), EHSm (5 mg/kg), SFSm (100%), NaCl 0,9% - 10 mL/kg (controle negativo) e carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo). Após 1 hora de cada administração, os animais foram anestesiados (via i.p.) com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) (anestésico) e cloridrato de xilazina (6 mg/kg) (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 em câmara de CO₂, 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 intermitentemente por um minuto, a cada 30 min, 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 1.134g e o sobrenadante, descartado. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (modelo Epoch, marca BioTek, Winooski, Vermont, USA) a 595 nm. A determinação da concentração de *Alcian blue* foi feita por interpolação em uma curva padrão com várias concentrações de *Alcian blue*. Os resultados foram expressos em µg de *Alcian blue*/g de tecido.

4.4.3.2.3. Avaliação da participação do óxido nítrico (MATSUDA et al., 1999)

Após jejum de 18 horas, ratos Wistar machos (n=5-6) foram divididos em 10 grupos conforme o pré-tratamento: 5 grupos receberam veículo e 5 grupos receberam N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) 70 mg/kg (i.p.), um agente bloqueador da enzima sintase de óxido nítrico. Após 30 minutos da administração, cada grupo foi tratado por via oral com EESm (100 mg/kg), EHSm (5 mg/kg), SFSm (100%), veículo NaCl 0,9% (controle negativo) ou carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo). 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 através de planimetria computadorizada, como auxílio do Programa *ImageJ* (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em ALU (mm²) em relação à área total da mucosa gástrica.

4.4.3.2.4. Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (MATSUDA et al., 1999)

Ratos Wistar machos (n=5-7) foram colocados em jejum por 18 horas e distribuídos em oito grupos. Conforme o pré-tratamento via intraperitoneal, 5 grupos receberam veículo (NaCl 0,9%) e os outros 5 grupos receberam N-etilmaleimida (NEM) 10 mg/kg, um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos. Após 30 minutos da administração, cada grupo foi tratado por via oral com EESm (100 mg/kg), EHSm (5 mg/kg), SFSm (100%), veículo NaCl 0,9% (controle negativo) ou carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo). 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 através de planimetria computadorizada, como auxílio do Programa ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em ALU (mm^2) em relação à área total da mucosa gástrica.

4.4.3.2.5. Avaliação da participação das prostaglandinas na gastroproteção

Ratos Wistar machos ($n=5-7$) foram colocados em jejum por 18 horas e distribuídos em oito grupos. Conforme o pré-tratamento via intraperitoneal, 5 grupos receberam veículo (NaCl 0,9%) e os outros 5 grupos receberam indometacina 30 mg/kg, um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos. Após 30 minutos da administração, cada grupo foi tratado por via oral com EESm (100 mg/kg), EHSm (5 mg/kg), SFsm (100%), veículo NaCl 0,9% (controle negativo) ou misoprostol 50 $\mu\text{g/kg}$ (controle positivo). 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 através de planimetria computadorizada, como auxílio do Programa ImageJ (Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em ALU (mm^2) em relação à área total da mucosa gástrica.

4.4.3.3 Avaliação da propriedade cicatrizante gástrica de Spondias mombin

4.4.3.3.1 Indução de úlcera gástrica por ácido acético (TAKAGI et al., 1969) com modificações

Ratos Wistar, submetidos ao jejum de 12 h, foram distribuídos aleatoriamente em grupo EESm (100 mg/kg), EHSm (5 mg/kg), SFsm (100%), sham (falso operado), controle positivo (ranitidina 60 mg/kg), controle negativo (NaCl 0,9 %). Em seguida, os animais foram anestesiados com cetamina (60 mg/kg) e xilazina (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 EESm (100 mg/kg),

EHSm (5 mg/kg), SFSm (100%), ranitidina 60 mg/kg e NaCl 0,9 %, uma vez ao dia, durante 14 dias.

Ao final do décimo quarto dia, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas, anestesiados para retirada de uma amostra de sangue destinada à realização dos exames hematológicos e bioquímicos e eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, fotografados e a área de lesão ulcerativa (ALU) foi determinada por planimetria computadorizada (Software *ImageJ* (Bethesda, MD, USA) e os dados foram expressos em mm².

a) ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os estômagos com úlceras crônicas foram seccionados e fixados em formalina tamponada 10%. Após a fixação, as amostras foram lavadas com água, imersas em álcool etílico a 70% durante 3-4 dias e incorporadas em parafina. Secções de parafina de 5 µm de espessura foram colhidas e coradas com hematoxilina/eosina (HE) e com ácido periódico-Schiff (PAS). A análise histológica das seções gástricas foi realizada utilizando um sistema de microscopia automatizada MICRO DIP (KacilInc).

b) ANALISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A imuno-histoquímica para Ki-67 e bromodeoxiuridina (BrdU) foi realizado em cortes de 4 µm de espessura em parafina de amostras contendo porções representativas da área ulcerada. Inicialmente, as amostras foram desparafinadas em xileno e hidratadas (CALDAS *et al.*, 2015).

A expressão das proteínas Ki-67 e BrdU foi detectada usando o método de biotina livre em conjugação com HRP (Peroxidase). A recuperação antigênica foi realizada usando uma panela de pressão histológica por dois minutos. As lâminas foram resfriadas até à temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada usando BSA (albumina de soro bovino) durante 1 h. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas pernoite com anticorpo monoclonal primário anti-rato para a proteína Ki-67 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA - código: sc-23900, diluição 1: 200) e para a proteína BrdU (código Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA IIB5, código : sc-32323, diluição 1: 200). Em seguida,

utilizou-se um sistema de visualização HRP. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com solução contendo diaminobenzidina (DAB), lavadas em água, coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas. As células imunorreativas para Ki-67 e BrdU foram detectadas pela presença de um cromogénio castanho avermelhado escuro no núcleo ou núcleo/citoplasma, respectivamente, nas células epiteliais da área da lesão. A reatividade foi indicada usando as seguintes pontuações: reatividade positiva-leve (em 10-15% das células analisadas), reatividade moderada (em 25-50% das células analisadas), forte reatividade (acima de 50% das células analisadas), ou negativo (em menos de 10% de células analisadas).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELICOBACTER PYLORI

4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade de anti-*Helicobacter pylori* (ATCC 43504) foi avaliada determinando a concentração inibitória mínima (ANTONISAMY *et al.*) de EESM e EHSm (64-1024 µg/mL) usando o método espectrofotométrico de microdiluição de caldo de acordo com as diretrizes do Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (Tholen *et al.*, 2003). Os poços de microplaca foram preenchidos com 100 µL de meio de crescimento líquido (infusão de cérebro e coração suplementada com 10% de soro de vitelo fetal) contendo diferentes concentrações dos extratos. A absorbância foi lida num espectrofotómetro ($\lambda = 620$ nm) e as microplacas foram então incubadas a 36-37 ° C na presença de CO₂ a 10%, durante 72 h. O teste foi realizado em triplicado e repetido pelo menos três vezes, juntamente com controles de crescimento (ausência de amostra) e grupo de controle (meio de cultura contendo diferentes concentrações de agente de teste para controle de cor). A CIM foi determinada graficamente e foi definida como a menor concentração de agente antibacteriano em que houve queda acentuada (90%) na absorbância. A amoxicilina (0,065 - 4 µg/mL) foi utilizada como padrão.

4.5.2 Ensaio de inibição da urease

A atividade inibidora de urease do EESm foi determinada quantificando a amônia produzida através da hidrólise catalisada por urease de ureia, de acordo com o método descrito por (Tanaka *et al.*, 2003). Foram adicionados 25 µL de urease de 4 UI (urease de

feijão, tipo III, Sigma-Aldrich) e 25 µL da amostra em diferentes concentrações a uma microplaca de 96 poços e incubados durante 2 h à temperatura ambiente. O ácido bórico foi usado como padrão. A inibição percentual foi calculada com a equação $(1 - \text{amostra ABS} / \text{controle ABS}) \times 100$, onde o ABS é a absorvência. A concentração efetiva semi-máxima (CE₅₀) da hidrólise do substrato, foi calculada com base no efeito inibitório de várias concentrações de EESm.

4.5.3 Inibição da produção de Óxido Nítrico (ON)

A linha de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) (células aderentes) a 1×10^6 células/poço/mL em DMEM suplementado com FBS (DMEM-10) foram incubadas com EESm e LPS (5 µg/mL) durante 24 h a 37°C °C em 5% de atmosfera de CO₂ para este ensaio. A produção de NO foi determinada medindo a acumulação de nitrito, um produto final estável, no sobrenadante da cultura de acordo com a reação de Griess. A absorvência foi lida a 540 nm e a concentração de nitrito no meio foi calculada usando nitrito de sódio como padrão. As células incubadas com LPS apenas foram utilizadas como um controle positivo. Os ensaios foram seguidos pelo controle do crescimento e viabilidade dos macrófagos após as experiências pelo ensaio MTT-tetrazolium (MOSMANN, 1983).

4.5.4 Avaliação da capacidade de eliminação do óxido nítrico

O ensaio baseou-se na metodologia apresentada por Marcocci et al., 2007 com adaptações. Inicialmente, realizamos a preparação de SNP (1,25 mM) em tampão fosfato pH 7,0 (0,1 M). Após a obtenção desta solução, 50 µL da mesma foram incubadas com 50 µL de EESm em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 100 µL de reagente de Griess (1% p/v de sulfanilamida, 0,1% p/v de naftilenodiamina, ácido ortofosfórico 2,5% v/v) e a mistura reaccional foi então lida a 540 nm num leitor de microplacas iMark (BioRad, Washington, EUA). Trolox foi usado como controle padrão (25, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, Dunnet, test student T ou Sidak. A análise estatística foi realizada utilizando *GraphPad Prism* (Inc., La Jolla, CA, USA 7.0 Software). O nível de significância mínimo para rejeição da hipótese nula foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

5.1.1 Screening fitoquímico dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Spondias mombin*

Por meio da prospecção fitoquímica foi possível identificar no extrato etanólico das folhas de *S. mombin* (EESm) a presença expressiva de flavonoides, derivados cinâmicos, triterpenos, esteroides, mono e sesquiterpenos. O extrato hexânico contém somente as classes apolares: triterpenos, esteroides, mono e sesquiterpenos. (Tabela 2)

Tabela 2 - Classes de metabólitos secundários encontradas no extrato etanólico e hexânico das folhas secas de *Spondias mombin*

Classe de metabólitos secundários	EESm	EHSm
heterosídeos cianogênicos	-	-
Saponinas	-	-
Flavonoides	+++ ^{1,3}	-
derivados cinâmicos	+++	-
triterpenos e esteroides	+++	+++
mono e sesquiterpenos	+++	+++
alcaloides	+	-
proantocianidinas e leucoantocianidinas	+ ⁽²⁾	-
Cumarinas	-	-
Quinonas	-	-

(1) Heterosídeos de 3'-OH e 4'-OH flavonoides; (2) Proantocinidinas condensadas (polimérica), ausência de monômeros e dímeros; (+++) forte; (++) médio; (+) fraco; (Alqasoumi *et al.*) ausente.

Fonte: Autor.

Os extratos em estudo não contêm heterosídeos cianogênicos, substâncias pertencentes a essa classe que ao serem hidrolisadas liberam o ácido cianídrico considerado tóxico (BRAZ *et al.*, 2013).

No estudo realizado por Offiah e Anyanwu (1988), os autores verificaram a presença de esteroides e triterpenos no extrato aquoso das folhas de *S. mombim*. Além destas classes, já foram descritas para essa espécie a presença de quinonas, taninos e saponinas (ABO *et al.*,

1999). Esta contradição de algumas classes de substâncias com relação ao nosso estudo pode ser justificada pelo uso de diferentes solventes para preparação do extrato, como também a sazonalidade (WILT e MILLER, 1992; NDAMBA *et al.*, 1994).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides e terpenos, tem sido foco de estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Do ponto de vista fisiológico, os flavonoides (presentes no EESm) são descritos por apresentarem os seguintes mecanismos de ação: a) se ligam a enzimas presentes na membrana celular, como a NADH oxidase, isso é importante para algumas doenças como as úlceras pépticas, pois previne a formação de EROs (BRON e GRIENDLING, 2009); b) se ligam a íons de metais pesados, fortes inibidores de grupos sulfidrila em sítios ativos de enzimas anabólicas e protetoras. Portanto, os flavonoides ao formarem complexos com os metais pesados danosos, protegem o organismo da ação oxidante destes (HAVSTEEN, 2002); c) participam de transferência de elétrons de sistemas enzimáticos, combatendo os radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças como cardiovasculares (SILVA *et al.*, 1999); d) atuam diretamente sequestrando radicais livres (GEY, 1998). Com isso, estes metabólitos são considerados potencialmente antioxidantes e de suma importância para a prevenção e ou tratamento de úlceras pépticas (BRITO, 2008).

Outra classe de composto predominante nos extratos em estudo foram os terpenos, os quais despertam grande interesse farmacológico devido a ampla variedade de atividades apresentadas, tais como: anticancerígena, cicatrizante, antinociceptiva, antifúngica e anti-inflamatória (HOUGHTON *et al.*, 2003). Diversos terpenos presentes em óleos essenciais e em extratos hexânicos têm demonstrado potencial gastroprotetor, inibindo e/ou protegendo lesões gástricas induzidas por diferentes agentes. O 1,8-cineol encontrado no óleo essencial de *Hyptis martiusii* ao induzir um aumento na produção de muco, tendo como base sua interação com grupamentos sulfidrílicos (CALDAS, *et al.*, 2013), o β -eudesmol e o hisinolsol mostraram como inibidores da secreção gástrica (NOGAMI *et al.*, 1986). Silva e colaboradores ao avaliarem a atividade gastroprotetora do terpeno isopulegol, verificaram um efeito mediado por prostaglandinas, canais de K_{ATP} e sistema antioxidante.

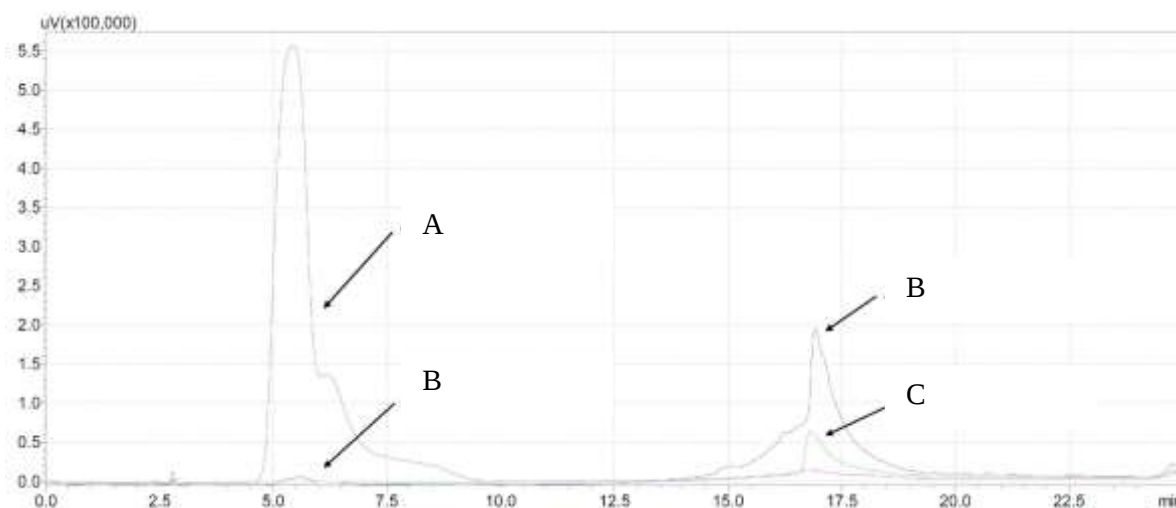
Os dados observados na prospecção fitoquímica sugerem uma possível atividade gastroprotetora por parte dos extratos de *S. mombin*.

5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das folhas e frutos de *Spondias mombin*

➤ Análise por CLAE do EESm

Por meio da análise cromatográfica do EESm, foi possível identificar dois compostos usando padrões analíticos com base na semelhança entre tempos de retenção e espectro de absorção ultravioleta ($\lambda = 260$ nm). Eles foram identificados como ácido gálico ($101,52 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) e ácido elágico ($68,74 \pm 1,50 \mu\text{g/mL}$) (Figura 3).

Figura 3- Cromatograma comparativo entre o EESm e os ácidos gálico e elágico



Nota: (A) ácido gálico; (B) Extrato etanólico de *Spondias mombin*, (C): Ácido elágico.

A presença de ácido elágico no extrato hidrometanólico desta espécie e sua atividade antioxidante foram descritas por Da Silva *et al.*, 2012. Murakami *et al.*, 1991 descreveram um efeito inibitório marcado pelo extrato na secreção ácida e na ocorrência de lesões gástricas induzidas pelo estresse, e esses efeitos foram atribuídos a inibição da atividade de H^+ , K^+ -ATPase.

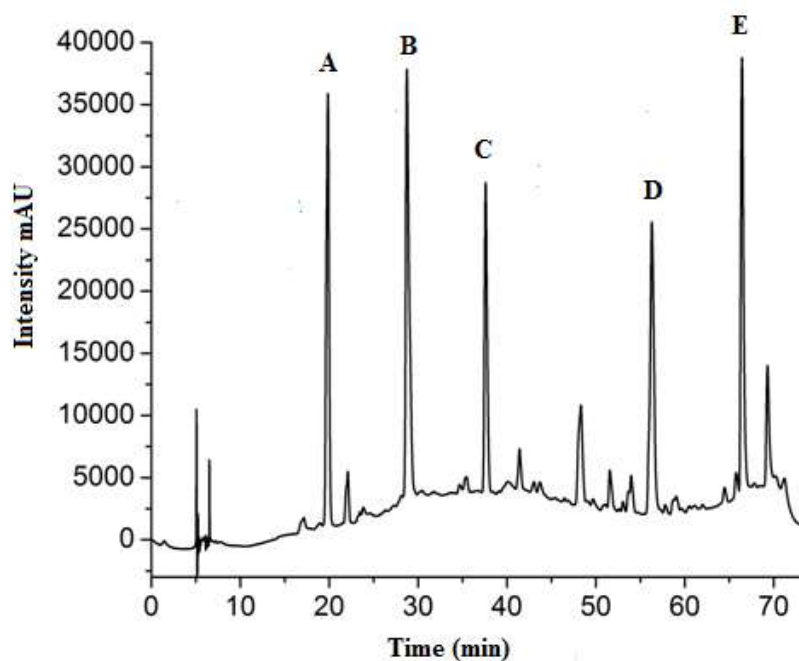
O ácido gálico é descrito como um gastroprotector, que inibe a apoptose mitocondrial (ABDELWAHAB, 2013) Concentrações mais elevadas deste composto bioativo em alimentos, juntamente com a presença de ácido elágico em extratos vegetais, aumentaram

sua capacidade antioxidante (GUPTA E RAO, 2014; LEE E CHEN, 2016; ESPINDOLA *et al.*, 2016).

➤ Análise por CLAE do EHSm

Por meio da análise cromatográfica do EHSm, foi possível identificar cinco compostos usando padrões analíticos com base na semelhança entre tempos de retenção e espectro de absorção ultravioleta ($\lambda = 240$ nm). Foram identificadas epicatequina ($22,3 \pm 5,6$ $\mu\text{g/mL}$), rutina ($25,6 \pm 3,6$ $\mu\text{g/mL}$), catequina ($14,8 \pm 1,3$ $\mu\text{g/mL}$), chrisina ($13,5 \pm 3,2$ $\mu\text{g/mL}$) e ácido gálico ($21,46$ $\mu\text{g/mL} \pm 5,1$) (Figura 4).

Figura 4- Análise cromatográfica do EHSm



Nota:(A) epicatequina, (B) rutina, (C) catequina, (D) chrisina e (E) ácido gálico.

A composição fitoquímica do extrato hexânico das folhas secas de *Spondias mombin* não foi descrita. A presença de epicatequina e catequina em frutos do genero *Spondias* já foi relatada (RAMALHO *et al.*, 2014).

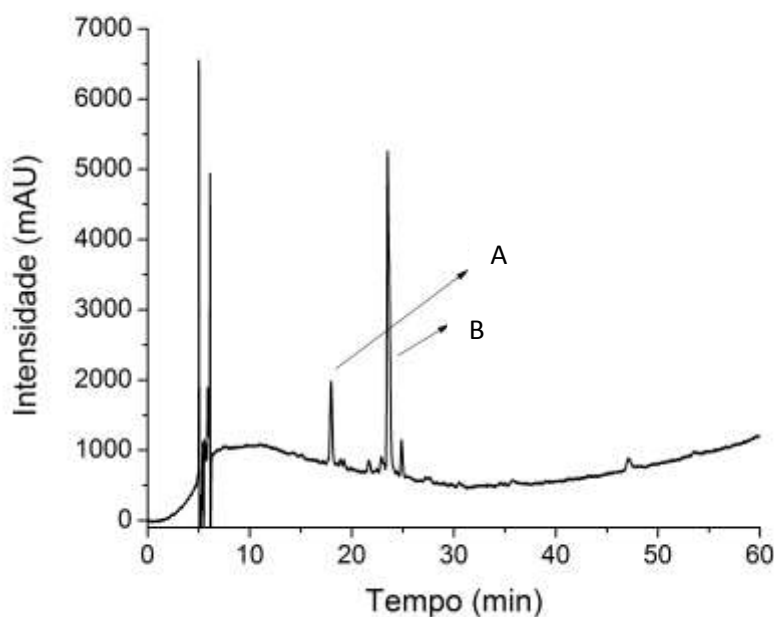
A epicatequina fornece gastroproteção por meio do reforço da barreira de muco e a neutralização do suco gástrico e esta proteção ocorre através do envolvimento de compostos de SH, α (2) - adrenorreceptores, NO, SOD e HSP-70. A catequina e seus derivados atuam como

gastroprotetores por inibição da atividade gástrica H^+ , K^+ -ATPase (MURAKAMI *et al.*, 1992). A catequina também demonstrou atividade gastroprotetora com mecanismo de ação ao reduzir os níveis de gastrina e histamina (SATO *et al.*, 2012). No estudo de Silva *et al.*, 2011 sobre a composição química e avaliação da atividade antiviral dos extratos hidrometanólicos de *Spondias mombin* e *S. tuberosa*, foi verificado a presença de rutina como um dos marjoritários para as espécies. A crisina é um flavonoide não descrito para a espécie em estudo ou para o gênero *Spondias*, porém é um importante flavonoide natural (ALI *et al.*, 2015) com efeito antioxidante (ANAND *et al.*, 2012). Flavonoides naturais com capacidade antioxidante estão demonstrando em sua maioria boa atividade gastroptotetora (BALAN *et al.*, 2015; ZAKARIA *et al.*, 2016). O ácido gálico foi identificado nos frutos (polpa e *in natura*) de *S. purpurea* e *S. tuberosa*. Esses dois frutos apresentaram capacidade antioxidante (DUTRA *et al.*, 2017).

➤ Análise por CLAE do SFSm

Por meio da análise cromatográfica de SFSm, foi possível identificar dois padrões analíticos utilizados pela semelhança entre os tempos de retenção e o espectro de absorção ultravioleta ($\lambda = 340$ nm), bem como para quantificá-los: epicatequina ($7,1 \pm 1,6$ $\mu\text{g/mL}$) e quercetina ($17,3 \pm 2,5$ $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5).

Figura 5- Análise cromatográfica do SFSm



Nota: (A) epicatequina e (B) quercetina.

A quercetina encontrada no SFSm é um composto descrito na literatura que inibe a produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose durante uma lesão gástrica (HU *et al.*, 2015). Além disso, este composto, quando associado ao pantoprazol (um inibidor da bomba de prótons), pode prevenir a gastroenteropatia induzida por diclofenaco de sódio (um anti-inflamatório não esteroide) em ratos (SINGHET *et al.*, 2017). A epicatequina, também encontrada no sumo, é um composto polifenólico que foi relatado por Rozza *et al.* (2012) como um gastroprotetor capaz de fortalecer a barreira do muco, neutralizar o suco gástrico e agir como um antioxidante. Em nosso estudo, os resultados de CLAE identificaram a presença de quercetina e epicatequina como os principais compostos presentes no SFSm. Esses achados sugerem que, pelo menos em parte, os efeitos gastroprotetores encontrados da SFSm são devidos destes compostos.

5.1.3 Teor de fenóis totais do EESm

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos nos vegetais e são considerados potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete,

atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (ALMEIDA *et al.*, 2006)

A quantificação de fenóis totais do EESm foi realizada através 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 de ácido gálico (EAG), onde x corresponde à concentração de ácido gálico e y , a absorbância da amostra. Com isso foi possível estabelecer o EAG de $119,58 \pm 0,9$ g de EAG/100g.

Estudos mostram que extratos vegetais com teor de polifenóis superior a 40 g de EAG/100 g de extrato são considerados potencialmente antioxidantes em estudos *in vitro* (BORA *et al.*, 2005; REBAYA *et al.*, 2014).

5.1.4 Teor de flavonoides do EESm

O teor de flavonoides totais foi determinado a partir da interpolação da absorbância da amostra contra a curva de calibração construída a partir do padrão quercetina, sendo expressos em g de EQ (equivalentes de quercetina) por g de extrato. O conteúdo de flavonoides presentes na amostra do extrato etanólico de *Spondias mombin* foi de 19,6 g de EQ/100 gramas de extrato, sendo a equação da curva de calibração de quercetina $y = 0,0363x - 0,0892$, onde y é a concentração de quercetina (Coeficiente de correlação, $R^2 = 0,9884$).

De acordo com Rebaya e colaboradores (2014), vegetais com teor de flavonoides acima de 6,0 g de quercetina/100 gramas de extrato são considerados valores significativos para apresentarem atividade biológica, como antioxidante.

5.2 ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO EESM

5.2.1 Fosfomolibdênio

Este método fundamenta-se na redução do molibdênio (Antonisamy *et al.*) a molibdênio (V) na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695 nm. A atividade antioxidante do EESm foi calculada em $82,8 \pm 0,7$ % em relação ao ácido ascórbico, atividade considerada 100%.

Este é o primeiro relato da avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas secas de *S. mombin* através do método de redução do molibdênio. O valor obtido está próximo ao do ácido ascórbico. A atividade antioxidante observado para EESm pode estar fortemente relacionada com o alto teor de fenóis totais (BORA *et al.*, 2005).

5.2.2 DPPH (2,2-difenil1-picrilhidrazil)

A capacidade antioxidante do EESm ($CE_{50} = 5,53 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) foi próxima a CE_{50} do controle positivo ácido ascórbico ($4,00 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$), utilizado com frequência como padrão para a atividade antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001).

Conforme Kuskoski *et al.* (2005), a capacidade antioxidante de uma amostra não é dada somente por compostos isolados (polifenóis e terpenos), mas também a interação entre eles, uma vez que substâncias interagem entre si, podendo produzir efeitos sinérgicos ou antagônicos.

5.2.3 ABTS (2,2-azobis- (3-wtilbenzotiazolina-6-sulfonato)

O método de inibição de radicais ABTS é gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Através deste, pode-se verificar a atividade de compostos tanto de natureza hidrofílica como lipofílica (KUSKOSQUI *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante do EESm pelo método ABTS foi determinado a partir da interpolação da absorbância da amostra contra a curva de calibração construída a partir do padrão Trolox. O TEAC (Atividade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox) por g de extrato foi de 798,13 mM e o extrato em estudo apresentou uma atividade de sequestro de radicais ABTS $\cdot$ de 43,93%.

Tiveron (2010) ao avaliar o potencial antioxidante de extratos de diversos legumes por meio deste método considerou valores inferiores a 810 mM/g como potencialmente baixos. Provavelmente os compostos antioxidantes presentes no EESm possuem baixa reatividade com o radical ABTS, daí a importância da realização da atividade antioxidante por distintas metodologias (VILLANO *et al.*, 2006).

5.2.4 Redução do ferro - FRAP

Por meio deste método, a atividade antioxidante foi calculada em 2492,67 μ M de trolox/g do extrato. O método FRAP reduz o complexo Fe (III) -TPTZ para Fe (II) -TPTZ a um pH baixo (RUFINO et al., 2006).

O estudo fitoquímico antioxidante *in vitro* mostra que o extrato etanólico de *S. mombin* contém classes de compostos bioativas de interesse nos processos de gastroproteção.

5.3 ESTUDOS IN VIVO

O valor da dose letal média é estabelecido com a finalidade de evitar o uso inadequado de superdoses que possam levar a morte ou debilidade ao animal. Neste estudo não foram observadas alterações no sistema nervoso central e autônomo dos animais tratados com as doses únicas de 2.000 mg/kg de EHSm e EESm, quando comparados ao grupo controle. Também não foi constatado nenhum evento de morte nos animais avaliados, durante o período de 14 dias após o tratamento, impossibilitando o cálculo da DL_{50} ($DL_{50} > 2.000$ mg/kg). Considerando a inexistência de estudos anteriores com administração oral do EESm e EHSm, determinou-se a partir 2.000 mg/kg. Isto colabora para estabelecer as doses testadas nos ensaios *in vivo*.

A observação durante os 14 dias no consumo de água, ração e ganho de massa, verificou-se que os extratos não causaram alterações significativas durante os 14 dias de administração, como mostrado na Tabela 3. A massa corporal do grupo tratado com os extratos não diferiram do grupo controle. A análise macroscópica dos órgãos alvo dos animais tratados com EESm e EHSm não mostraram diferenças significativas em peso, cor ou textura em relação ao grupo controle (dados não mostrados). Estes parâmetros são importantes indicadores fisiopatológicos que podem ser afetados por reações metabólicas causadas por substâncias tóxicas (SING *et al.*, 2011).

Tabela 3. Efeito dos extratos etanólico (EESm) e hexânico (EHSm) das folhas de *Spondias mombin* sobre os consumos de água, ração e massa corporal em camundongos após 14 dias da administração única.

Parâmetros	Tratamento		
	Controle (solução NaCl 0,9%)	EESm (2000 mg/kg)	EHSm (2000 mg/kg)
Consumo de ração (g)	31,36 ± 1,75	31,79 ± 1,37	30,86 ± 0,93
Consumo de água (mL)	51,14 ± 3,46	58,50 ± 3,03	43,93 ± 3,86
Massa inicial (g)	30,71 ± 0,68	31,43 ± 0,87	29,40 ± 0,74
Massa final (g)	34,29 ± 0,68	35,83 ± 0,83	31,80 ± 1,24

Os valores representam a média ± E.P.M (n = 5 / grupo)

Na avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, observou-se apenas uma alteração sutil nos níveis de creatinina após a administração do EHSm (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito do extrato etanólico (EESm) e hexânico das folhas de *Spondias mombin* (EHSm) em parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos após 14 dias da administração única

Parameters	Tratamento		
	Controle (solução de 0,9% NaCl)	EESm (2000 mg/kg)	EHSm (2000 mg/kg)
Hematológicos			
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	$8,87 \pm 0,27$	$9,32 \pm 0,26$	$9,39 \pm 0,21$
Hb (g/dL)	$15,15 \pm 0,41$	$14,99 \pm 0,34$	$15,10 \pm 0,24$
Ht (%)	$43,57 \pm 2,24$	$48,00 \pm 1,32$	$48,37 \pm 1,18$
MCV (fL)	$50,33 \pm 0,95$	$51,43 \pm 0,53$	-
MCH (pg)	$17,40 \pm 0,87$	$16,09 \pm 0,28$	$16,16 \pm 0,18$
MCHC (g/dL)	$32,12 \pm 0,17$	$31,20 \pm 0,31$	$31,50 \pm 0,24$
RDW (%)	$12,30 \pm 0,25$	$12,76 \pm 0,29$	$12,20 \pm 0,19$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$682,80 \pm 49,24$	$612,00 \pm 33,83^*$	$612,00 \pm 40,03$
Bioquímicos			
Creatinina (mg/dL)	$0,18 \pm 0,20$	$0,28 \pm 0,20$	$0,48 \pm 0,08^{**}$
Fosfatase alcalina (mg/dL)	$196,60 \pm 20,46$	$236,70 \pm 29,04$	$238,00 \pm 23,93$
AST (mg/dL)	$164,00 \pm 25,29$	$224,00 \pm 31,92$	$138,30 \pm 13,50$
ALT (mg/dL)	$64,60 \pm 3,71$	$72,20 \pm 11,11$	$57,00 \pm 9,76$
BUN (mg/dL)	$53,80 \pm 1,57$	$56,57 \pm 7,67$	$58,60 \pm 2,78$

RBC: eritrócitos, Hb: hemoglobina, Ht: hematócrito, MCV: volume corpuscular médio, MCH: hemoglobina corpuscular médio, MCHC: concentração de hemoglobina, RDW: Distribuição de glóbulo vermelho, AST: alanina aminotransferase, ALT: aspartato aminotransaminase, BUN: ureia. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M (n = 5 / grupo), ** p < 0,01, - parâmetro não avaliado.

Uchendu e Isek, 2008 realizaram um estudo de toxicidade aguda em ratos com extrato hidroalcoólico de folhas de *S. mombin* (500, 1000 e 2000 mg/kg, i.p.) e não encontraram qualquer letalidade ou outros sintomas relacionados ao tratamento do extrato nos grupos. Esses dados mostram que o extrato de *S. mombin* não exerce nenhum efeito tóxico agudo.

Neste sentido, optou-se por usar doses iguais ou menores que 10% da dose máxima utilizada para investigação da DL_{50} (PORTO *et al.*, 2013). As doses do extrato etanólico foram de: 50, 100 e 200 mg/kg e do extrato hexânico foram de 5, 10 e 20 mg/kg. Estudos que

avaliem atividades farmacológicas *in vivo* de extratos e frações determinam que as doses não devem ultrapassar 1.000 mg/kg (SOUZA-BRITO, 1994).

5.3.1 Modelos de indução aguda

5.3.1.1 Atividade antiulcerogênica do EESm em úlcera induzida por etanol acidificado em camundongos

A triagem farmacológica para avaliar se o EESm tem efeito gastroprotetor foi realizado inicialmente pelo modelo de etanol acidificado em camundongos. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com EESm (50, 100 e 200 mg/kg) foi capaz de proteger significativamente a mucosa de danos em 59,02; 71,21 e 74,47%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Tabela 5). O lansoprazol também reduziu significativamente a lesão gástrica em 50,20 %. Este modelo produz lesões necróticas na mucosa gástrica e o ácido clorídrico é principalmente responsável por acelerar e agravar esse processo, devido à redução de fatores defensivos, como muco e bicarbonato (ALRASHDI *et al.*, 2012).

5.3.1.1.1 Teor de TNF e ON

Este é o primeiro relato da atividade antiulcerogênica de *Spondias mombin* por meio do modelo etanol acidificado. No estudo realizado com o extrato etanólico de *Spondias purpurea*, coletada na mesma região e com classes de metabólitos secundários semelhantes à descrita para a espécie em estudo, (DE ALMEIDA *et al.*, 2017) também verificou uma atividade gastroprotetora nas doses testadas neste mesmo modelo.

A quantidade de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no tecido gástrico foi medida usando um ensaio de imunoabsorção enzimática. O grupo de controle ($2,38 \pm 0,08$ pg/tecido) apresentou altos níveis de TNF- α , como mostrado na Tabela 5. O extrato de *S. mombin* (50, 100 e 200 mg/kg) reduziu significativamente os níveis de TNF- α em 62,61, 54,62 e 72,27 %, respectivamente. Além disso, o lansoprazol também reduziu significativamente o TNF- α em 15,12%, em comparação com o grupo de controle da úlcera (Tabela 5).

O TNF é um importante mediador da resposta inflamatória aguda e está envolvido na apoptose da mucosa gástrica lesada por diferentes agentes como outras citocinas pró-inflamatórias (NAKASHITA *et al.*, 2013). A apoptose está associada à perda de integridade

mucosa submetida a estresse, causando hemorragia microvascular e tem um papel importante no desenvolvimento de úlceras (MUTHURAMAN *et al.*, 2011). A administração de HCl/etanol ativa o sistema imune inato e promove o aumento dos níveis de TNF no tecido gástrico (SALGA *et al.*, 2012).

Nworu *et al.*, 2011 investigaram os efeitos do extrato de metanol de *S. mombin* sobre a inflamação e concluíram que o extrato pode aliviar as respostas inflamatórias, possivelmente através da supressão da produção de citocinas, como o TNF- α . Nossos resultados demonstraram a habilidade do EESm de inibir o nível de mediador pró-inflamatório de citocinas, que mostrou seu efeito anti-inflamatório na úlcera gástrica induzida por HCl / etanol.

O efeito do pré-tratamento com os níveis de EESm e lansoprazol sobre óxido nítrico (ON) nas lesões gástricas induzidas por HCl/etanol também é mostrado na tabela 5.

Os animais pré-tratados com EESm (50, 100 e 200 mg/kg) mostraram um aumento significativo em o nível de ON quando comparado ao grupo de controle. Da mesma forma, o nível de ON também foi significativamente alterado no grupo do lansoprazol.

O ON aumenta o fluxo sanguíneo, mantém a microcirculação gástrica, aumenta a secreção de muco na mucosa gástrica, inibe a ativação de leucócitos dentro da microcirculação e a liberação inerente de metabólitos e proteases reativos do oxigênio (NIV E BANIĆ, 2014)

Tabela 5- Efeito do pré-tratamento por via oral do EESm sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol em camundongos.

Pré-tratamento	Úlcera induzida por etanol acidificado		
	ILU	Produção de TNF- α (pg/mL of tecido)	Produção de NO (μ mol/g of tecido)
Controle	66,60 $\pm$ 7,60	2,38 $\pm$ 0,08	2,78 $\pm$ 0,03
lansoprazol (30 mg/kg)	33,17 $\pm$ 1,20***	2,02 $\pm$ 0,02***	4,47 $\pm$ 0,01***
EESm (50 mg/kg)	27,29 $\pm$ 1,30***	0,89 $\pm$ 0,01***	20,30 $\pm$ 0,43***
EESm (100 mg/kg)	19,17 $\pm$ 1,30***	1,08 $\pm$ 0,06***	11,41 $\pm$ 0,04***
EESm (200 mg/kg)	17,00 $\pm$ 0,77***	0,66 $\pm$ 0,05***	4,49 $\pm$ 0,17***

Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tykey, ***p < 0,001 (n=5-7).

5.3.1.2 Atividade gastroprotetora em úlcera induzida por etanol em ratos

5.3.1.2.1 Avaliação da atividade gastroprotetora do EESm em úlcera induzida por etanol

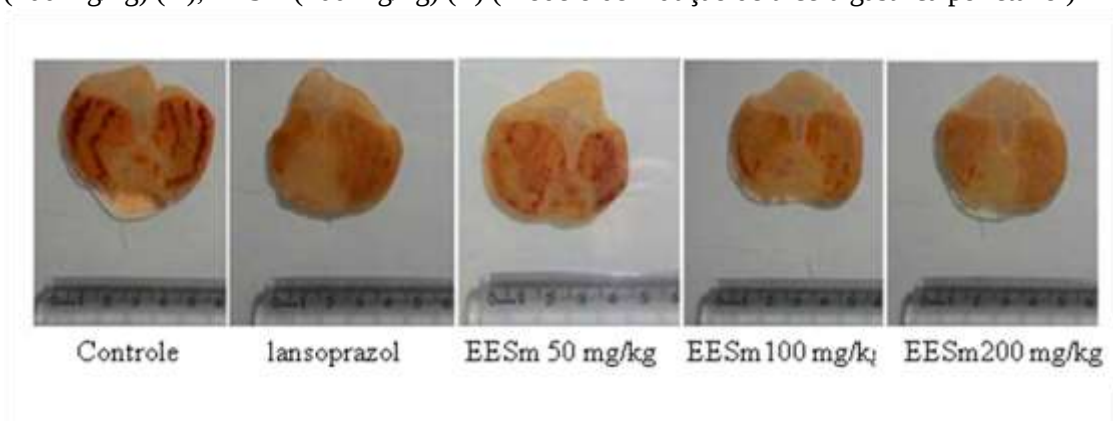
A administração oral do EESm (50, 100 e 200 mg/kg) e o lansoprazol inibiram significativamente as lesões gástricas induzidas pelo etanol, em comparação com o grupo controle (Tabela 6 e Figura 6), em 23,84; 90,33, 90,27 e 89,26% , respectivamente.

Tabela 6- Efeito do pré-tratamento oral com extrato etanólico das folhas de *Spondias mombin* (EESm) sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.

Pré-tratamento	Úlcera induzida por etanol absoluto
	ALU (mm ²)
Controle (NaCl 0,9%)	229,80 ± 11,00
lansoprazol (30 mg/kg)	24,67 ± 3,50 ***
EESm (50 mg/kg)	175,00 ± 17,78 **
EESm (100 mg/kg)	22,20 ± 3,22 ***
EESm (200 mg/kg)	22,35 ± 2,14 ***

Os resultados são expressos como a média ± S.E.M. (n = 5-7 / grupo). ANOVA seguida pelo teste de Tukey, ** p <0,01 *** p <0,001. LPO: peroxidação lipídica, grupos -SH: grupos sulfidrilo não protéicos

Figura 6- Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com EESm sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. controle (A), lansoprazol 30 mg/kg (B), EESm (50 mg/kg) (C), EESm (100 mg/kg) (D), EESm (200 mg/kg) (E) (Modelo de indução de úlcera gástrica por etanol)



- Quantificação dos níveis de malonaldeído e grupamentos sulfidrílicos em animais pré-tratados com EESm em úlcera induzida por etanol

A administração oral do EESm (50, 100 e 200 mg/kg) e o lansoprazol inibiram significativamente a concentração de malonaldeído (MDA) nas lesões gástricas induzidas pelo etanol, em comparação com o grupo controle (Tabela 6), em 37,93; 37,93; 90,27 e 55,17% , respectivamente. O nível de grupos sulfidrilas (grupos -SH) em animais que receberam EESm (50, 100 e 200 mg/kg) e o lansoprazol aumentaram a concentração de -SH em 158,89; 163,89; 80,00 e 162,22 respectivamente

Os animais submetidos a dano induzido pelo etanol apresentaram aumento nos níveis de MDA, bem como uma diminuição da produção e dos níveis de grupos sulfidrílicos não protéicos (grupos -SH) em comparação com os níveis observados em animais não

lesionados (CALDAS *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram que, para o EESm lansoprazole (30 mg/kg), uma diminuição significativa na peroxidação lipídica, como evidenciado por níveis reduzidos de malondialdeído, o que pode contribuir para os efeitos protetores da EESm. De acordo com Alvarez-Suarez et al., 2011, a peroxidação lipídica é um dos índices mais comumente utilizados na avaliação da gastroproteção e possivelmente está relacionada à capacidade de eliminar os radicais livres de oxigênio.

Tabela 7- Efeito do pré-tratamento oral com extrato etanólico das folhas de *Spondias mombin* (EESm) sobre níveis de malonaldeído e grupamentos sulfidrílicos

Pré-tratamento	Úlcera induzida por etanol absoluto		Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. (n = 5-7 / grupo)
	LPO (nmol of MDA/mg protein)	-SH groups (nmol/mg protein)	
Controle (NaCl 0,9%)	0,29 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,32	
lansoprazol (30 mg/kg)	0,13 $\pm$ 0,02 ***	4,72 $\pm$ 0,56 **	
EESm (50 mg/kg)	0,18 $\pm$ 0,00 ***	4,66 $\pm$ 0,42 *	
EESm (100 mg/kg)	0,18 $\pm$ 0,01 ***	4,75 $\pm$ 0,85 **	
EESm (200 mg/kg)	0,21 $\pm$ 0,01 **	4,49 $\pm$ 0,36 *	

grupo). ANOVA seguida pelo teste de Tukey, *p<0,05, ** p <0,01 *** p <0,001. LPO: peroxidação lipídica, grupos -SH: grupos sulfidrílicos não protéicos

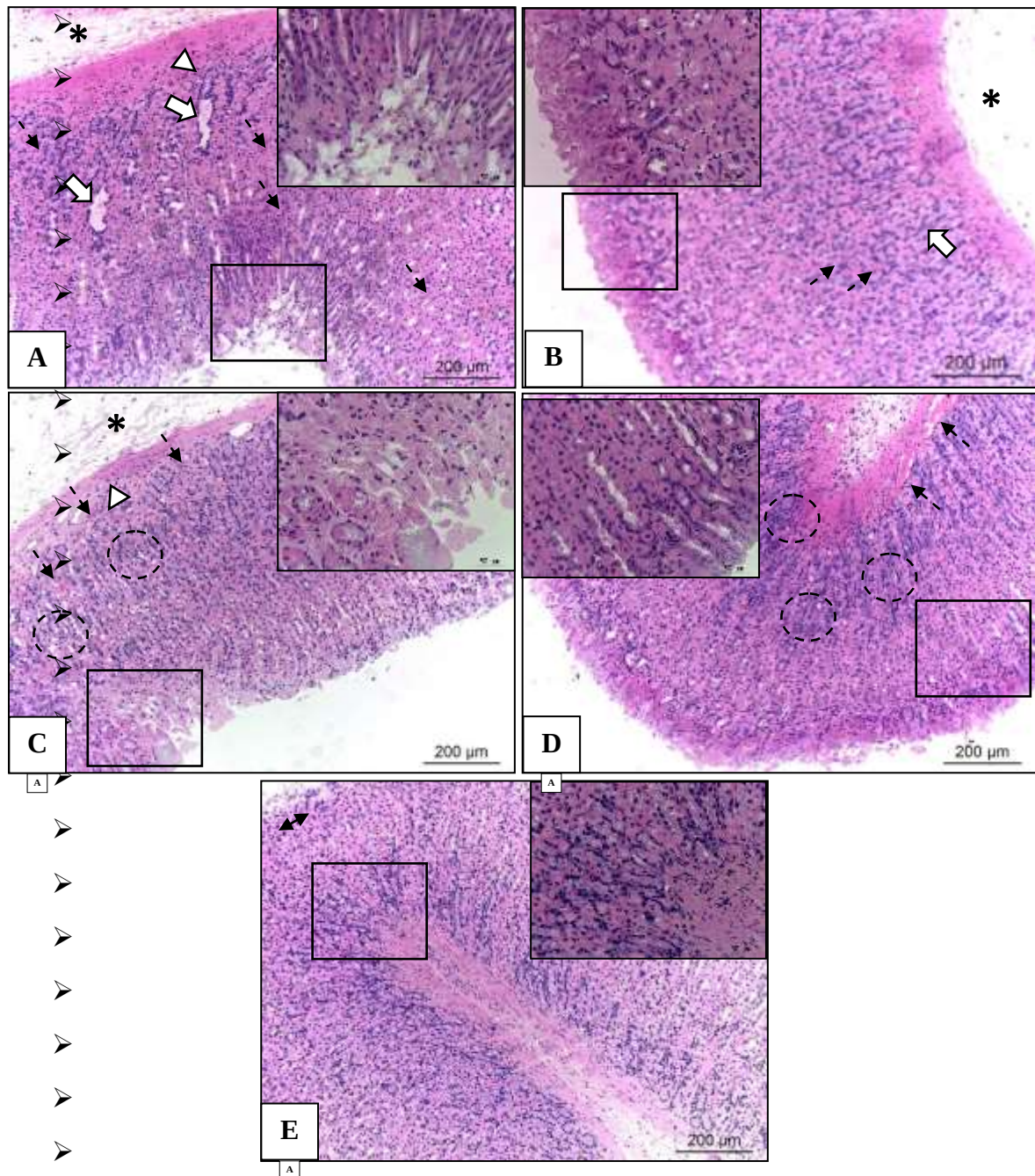
➤ Histopatologia do processo gastroprotetor do EESm em úlcera induzida por etanol

A partir do estudo histopatológico por microscopia óptica dos estômagos pré-tratados com EESm, foi possível verificar que o extrato impede que ocorra lesões nas camadas superficiais da mucosa gástrica pelo etanol. As doses do extrato em estudo e o lansoprazol (30 mg/kg) foram eficazes no tratamento da úlcera gástrica, prevenindo o dano à mucosa e preservando o epitélio, quando comparados ao controle negativo (Figura 7). Microscópicamente a dose de 100 mg/kg foi a menor dose que protegeu a mucosa gástrica, corroborando com as análises macroscópicas.

Estes dados são histopatologicamente relevantes já que a mucosa gástrica é uma das mais importantes do organismo por suas funções (absortiva e secretora), estrutura e processos patológicos que nelas se desenvolvem. Essa região contém pequenos sucos com textura delicada e milhões de foveolas (fossetas gástricas) que compreendem as glândulas. Estas são divididas em dois compartimentos: foveolar - que consiste de células epiteliais que delimitam toda a superfície mucosa e o glandular - formado pelas glândulas gástricas oxínticas e

pilóricas, que se subdividem entre as diferentes regiões anatómicas do estômago (HARBONE et al., 1991).

➤ **Figura 7-** Histopatologia da mucosa gástrica de ratos - EESm



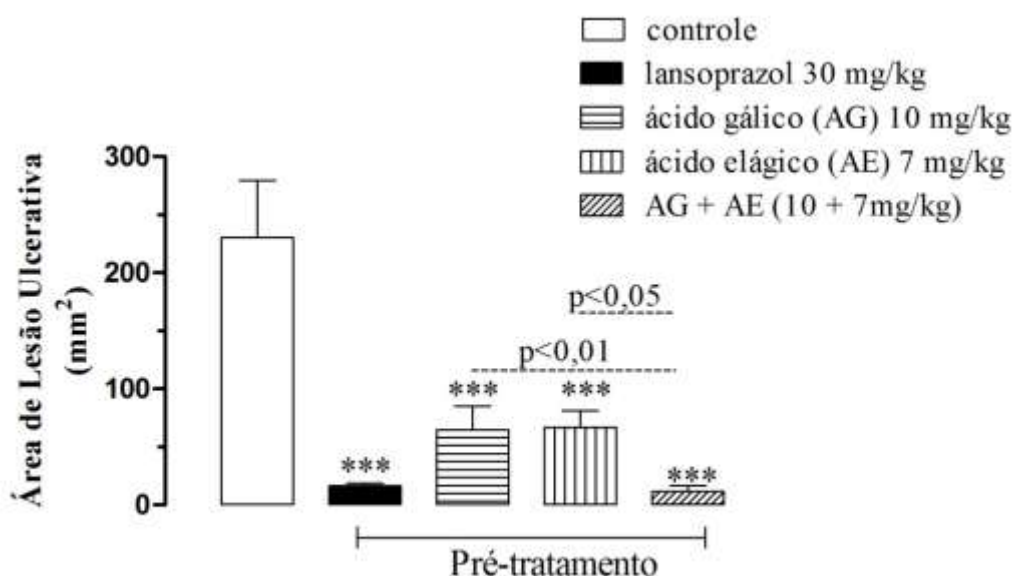
(A) Grupo controle (NaCl 0,9%). Notar em A desorganização do epitélio simples colunar das fossetas (detalhe ampliado) e das glândulas gástricas (setas); congestão dos capilares sanguíneos (setas tracejadas); edema da lâmina própria (asterisco) e infiltrado inflamatório mononuclear difuso (cabeça de seta). (B) Grupo lansoprazol. Em B evidenciar epitélio simples colunar das fossetas (detalhe ampliado) e das glândulas gástricas (setas) bem preservados apesar da presença moderada de edema difuso da lâmina própria (asterisco) e congestão dos capilares sanguíneos (setas tracejadas). (C) Grupo tratado 50 mg/kg. Notar em (C) mucosa gástrica pouco preservada apresentando esfoliações do epitélio simples colunar e necrose do epitélio superficial (detalhe ampliado) e das glândulas gástricas (círculos tracejados); congestão dos capilares sanguíneos (setas tracejadas); infiltrado inflamatório mononuclear difuso (cabeça de seta) e edema difuso da lâmina própria (asterisco). (D) Grupo tratado 100 mg/kg. Notar em (D) mucosa gástrica bem preservada, porém com presença de congestão dos capilares sanguíneos discreto. (E) Grupo

tratado 200 mg/kg. Notar em (E) mucosa gástrica bem preservada, porém apresentando áreas de esfoliações do epitélio simples colunar (seta dupla) discretas.

5.3.1.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido gálico, ácido elágico isolados e em associação em úlcera induzida por etanol

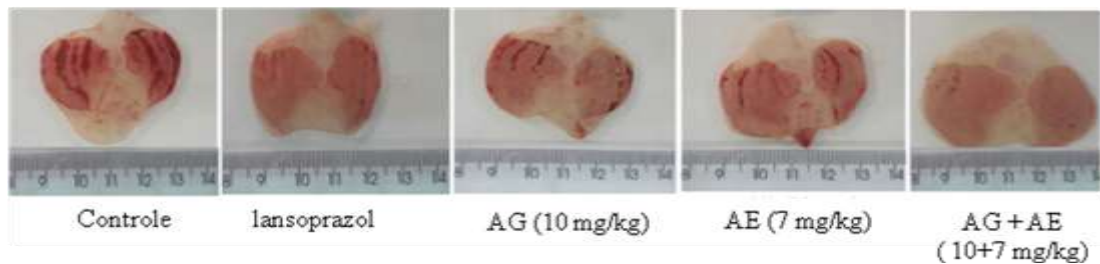
A administração oral do ácido gálico (10 mg/kg), ácido elágico (7 mg/kg), associação (ácido gálico, 10 mg/kg + ácido elágico, 7 mg/kg) e lansoprazol (30 mg/kg) inibiram significativamente lesões gástricas induzidas pelo etanol, em comparação com o grupo controle em 71,82, 70,92, 94,96 e 92,82%, respectivamente (Figuras 8 e 9). Além disso, observou-se uma atividade sinérgica da combinação destes dois compostos, com redução das lesões gástricas em 82,12% em relação ao ácido gálico e de 82,67% em relação ao ácido elágico. Este é o primeiro estudo que avalia a atividade gastroprotectora do ácido gálico e do ácido elágico.

Figura 8- Efeito do pré-tratamento oral com ácido gálico, ácido elágico e ácido gálico + ácido elágico em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M (n = 6 / grupo). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett, *** p < 0,001. Teste T de Student foi utilizado para comparar uma área de lesão ulcerativa verificada entre substâncias isoladas e a associação *** p < 0,001.

Figura 9 - Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e associação ácido gálico + ácido elágico (AG+AE) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos



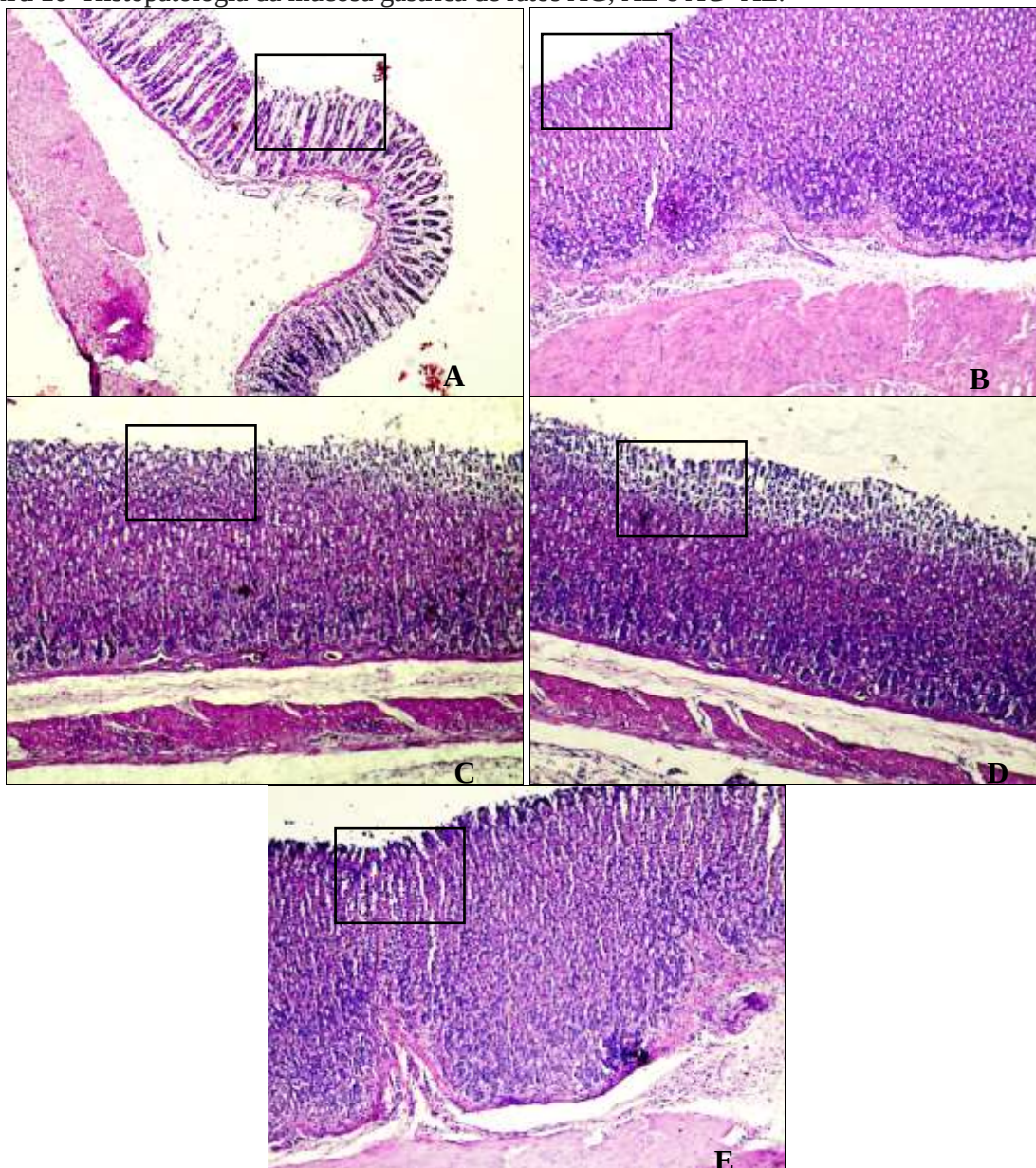
- Histopatologia do processo gastroprotetor dos ácidos gálico e elágico em úlcera induzida por etanol

Na análise histopatológica dos estômagos, o grupo controle apresentou uma desorganização da camada epitelial (Figura 10A). O grupo lansoprazol apresentou camada epitélio simples bem preservado (Figura 10B).

O pré-tratamento com AG, AE ou AG + AE impediu a ocorrência de lesões nas camadas superficiais da mucosa gástrica pelo etanol.

Nos grupos AG e AE, foi possível verificar uma esfoliação difusa moderada na camada epitelial superior da mucosa gástrica (Figuras 10 C e D). O grupo da associação AG + AE apresentou epitélio colunar simples bem preservado (Figura 10 E)

Figura 10- Histopatologia da mucosa gástrica de ratos AG, AE e AG+AE.



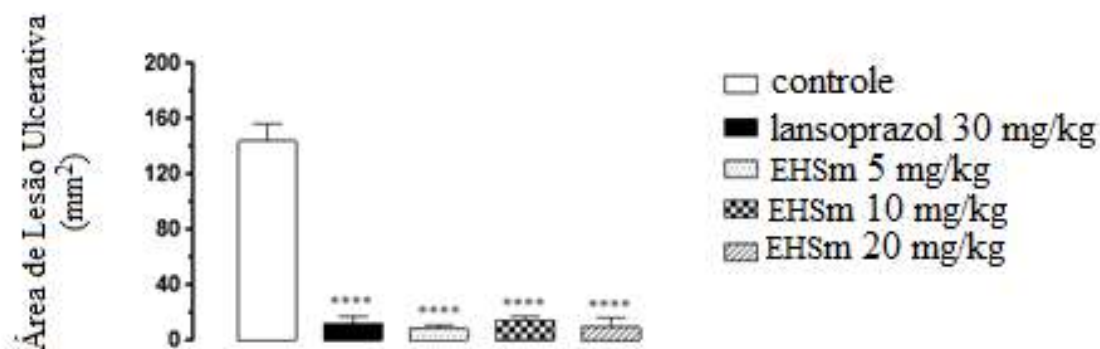
NaCl a 0,9% (controle, A), lansoprazol (30 mg/kg, B), ácido gálico (10 mg/kg, C), ácido elágico (7 mg/kg, D) e ácido gálico + ácido elágico (10 + 7 mg/kg, E) em úlcera induzida por etanol. O quadrado indica o epitélio colunar simples. Ampliação, 40x

5.3.1.2.3 Avaliação da atividade gastroprotetora do EHSm em úlcera induzida por etanol

A administração de etanol absoluto (4 mL/kg) causou lesão na mucosa gástrica de $149,30 \pm 12,48 \text{ mm}^2$ no controle lesionado. Os animais pré-tratados com EHSm em doses de 5, 10 e 20 mg/kg (v.o.) mostraram uma inibição significativa das lesões por, 93,99, 90,31 e

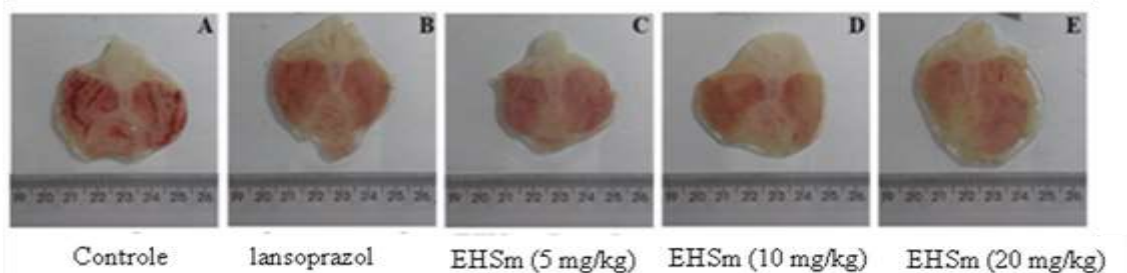
92,6%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Os animais que receberam lansoprazol (30 mg/kg) apresentaram uma inibição das lesões correspondente a 91,32% (Figuras 11 e 12).

Figura 11- Efeito do pré-tratamento oral do EHSm em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. (n = 6 / grupo). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de dunnett, **** p < 0,0001

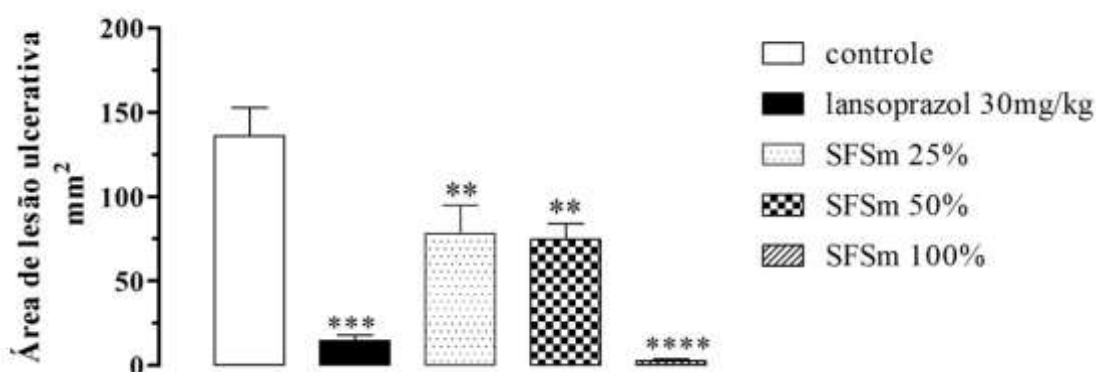
Figura 12- Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com EHSm sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. Controle (A), lansoprazol 30 mg/kg (B), EHSm (5 mg/kg) (C), EHSm (10 mg/kg) (D), EHSm (20 mg/kg) (E) (Modelo de indução de úlcera gástrica por etanol)



5.3.1.2.4 Avaliação da atividade gastroprotetora do SFSm em úlcera induzida por etanol

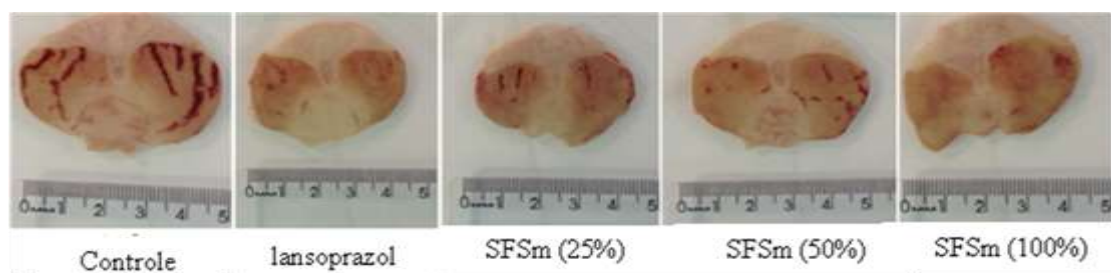
A administração de etanol absoluto causou danos extensos à mucosa gástrica com erosões hemorrágicas no grupo controle. A administração de SFSm (25, 50 e 100%) e lansoprazol inibiram significativamente as lesões gástricas quando comparadas com o grupo controle em 42,42, 45,09, 98,21 e 89,22%, respectivamente (**Figura13 e 14**).

Figura 13- Efeito do pré-tratamento oral do SFSm em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. ($n = 6$ / grupo). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Dunnett, **** $p < 0,0001$

Figura 14- Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com SFSm sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. Controle, lansoprazol 30 mg/kg, SFSm (25%), SFSm (50%), SFSm (100%). (Modelo de indução de úlcera gástrica por etanol)



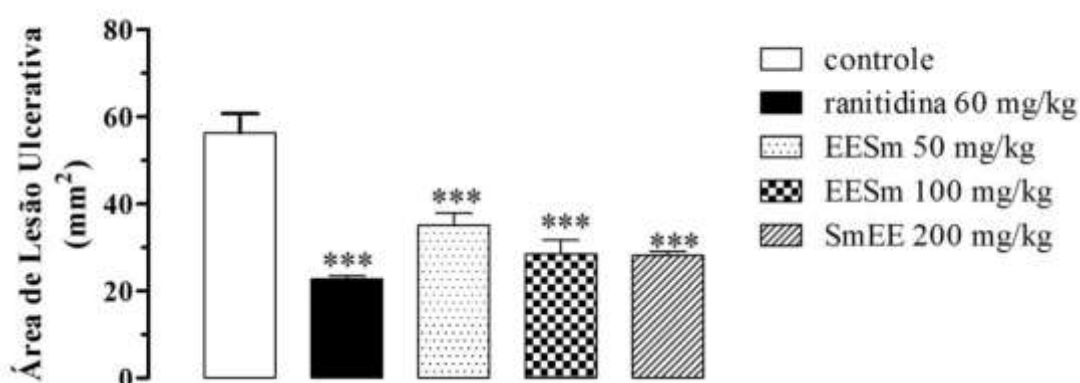
O modelo de úlcera induzido pelo etanol é comumente usado em experimentos com animais e as lesões ocorrem predominantemente na porção glandular do estômago (RUJJANAWATE *et al.*, 2005). Este agente necrotizante reduz os mecanismos defensivos gástricos, a partir da formação de espécies reativas de oxigênio (ZAMORA Rodríguez *et al.*), incluindo aniões superóxido, radicais hidroxílicos e peróxidos lipídicos (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2011). A administração oral de etanol provoca lesões hemorrágicas lineares, edema extenso da submucosa, friabilidade da mucosa, infiltração de células inflamatórias e perda de células epiteliais no estômago (FRANKE *et al.*, 2005). Estes danos à mucosa gástrica podem estar associados a uma diminuição nos níveis de glutathione, estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade da membrana e despolarização da membrana mitocondrial, levando à morte celular (LU e CEDERBAUM, 2008).

5.3.1.3 Atividade gastroprotetora em úlcera induzida por indometacina em ratos

5.3.1.3.1 Avaliação da atividade gastroprotetora do EESm em úlcera induzida por indometacina

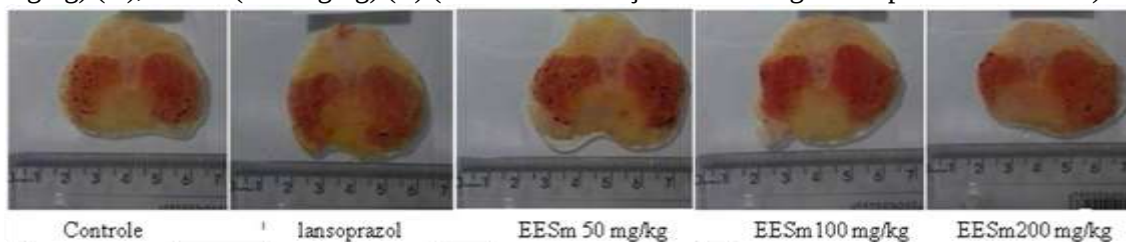
A administração subcutânea de indometacina (30 mg/kg) produziu uma lesão na mucosa gástrica de $56,21 \pm 4,30 \text{ mm}^2$ no grupo controle. Os animais pré- tratados com EESm nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) produziram uma significativa inibição das lesões causadas pela indometacina respectivamente de 36,8; 49,4 e 49,9% (Figura 15 e 16).

Figura 15- Efeito do pré-tratamento por via oral do EESm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey, *** $p < 0,001$ (n=5-6).

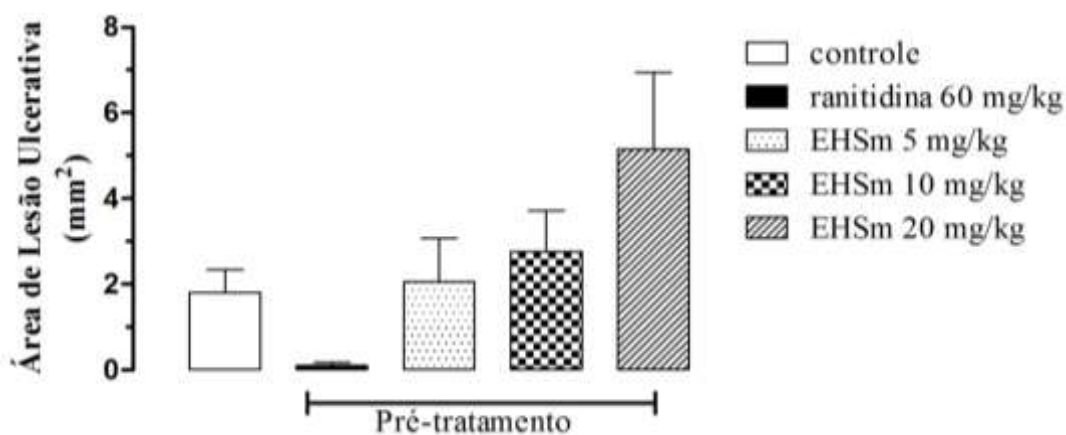
Figura 16-Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com EESm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos. Controle (A), ranitidina 60 mg/kg (B), EESm (50 mg/kg) (C), EESm (100 mg/kg) (D), EESm (200 mg/kg) (E) (Modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina)



5.3.1.3.2 Avaliação da atividade gastroprotetora do EHSm em úlcera induzida por indometacina

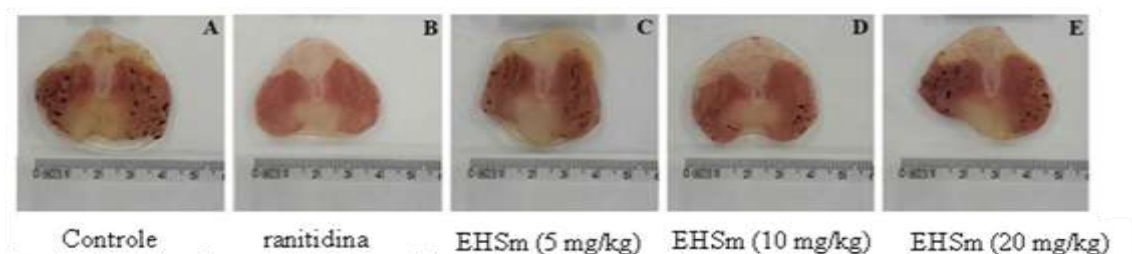
A administração subcutânea de indometacina (30 mg/kg) produziu uma lesão na mucosa gástrica de $1,77 \pm 0,44 \text{ mm}^2$ no grupo controle. Os animais pré-tratados com EHSm em doses de 5, 10 e 20 mg/kg não apresentaram inibição significativa das lesões em relação ao grupo controle. Os animais que receberam ranitidina apresentaram uma inibição das lesões correspondente a 94,53% (Figura 17 e Figura 18).

Figura 17-Efeito do pré-tratamento por via oral do EHSm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey, ****p < 0,0001 (n=6-7).

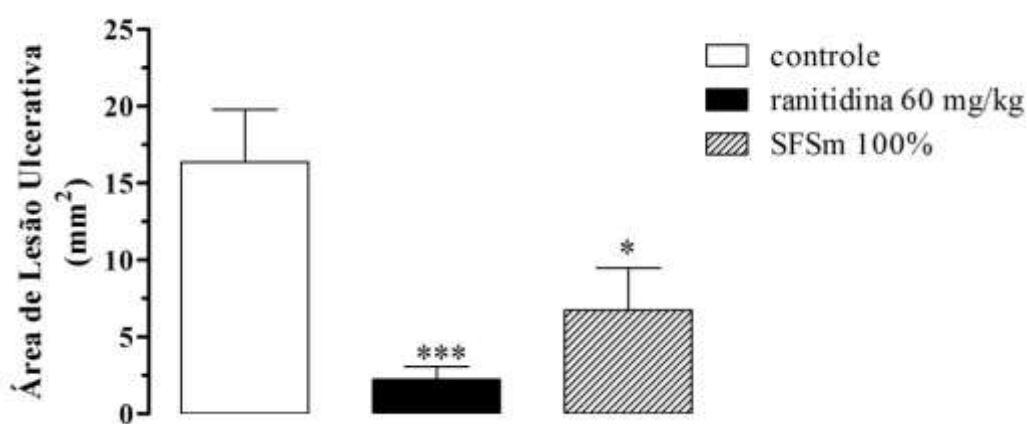
Figura 18-Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com EHSm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos. Controle (A), ranitidina 60 mg/kg (B), EHSm (5 mg/kg) (C), EESm (10 mg/kg) (D), EHSm (200 mg/kg) (E) (Modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina)



5.3.1.3 Avaliação da atividade gastroprotetora do SFSm em úlcera induzida por indometacina

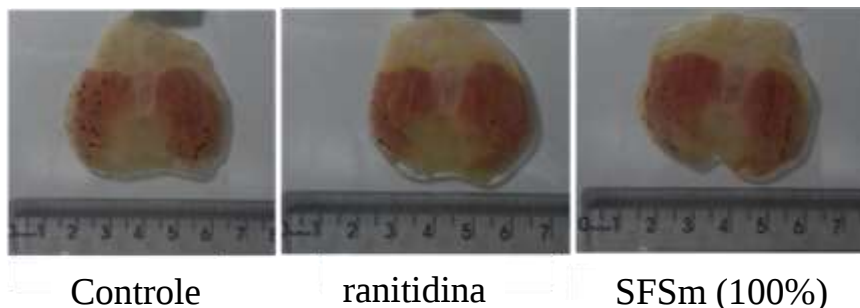
A administração subcutânea de indometacina (30 mg/kg), produziu uma lesão na mucosa gástrica de $16,36 \pm 3,44 \text{ mm}^2$ no grupo controle. Os animais pré-tratados com SFSm puro (100%) mostraram uma inibição significativa das lesões em 58,96% quando comparado ao grupo controle. Os animais pré-tratados com ranitidina (60 mg/kg), inibiram as lesões em 86,43% (Figura 19 e 20).

Figura 19-Efeito do pré-tratamento por via oral do SFSm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (n=6-8).

Figura 20-Estômagos de ratos pré-tratados por via oral com SFSm sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos. Controle (A), ranitidina 60 mg/kg (B), SFSm (100%) (C) (modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina)



Saibu e colaboradores (2015) ao avaliarem a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcólico das folhas de *S. mombin*, verificaram um efeito protetor ao utilizarem a dose de 100 mg/kg em lesões gástrica induzida por indometacina.

A exposição das células da mucosa gástrica aos AINE a curto prazo induz necrose e a longo prazo provoca apoptose (ABURAYA *et al.*, 2006). Os resultados deste trabalho sugerem que EESm atua por um mecanismo citoprotetor frente às lesões, exercendo atividade gastroprotetora, inibindo os mecanismos moleculares de lesões induzidas por indometacina.

A automedicação e o contínuo uso de AINE se tornaram um problema de saúde pública, pois está associado às complicações gastrintestinais. Os pacientes que fazem uso crônico dessa classe de medicamentos (15 a 30 %) apresentam distúrbios gástricos e sangramentos. Os AINE não seletivos aumentam a expressão de moléculas de adesão intercelulares no endotélio vascular da mucosa gástrica, aumentando assim a aderência neutrofílica ao endotélio vascular, levando à liberação de radicais livres, gerando danos à mucosa gástrica. Além disso, agem também de maneira sistêmica ao diminuir a síntese de PGs da mucosa (MIZUSHIMA, 2010). Por isto, essa classe compreende os fármacos mais utilizados e que mais desencadeiam efeitos indesejáveis.

5.3.2 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *Spondias mombin*

5.3.2.1 Efeito dos extratos das folhas e frutos de *S. mombin* sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em ratos

5.3.2.1.1 Efeito do EESm sobre a secreção gástrica

A administração intraduodenal do EESm (100 mg/kg) e da ranitidina (60 mg/kg) - antagonista dos receptores do tipo H_2 , em ratos com o piloro ligado por 4 horas aumentaram o pH do suco gástrico em 19,04 e 22,11%, respectivamente, reduziram a concentração de íons de hidrogênio (38,80 e 45,78%, respectivamente) e o conteúdo gástrico (27,43 e 75,22%, respectivamente), quando comparados ao grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8- Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EESm e ranitidina por via i.d.

Tratamento	pH	[H ⁺] (mEq/mL/4h)	Conteúdo gástrico (g)
Controle (NaCl 0,9 %)	2,94 ± 0,33	12,19 ± 1,59	1,13 ± 0,19
EESm (100 mg/kg)	3,50 ± 0,43*	7,46 ± 0,85***	0,82 ± 0,20**
ranitidina (60 mg/kg)	3,59 ± 0,38*	6,61 ± 1,71***	0,28 ± 0,06***
Falso operado	3,94 ± 0,39**	4,43 ± 0,98***	0,15 ± 0,03***

Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n = 5-8).

5.3.2.1.2 Efeito do EHSm sobre a secreção gástrica

A administração intraduodenal do EHSm (5 mg/kg) e da ranitidina (60 mg/kg) reduziram significativamente a acidez total (37,18 e 48,73%) respectivamente em relação ao grupo controle (Tabela 9). No entanto, o EHSm não conseguiu exercer nenhum efeito significativo nos parâmetros de pH e conteúdo gástrico.

Tabela 9- Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro, tratados com EHSm e ranitidina por via i.d.

Tratamento	pH	[H ⁺] (mEq/mL/4h)	Conteúdo gástrico (g)
Controle (NaCl 0,9 %)	3,54 ± 0,11	16,54 ± 1,46	0,54 ± 0,11
EHSm (5 mg/kg)	3,25 ± 0,13	10,39 ± 1,44*	0,80 ± 0,13
ranitidina (60 mg/kg)	3,53 ± 0,08	8,48 ± 0,80**	10,39 ± 1,44*
Falso operado	3,41 ± 0,13	14,87 ± 2,13	0,25 ± 0,04

Os resultados estão expressos como média ± E.P.M Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnet, *p < 0.05, **p < 0.01.

5.3.2.1.3 Efeito do SFSm sobre a secreção gástrica

A administração intraduodenal do SFSm (100%) e da ranitidina (60 mg/kg) reduziram significativamente a acidez total (71,97 e 37,69%) respectivamente em relação ao grupo controle e o conteúdo de secreção gástrica (57,35 e 76,47%), respectivamente em relação ao controle. Somente a ranitidina aumentou significativamente o pH (29%) quando comparada ao grupo controle (Tabela 10).

Tabela 10: Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura de piloro, tratados com SFSm e ranitidina por via i.d.

Tratamento	pH	[H ⁺] (mEq/mL/4h)	Conteúdo gástrico (g)
Controle (NaCl 0,9 %)	3,06 ± 0,08	17,30 ± 1,42	0,68 ± 0,01
SFSm (100%)	3,45 ± 0,31	4,85 ± 1,04***	0,29 ± 0,11**
ranitidina (60 mg/kg)	3,95 ± 0,11*	8,39 ± 0,89***	0,23 ± 0,11**
Falso operado	5,33±0,31**	10,78 ± 0,85**	0,16 ± 0,01***

Os resultados estão expressos como média ± E.P.M Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Este modelo é utilizado para avaliar os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (TOMA *et al.*, 2004), a fim de investigar uma possível atividade antissecretória e indicar um

efeito local e/ou sistêmico de algumas drogas. A ligadura do piloro promove o aumento da secreção gástrica mediada por reflexos vagos-vagais independentes das células G e enterocromafins (BAGGIO *et al.*, 2004). A administração intraduodenal investiga a atividade do composto quando administrado por via sistêmica, evitando o contato direto da substância com a mucosa gástrica (FARIA, 2009).

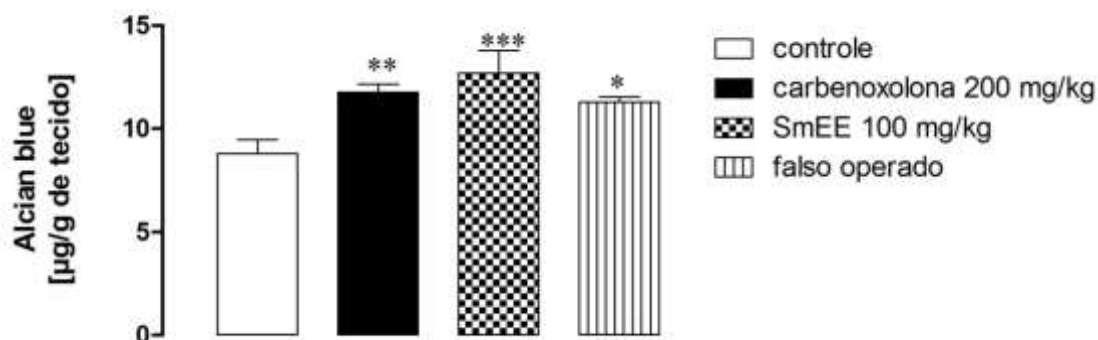
O pré-tratamento com EESm (100 mg/kg), EHSm (5 mg/kg), SFSm (100%) e com ranitidina (60 mg/kg), foram capazes de inibir significativamente a acidez total gástrica. O pré-tratamento com EESm (100 mg/kg) e com ranitidina (60 mg/kg) aumentaram o pH (Tabela 7). Sendo o ácido gástrico considerado um fator importante no desenvolvimento das lesões agudas e crônicas (CHANDRANATH *et al.*, 2002), podemos considerar a diminuição da acidez produzida pelos extratos e sumo testados um fator favorável no processo de gastroproteção.

5.3.2.2 Avaliação da participação de muco aderido à parede gástrica

5.3.2.2.1 Avaliação da participação de muco aderido no efeito gastroprotetor do EESm

A ligadura do piloro nos animais do grupo de controle mostrou uma diminuição significativa nos níveis de muco gástrico ($8,79 \pm 0,67$ µg de Alcian Blue/g de tecido) em comparação com os do grupo falso operado ($11,30 \pm 0,23$ µg de Alcian Blue/g de tecido). O tratamento com EESm (100 mg/kg) e carbenoxolona (200 mg/kg) aumentaram significativamente a produção de muco em 44,25 e 33,84%, respectivamente, em comparação com o grupo controle (Figura 21).

Figura 21-Efeito do EESm na produção de muco gástrico.

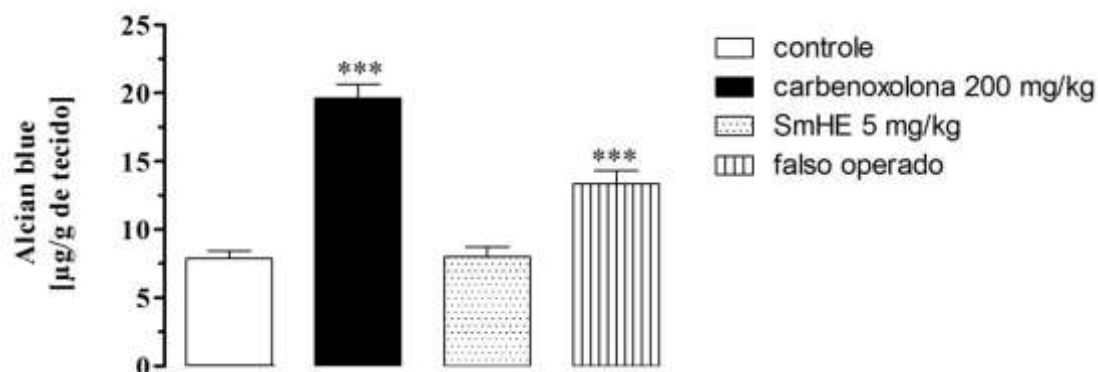


Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. (n = 5-7 / grupo). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

5.3.2.2.2 Avaliação da participação de muco aderido no efeito gastroprotetor do EHSm

A ligadura do piloro nos animais do grupo controle mostrou uma diminuição significativa nos níveis de muco gástrico 40,93% em comparação com o grupo falso operado ($13,35 \pm 0,96$ µg de Alcian Blue/g de tecido). O tratamento com EHSm (5 mg/kg) não alterou a produção de muco em comparação ao grupo controle. A carbenoxolona (200 mg/kg) aumentou a produção de muco em 142,92%, em comparação com o grupo controle (Figura 22).

Figura 22- Efeito do EHSm na produção de muco gástrico.

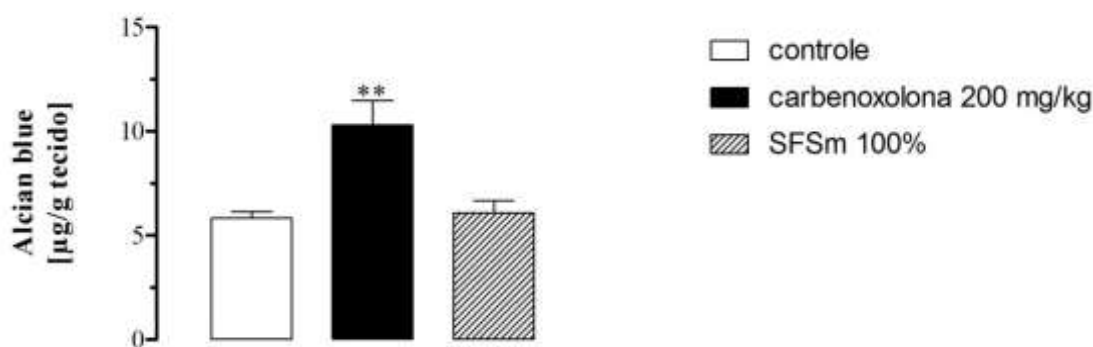


Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. (n = 6-8). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, *** p <0,001.

5.3.2.2.3 Avaliação da participação de muco aderido no efeito gastroprotetor do SFSm

A ligadura do piloro nos animais do grupo controle mostrou uma produção de muco igual a $5,83 \pm 0,32$ μg de Alcian Blue/g de tecido nos níveis de muco gástrico. O pré-tratamento com carbenoxolona (200 mg/kg) aumentou significativamente a produção de muco em 76,80% em comparação ao grupo controle. O SFSm 100% não alterou a produção de muco gástrico em comparação ao grupo controle (Figura 23).

Figura 23- Efeito do SFSm na produção de muco gástrico.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. ($n = 6$). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey, ** $p < 0,01$.

Somente o EESm foi capaz de aumentar a produção de muco quando comparada a produção do grupo controle. Alguns estudos associaram a atividade antiulcerogênica de materiais vegetais com estimulação da produção de muco gástrico como um dos mecanismos gastroprotetores (ISMAIL *et al.*, 2012; CALDAS *et al.*, 2014; BAIUBON *et al.*, 2016).

O aumento da secreção de muco é um mecanismo importante de defesa da mucosa gástrica contra agentes necrotizantes (TAHA *et al.*, 2012; HAJREZAIE *et al.*, 2012). Além disso, quando associado à produção de bicarbonato, pode desempenhar um papel significativo no processo de inibição de úlceras para proteger células recém formadas de contra lesões (MATSUI *et al.*, 2011).

5.3.2.3 Avaliação da participação do óxido nítrico e grupamentos sufridílicos

5.3.2.3.1 Avaliação da participação do óxido nítrico e grupamentos sufridílicos na capacidade gastroprotetora do EESm

O éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME) e N-etilmaleimida exacerbaram as lesões gástricas induzidas pelo etanol em 113,13 e 173,99%, respectivamente, em comparação com os efeitos nos grupos pré-tratados com solução de NaCl. EESm (100 mg/kg, v.o.) e carbenoxolona (100 mg/kg, v.o.) inibiram significativamente as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol absoluto, tanto na ausência quanto na presença L-NAME e NEM. Houve uma diferença significativa entre os grupos NaCl e EESm, L-NAME e EESm e NEM e EESm (Tabela 1), sugerindo que o efeito antiulcerogênico do EESm depende parcialmente da produção ou presença de compostos de ON e SH, que estão envolvidos na proteção da mucosa contra lesões nocivas. A Tabela 11 mostra que o tratamento com L-arginina reverteu significativamente o efeito deletério de L-NAME na mucosa gástrica.

Tabela 11: Efeito da administração oral de extrato etanólico das folhas de *Spondias mombin* (EESm) sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar pré-tratados com éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME, 70 mg/kg) ou N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg)

Pré-tratamento	Tratamento (p.o.)	Dose (mg/kg)	ALU (mm ²)	Inibição (%)
NaCl 0,9% (i.p.)	controle	-	56,68 ± 2,83	-
	carbenoxolona	100	5,40 ± 0,47***	90,47%
	EESm	100	32,80 ± 2,38***	42,13%
	L-arginina	200	320,30 ± 101,5***	+465,10%
L-NAME (i.p.)	controle	-	120,80 ± 3,33	-
	carbenoxolona	100	24,22 ± 1,01***	79,95%
	EESm	100	47,00 ± 2,59***	61,09%
	L-arginina	200	74,44 ± 12,80***	38,38%
NEM (i. p.)	controle	-	155,30 ± 9,8	-
	carbenoxolona	100	44,90 ± 3,15***	70,51%
	EESm	100	70,60 ± 3,93***	54,54%

Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. (n = 6-7). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, **** p < 0,0001.

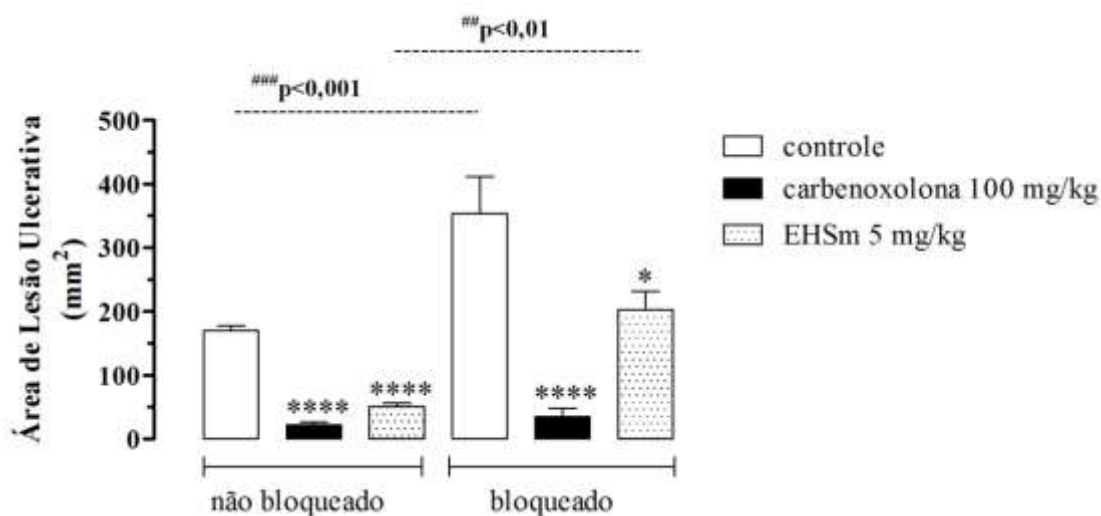
5.3.2.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico na capacidade gastroprotetora do EHSm

A administração do L-NAME exacerbou as lesões gástricas induzidas pelo etanol em 180,74%, em comparação com os efeitos nos grupos pré-tratados com solução de NaCl (116,8 ± 15,36). EHSm (100 mg/kg, v.o.) e carbenoxolona (100 mg/kg, v.o.) inibiram significativamente as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol absoluto, tanto na ausência

quanto na presença L-NAME. Houve uma diferença significativa entre os grupos NaCl e EHSm, L-NAME (Figura 24), sugerindo que o efeito antiulcerogênico do EHSm depende parcialmente da produção ou presença de óxido nítrico, que está envolvido na proteção da mucosa contra lesões nocivas. A Tabela 10 mostra que o tratamento com L-arginina reverteu significativamente o efeito deletério de L-NAME na mucosa gástrica

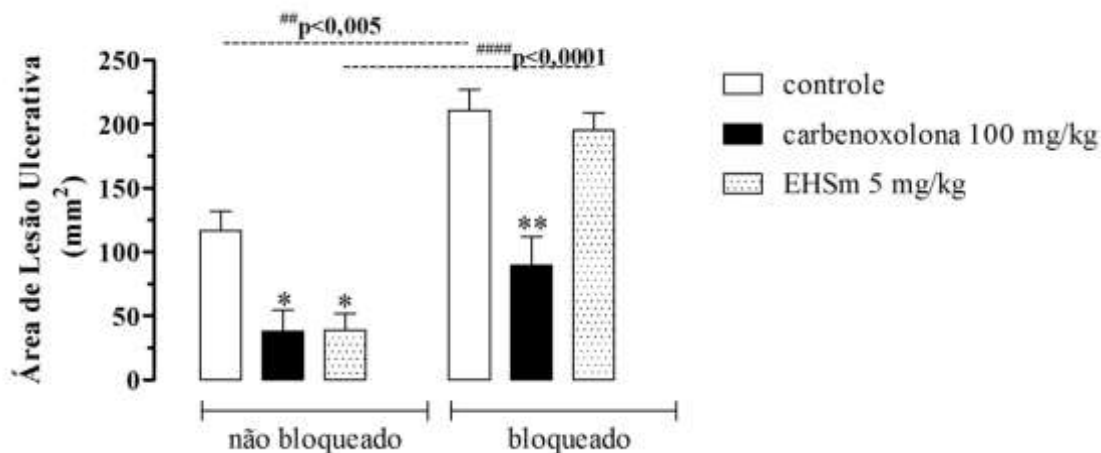
A administração do NEM exacerbou as lesões gástricas induzidas pelo etanol em 107,64% , em comparação com os efeitos nos grupos pré-tratados com solução de NaCl ($170,20 \pm 7,89 \text{ mm}^2$). EHSm (5 mg/kg, v.o.) inibiu significativamente as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol absoluto na presença e na ausência do NEM e a inibição foi diferente entre si, o que indica que o EHSm depende da presença de -SH para ter atividade gastroprotetora (Figura 25).

Figura 24-Efeito da administração oral do EHSm sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar, antes (não bloqueadas) e após tratamento (bloqueado) com L-NAME (70 mg/kg).



Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. (n = 6-8/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle controlado * p < 0,05, **** p < 0,0001 (ANOVA, seguido do teste de Dunnett). A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi determinada pelo teste de Sidak.

Figura 25- Efeito da administração oral do EHSm sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar, antes (não bloqueadas) e após tratamento (bloqueado) com NEM (10 mg/kg).

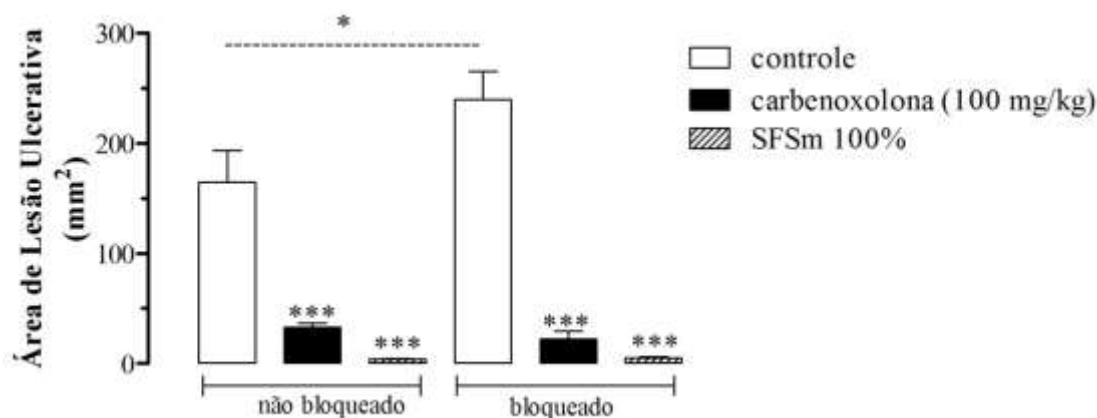


Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. ($n = 6$). Estatisticamente diferente do grupo controle controlado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA seguido do teste de Dunnett). A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi determinada pelo teste de Sidak.

5.3.2.3.3 Avaliação da participação do grupamento sulfidrílico na capacidade gastroprotetora do SFSm

A administração do NEM exacerbou as lesões gástricas induzidas pelo etanol em 45,38%, em comparação com os efeitos nos grupos pré-tratados com solução de NaCl 0,9% ($170,20 \pm 7,89 \text{ mm}^2$). SFSm (100%) inibiu significativamente as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol absoluto na presença na ausência do NEM não diferindo entre si. Esse resultado sugere que os grupamentos sulfidrílicos não estão envolvidos no como mecanismo de ação do SFSm (Figura 26).

Figura 26- Efeito da administração oral do SFSm sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar, antes (não bloqueadas) e após tratamento (bloqueado) com NEM (10 mg/kg).



Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. (n = 5-7). Estatisticamente diferente do grupo controle controlado, * p < 0,05, *** p < 0,001. ANOVA seguido do teste de teste de Tukey.

Os extratos etanólico e hexânico das folhas da espécie em estudo, mostraram que dependem da presença de grupamentos sulfidrilas no processo de gastroproteção. O sumo dos frutos não depende dos -SH já que a proteção gástrica em lesões ulcerativas induzidas pelo etanol absoluto do SFSm não diferiu entre si, tanto na ausência como na presença de NEM.

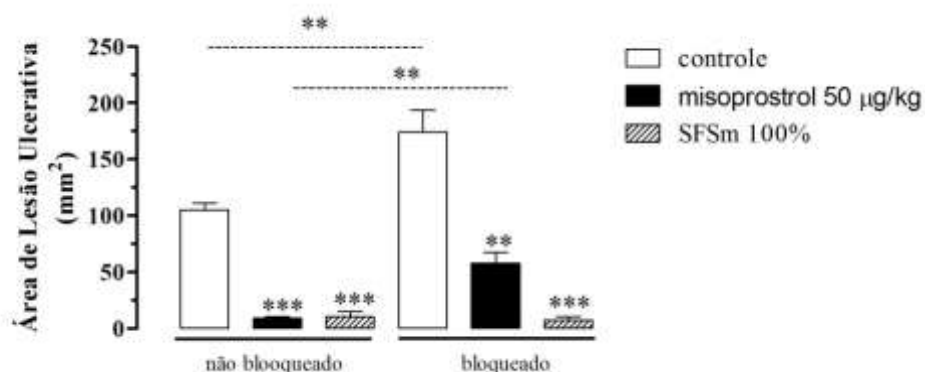
Os grupos SH são responsáveis por aumentar a produção e manutenção da estabilidade do muco, através das pontes de dissulfureto e envolvidos na manutenção da integridade gástrica, limitando assim a produção de radicais livres envolvidos em danos nos tecidos (CHANDRANATH *et al.*, 2002; CALDAS *et al.*, 2015). Suas concentrações relativamente altas indicam possíveis implicações na gastroproteção (ZAKARIA *et al.*, 2016; CALDAS *et al.*, 2015).

Os EESm e EHSm dependem também da presença do óxido nítrico no processo de gastroproteção. O óxido nítrico é considerado um dos agentes endógenos defensivos mais importantes na mucosa gástrica (EL-ABHAR, 2010). O NO tem um duplo papel na gastroproteção. Em altas concentrações, ele atua como um mediador pró-inflamatório (NWORU *et al.*, 2011) conforme observado L-arginina não bloqueada. No entanto, em concentrações mais baixas, L-arginina bloqueada, exerce aumento do fluxo sanguíneo e mantém a microcirculação gástrica. Esta observação com L-arginina também foi verificada em um estudo por (ALMEIDA *et al.*, 2011).

5.3.2.4 Avaliação da participação das PGs na capacidade gastroprotetora do SFSm

Os grupos indometacina/NaCl e indometacina / misoprostol exacerbaram lesões gástricas induzidas pelo etanol em 65,54% e 553,08%, respectivamente, quando comparados aos grupos pré-tratados com NaCl/NaCl e NaCl/misoprostol, respectivamente. O SFSm (100%) inibiu significativamente as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol absoluto, tanto na ausência quanto na presença de indometacina. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com NaCl/SFSm e indometacina/SFSm (Figura 27).

Figura 27- Efeito da administração oral do SFSm sobre lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar, antes (não bloqueadas) e após tratamento (bloqueado) com indometacina (30 mg/kg).



Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. ($n = 5-7$). Estatisticamente diferente do grupo controle controlado, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA seguido do teste de teste de Tukey

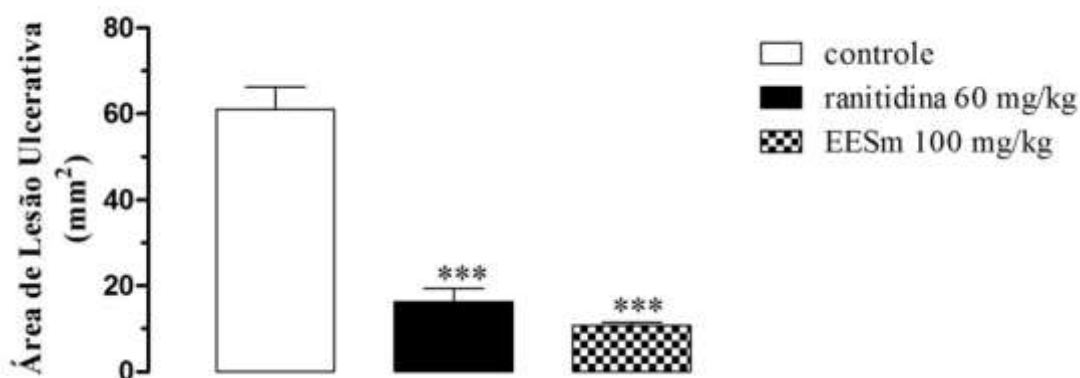
As prostaglandinas podem estar envolvidas no processo de gastroproteção por inibição da secreção ácida gástrica ou pelo aumento dos fatores protetores da mucosa gástrica, como estimulação da secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos de membrana (WALLACE, 2008).

5.3.3 Avaliação da capacidade cicatrizante gástrica

5.3.3.1 Avaliação da capacidade cicatrizante gástrica do EESm

O tratamento durante 14 dias consecutivos com EESm (100 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) diminuíram a área de úlcera crônica em 93,48 e 90,30%, respectivamente em comparação com o grupo controle ($61,00 \pm 1,98 \text{ mm}^2$), como mostrado na Figura 28. Nossos resultados também mostraram que o EESm acelerou a cicatrização de úlceras crônicas induzidas pelo ácido acético.

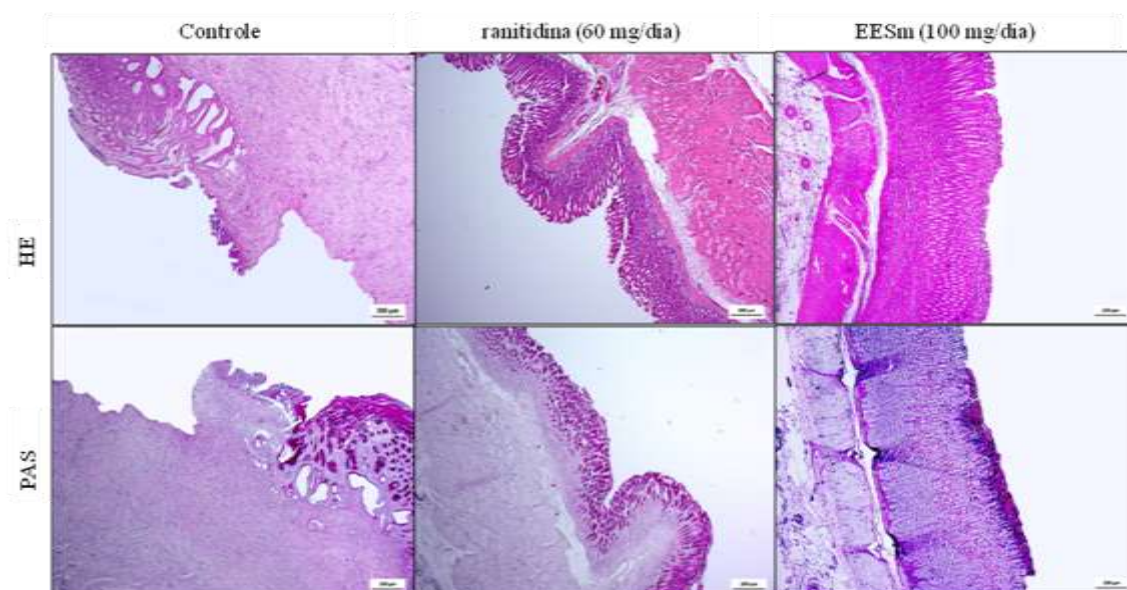
Figura 28-Efeito cicatrizante gástrico do EESm na mucosa gástrica em ratos.



Os resultados estão expressos em média $\pm$ E.P.M. ($n = 7/\text{grupo}$). Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de teste Tukey', *** $p < 0,001$.

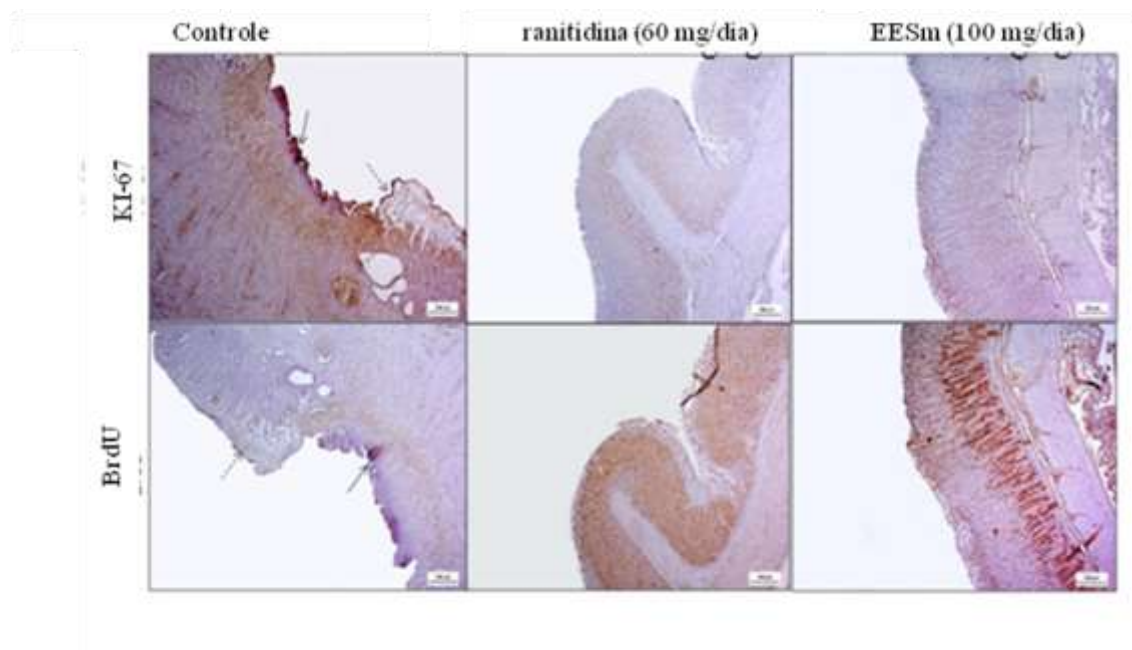
Na análise histológica dos estômagos, as marcações com HE revelaram úlceras bem definidas com destruição completa da camada mucosa e submucosa causada pelo ácido acético em animais do grupo controle. Os estômagos de ratos tratados por via oral com EESm (100 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) mostraram regeneração em comparação com os do grupo controle. A coloração PAS também mostrou aumento da produção de muco, observado através das áreas coradas intensamente rosa na camada epitelial da mucosa (Figura 29). Isso demonstra o envolvimento das células na liberação do muco, que protege a mucosa, como mostrado pelo tom intenso de rosa após a coloração PAS.

Figura 29- Fotomicrografias da mucosa gástrica coradas com HE e PAS dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado), a ausência da camada epitelial (área da úlcera interna) e a seta tracejada indica a camada epitelial restante (borda da úlcera). Hematoxilina/eosina (HE) e coloração com ácido periódico-Schiff (PAS), ampliação, 40x.



A análise imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais contra Ki-67 e BrdU mostrou forte reatividade de núcleos BrdU positivamente aumentados e reatividade moderada para Ki-67 na mucosa gástrica de animais tratados com EESm e ranitidina durante 14 dias, em comparação com os do grupo controle, que não mostrou reatividade para os dois marcadores devido à destruição da camada epitelial, como mostrado na Figura 30.

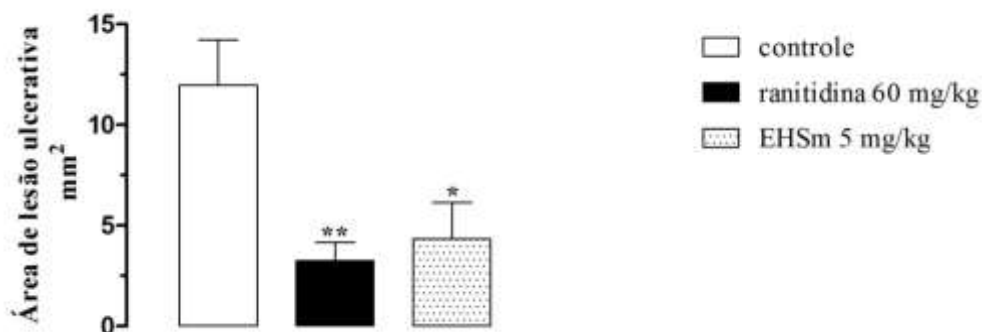
Figura 30- Análise imuno-histoquímica para Ki-67 e BrdU da mucosa gástrica dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado - LC), ranitidina (60 mg/kg) ou EESm (100 mg/kg) por 14 dias. A seta cheia indica a ausência da camada epitelial (área da úlcera interna) e a seta tracejada indica a camada epitelial restante (borda da úlcera). As microfotografias representam a imunorreatividade para Ki-67 e BrdU nos grupos, ampliação 200x.



5.3.3.2 Avaliação da capacidade cicatrizante gástrica do EHSm

O tratamento durante 14 dias consecutivos com EHSm (5 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) diminuíram a área de úlcera crônica em 63,74 e 72,81%, respectivamente em comparação com o grupo controle ($11,97 \pm 2,25 \text{ mm}^2$), como mostrado na Figura 31.

Figura. 31- Efeito do EHSm na cicatrização da mucosa gástrica em ratos Wistar.

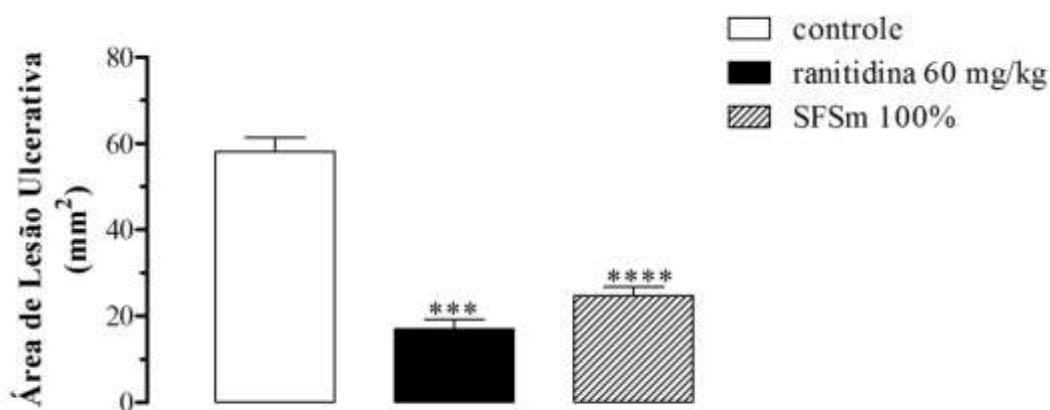


Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. (n = 6). Estatisticamente diferente do grupo de controle, * p < 0,05, ** p < 0,01 (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

5.3.3.3 Avaliação da capacidade cicatrizante gástrica do SFSm

O tratamento durante 14 dias consecutivos com SFSm (100%) e ranitidina (60 mg/kg) diminuíram a área de úlcera crônica em 57,34 e 70,65%, respectivamente em comparação com o grupo controle ($58,19 \pm 3,29 \text{ mm}^2$) como mostrado na Figura 32.

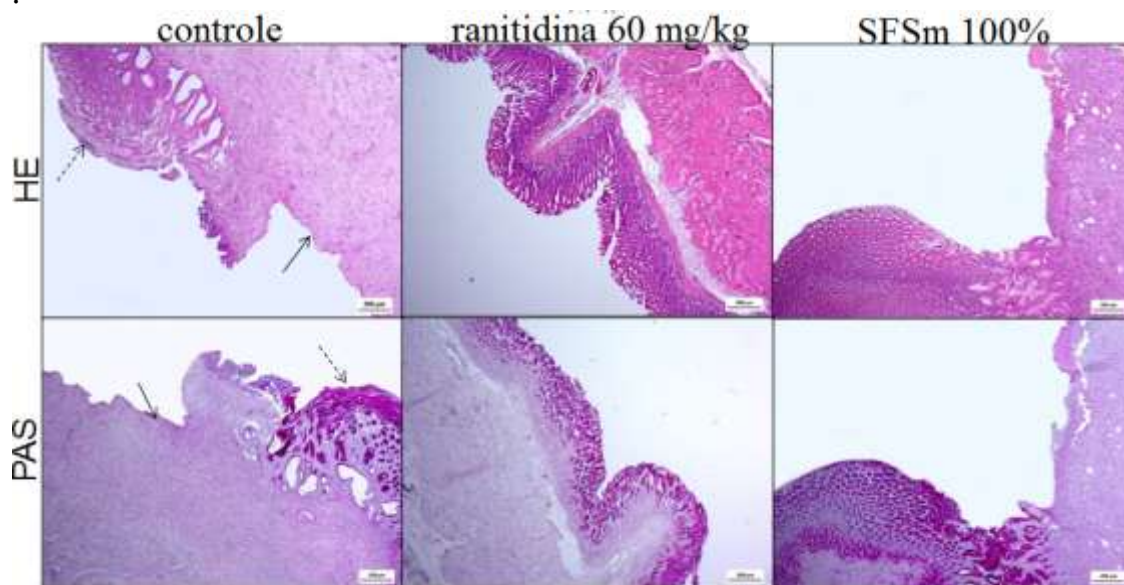
Figura 32- Efeito do SFSm na cicatrização da mucosa gástrica em ratos Wistar.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). Estatisticamente diferente do grupo de controle, *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

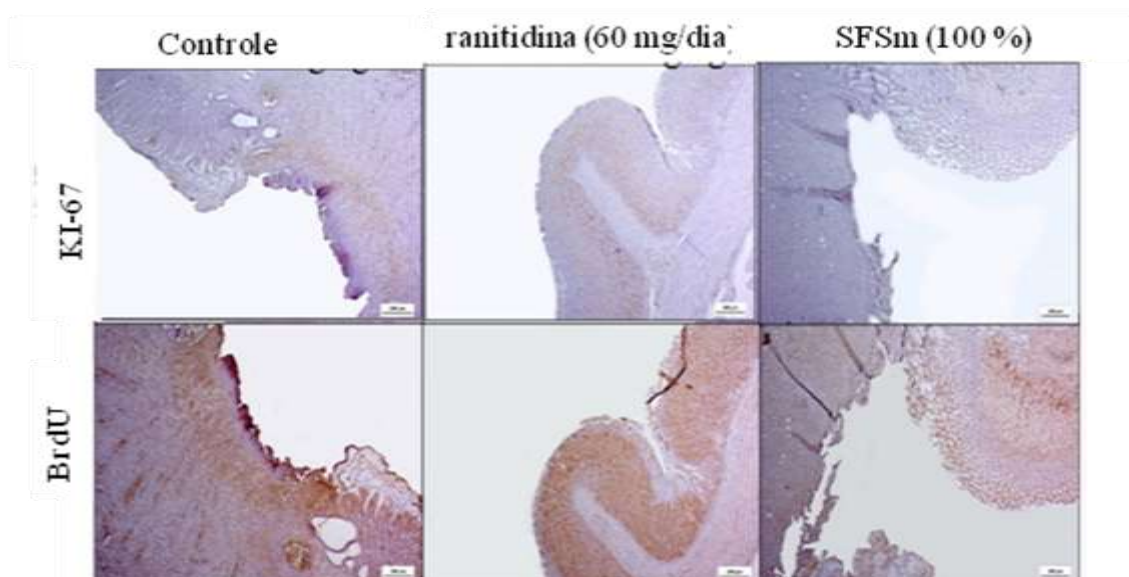
Por meio da análise histológica dos estômagos, foi possível verificar por coloração HE úlceras bem definidas com a destruição completa da camada mucosa e submucosa causada pelo ácido acético em animais do grupo controle. Os estômagos de ratos tratados por via oral com SFSm (10 mL/kg) e ranitidina (60 mg/kg) demonstraram uma regeneração da mucosa gástrica, como revelado pelo reaparecimento da camada epitelial quando comparado ao grupo controle. A coloração PAS também mostrou aumento da produção de muco, observado através das áreas intensamente coradas pela cor rosa na camada epitelial da mucosa (Figura 33).

Figura 33- Fotomicrografias da mucosa gástrica coradas com HE e PAS dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado), a ausência da camada epitelial (área da úlcera interna) e a seta tracejada indica a camada epitelial restante (borda da úlcera). Hematoxilina/eosina (HE) e coloração com ácido periódico-Schiff (PAS), ampliação, 40x.



A investigação imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais contra Ki-67 e BrdU mostrou uma forte reatividade para BrdU e reatividade moderada para Ki-67 (marcado com uma cor marrom avermelhada) na mucosa gástrica de animais tratados com SFSm e ranitidina durante 14 dias, quando comparado ao grupo controle, em que não houve reatividade para os dois marcadores devido à destruição da camada epitelial, como mostrado na Figura 34.

Figura 34- Análise imuno-histoquímica para Ki-67 e BrdU da mucosa gástrica dos ratos submetidos à indução de úlcera crônica em 30% de ácido acético. Os animais foram tratados oralmente com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado - LC), ranitidina (60 mg/kg) ou SFSm (100%) por 14 dias. A seta cheia indica a ausência da camada epitelial (área da úlcera interna) e a seta tracejada indica a camada epitelial restante (borda da úlcera). As microfotografias representam a imunorreatividade para Ki-67 e BrdU nos grupos, ampliação 200x.



A administração durante 14 dias dos extratos etanólico e hexânico das folhas e o sumo dos frutos de *S. mombin* em ratos com estômagos ulcerados por ácido acético foram capazes de cicatrizar as lesões.

Este modelo se assemelha bastante às úlceras pépticas humanas em termos de características patológicas, processo de cicatrização e ciclo de recorrência (OKABE e AMAGASE, 2005). Alguns trabalhos utilizando esse método foram capazes de avaliar a capacidade cicatrizante de medicamentos (NAKAO *et al.*, 2014) e materiais de fitoquímica antiulcerogenico (CALDAS *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017).

Fatores agressores endógenos, como secreção de HCl e pepsina, retardam a cicatrização de úlcera. A inibição desses fatores por drogas inibidoras de ácido (bloqueadores de H_2 e inibidores da bomba de prótons) é um dos principais componentes do tratamento de úlcera péptica (TARNAWSKI *et al.*, 1995).

Durante os 14 dias de tratamento, o EESm, EHSm, SFSm ou a ranitidina não produziram sinais visíveis de toxicidade.

A análise histológica foi realizada para os experimentos com EESm e FSm. Os estômagos com regiões coradas com HE revelam úlceras bem definidas com destruição completa da camada mucosa e submucosa causada pelo ácido acético (grupo controle). Os estômagos de ratos tratados por via oral com EESm (100 mg/kg), FFSm (100%) e ranitidina (60 mg/kg) mostraram regeneração em comparação com os do grupo controle. A coloração PAS nos estômagos tratados com EESm, SFSm e ranitidina também mostraram aumento da produção de muco, observado através das áreas coradas intensamente rosa na camada epitelial

da mucosa. Isso demonstra o envolvimento das células na liberação do muco, que protege a mucosa, como mostrado pelo tom intenso de rosa após a coloração PAS.

A análise imunohistológica foi realizada para os experimentos com EESm e SFSm. Nesta análise, foi utilizado o antígeno Ki-67 que é uma proteína de matriz nuclear que é expressa em células em proliferação durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não em células quiescentes (fase G0) (SCHOLZEN E GERDES, 2000). BrdU, um nucleósido sintético de timidina que é incorporado no DNA durante a fase S, é expresso em células que proliferam (DOLBEARE, 1995; JACKSON E POMBO, 1998). A proliferação celular desempenha um papel importante na cicatrização de feridas, e nossos resultados sugerem que o tratamento com a FAEE promoveu a regeneração das células gástricas. (CALDAS *et al.*, 2015) também observaram a capacidade antiulcerogênica de 1,8 cineol com expressão de Ki-67 e BrdU no processo de cicatrização gástrica.

5.4 ATIVIDADE ANTI- *HELICOBACTER PYLORI* DO EESM

O EESm mostrou atividade anti-*H. pylori* (CIM = 256 µg/mL) com $90,94 \pm 0,68\%$ de inibição do crescimento bacteriano. A amoxicilina (controle positivo) mostrou uma CIM <0,5 µg/mL.

A terapia contra *H. pylori* falha em mais de 20% dos casos de úlcera gástrica, principalmente devido à resistência antimicrobiana e à não adesão do paciente a continuidade do tratamento (Ayala *et al.*, 2014).

Alguns estudos descreveram a atividade antibiótica de produtos à base de plantas contra esta bactéria (STAMATIS *et al.*, 2003; ESCOBEDO-HINOJOSA *et al.*, 2012).

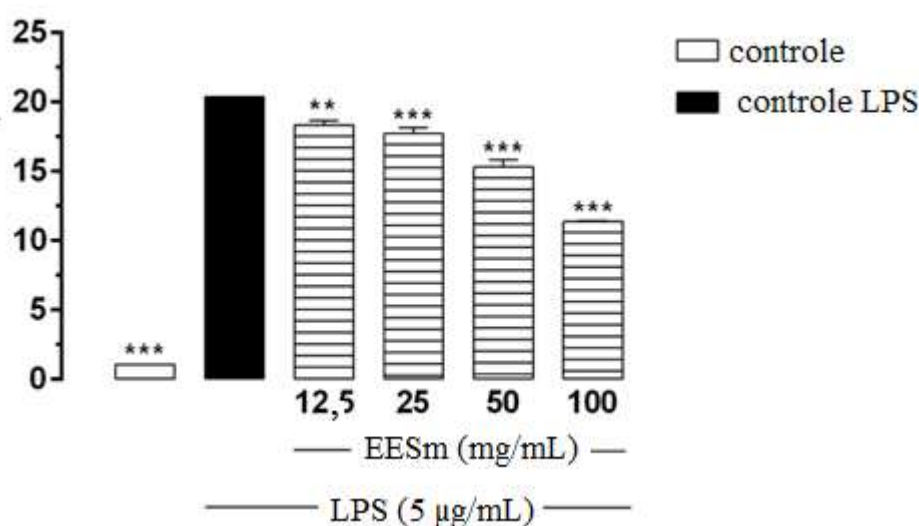
Em uma revisão de Ayala *et al.* relataram trabalhos que relacionaram algumas atividades farmacológicas como anti-secretoras, antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-hemorragicas e de ulcera gástrica de extratos de plantas com atividade anti-*H. pylori*.

H. pylori, infecta metade da população mundial e é reconhecida como a principal causa de gastrite crônica e úlceras pépticas (MALATY, 2007), induz infecção, inflamação e mudanças no microambiente gástrica. As células imunes hospedeiras, especialmente os neutrófilos e os macrófagos, liberam mediadores inflamatórios e grandes quantidades de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que estão relacionadas ao aumento do risco de câncer de estômago.

A capacidade de *H. pylori* para evitar a resposta imune leva à inflamação local persistente, o que, por sua vez, resulta em grandes quantidades de ROS e RNS sendo produzidos (ALLEN *et al.*, 2005).

O EESm não conseguiu atingir 50% de inibição da atividade de urease nas concentrações testadas. Nossos resultados revelaram que o EESm exerceu atividade imunossupressora na geração de NO estimulada por LPS com uma redução de aproximadamente 44,23% a uma concentração de 100 µg/mL (Figura 35).

Figura 35- Efeito do EESm na produção de LPS-induzir NO em macrófagos. As células aderentes (1×10^6) foram incubadas durante 24 h com extrato e LPS (5 mg/mL). As células incubadas apenas com LPS foram utilizadas como controle positivo e célula em meio de cultura (DMEM) como grupo controle. As concentrações de nitrito no meio foram determinadas utilizando o reagente de Griess. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle LPS. Cada valor representa a média $\pm$ S.E.M para três experimentos diferentes realizados em triplicado.



O envolvimento da *H. Pylori* no processo inflamatório foi realizado. Para isso, os macrófagos foram estimulados com LPS, que ativa as funções de macrófagos e estimula a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo a geração de NO e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (LASKIN, 2009). Como a maioria dos NO gerado é convertido imediatamente em nitritos, o nível de nitrito foi medido por meio de sobrenadantes de cultura de células após tratamento com EESm (12,5, 25, 50, 100 µg/mL) para investigar sua atividade anti-inflamatória, conforme indicado pela inibição do NO estimulado por LPS, implicando uma atividade anti-inflamatória neste extrato. A inibição do NO gerado pelo extrato testado pode ser devido a uma capacidade de eliminação direta de NO, uma inibição da via indutível

de óxido nítrico sintase (MATSUI *et al.* 2011), ou uma modulação de outros fatores na cascata de NO, como fatores de transcrição.

O EESm conseguiu inibir o crescimento de *H. pylori* em 90%. Também esteve envolvido em um dos mecanismos causadores subjacentes ao processo de infecção: aumento da produção de espécies reativas. *H. pylori* desencadeia a expressão e a atividade de iNOS em macrófagos, levando à produção de quantidades aumentadas de NO, que desempenha um papel importante na resposta imune da mucosa gástrica, causando inflamação e lesão local (WILSON *et al.*, 1996; BONACORSI *et al.*, 2009). Além disso, como o NO é mutagênico, o excesso de produção pode estar relacionado ao câncer de estômago relacionado à infecção por *H. pylori* (WILSON *et al.*, 1996).

Para investigar a capacidade do EESm de eliminar radicais livres, o extrato foi submetido a um ensaio de eliminação de NO, o que revelou que a atividade de eliminação induzida pelo EESm na sua concentração máxima (800 µg/mL) foi de 78,29%. Trolox (800 µg/mL), que foi usado como controle padrão, reduziu os radicais livres em 73,77% (Tabela 12).

Tabela 12. Percentagem de inibição induzida por EESm no ensaio de eliminação de ON •.

[] µg/mL	inibição (%)	
	EESm	Trolox
25	7,07 ± 2,01	30,20 ± 1,09
50	2,62 ± 3,04	63,98 ± 2,62
100	19,35 ± 6,87	74,22 ± 0,52
200	48,21 ± 4,11	70,70 ± 0,42
400	65,20 ± 2,26	70, 19 ± 0,38
800	78,29 ± 1,78	73,77 ± 1,58

As plantas e suas biomoléculas foram relatadas como alternativas aos antibióticos contra agentes que causam doença ao homem e que são resistentes aos medicamentos tradicionais devido à sua comprovada eficácia e disponibilidade (PARIMALA E SHOBA, 2014; WINTOLA E AFOLAYAN, 2015) contra mediadores importantes de processos provocadores responsáveis por doenças crônicas, como úlceras, inflamações e infecções

bacterianas (FAROOQUI *et al.*, 2015; ZAKARIA *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2016). Eles agem ajudando a parede celular e o DNA a reduzir e neutralizar espécies reativas como o NO gerado durante processos metabólicos normais (PARIMALA E SHOBA, 2014;)

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que:

- O extrato etanólico de *Spondias mombin* (EESm) tem como principais constituintes os ácidos gálico e elágico. O extrato hexânico de *Spondias mombin* (EHSm) tem como majoritários a rutina e a epicatequina. O sumo dos frutos de *Spondias mombin* (SFSm) tem como principais constituintes a epicatequina e a quercetina; O EESm demonstrou atividade antioxidante. O EESm, EHSm e o SFSm tiveram atividade antiulcerogênica em ratos nos modelos testados.
- O EESm demonstrou atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos testados;
- O EESm e o EHSm não demonstraram nenhum sinal de toxicidade na dose testada (2000 mg/kg);
- O EESm, EHSm e o SFSm são protetores gástricos em úlceras induzidas por etanol. O EESm e o SFSm também protegem a mucosa gástrica contra lesões induzidas por indometacina. O EESm é protetor da mucosa gástrica em lesões induzidas por etanol acidificado. Além disso, o EESm é capaz de estimular a produção de NO, grupamentos sulfidril e MDA e reduzir a concentração de TNF no processo ulcerogênico. A ação antiulcerogênica do EESm está relacionada aos seus compostos majoritários de forma isolada ou em associação.
- O EESm, EHSm e SFSm são antiulcerogênicos com mecanismo de ação anti secretor, O EESm e o EHSm dependem do grupos -SH e NO na gastroproteção. Além disso, o EESm estimula a produção de muco gástrico.
- O EESm, EHSm e SFSm são cicatrizantes gástricos. O EESm e o SFSm foram capazes de regenerar a mucosa gástrica (histologia e imunohistoquímica);
- O EESm tem ação anti-*Helicobacter pylori* com CIM = 256 µg/mL.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, S. I. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: Involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. **International immunopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 296-305, 2013. ISSN 1567-5769.
- ABO, K. A., OGUNLEYE, V. O., ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *cróton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v.13, p. 494-497, 1999.
- ACCIOLY, M. P. **Atividade leishmanicida *in vitro* de frações de *Spondias mombin* e *Musa paradisiaca* sobre *Leishmania chagasi*** - Fortaleza, 73p, 2009.
- ADEMOLA, I. O., FAGBEMI, B. O., IDOWU S. O. Anthelmintic activity of extract of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep, studies *in vitro* and *in vivo*. **Tropical Animal Health and Production**. V. 37 (3), p. 223 – 235, 2005.
- 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 (2), p. 444–451, 2010.
- AKUBUE P. I., MITTAL G. C., AGUWA C. N. Preliminary pharmacological study of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 53 – 63, 1983.
- ALI, B. H., ADHAM, S. A., AL ZA'ABI, M., WALY, M. I., YASIN, J., NEMMAR, A., SCHUPP, N. Ameliorative effect of chrysin on adenine-induced chronic kidney disease in rats. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0125285, 2015. ISSN 1932-6203.
- ALLEN, LAH, BEECHER, B.R., LYNCH, J.T., ROHNER, O.V. WITTINE, L.M. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce

extracellular superoxide release. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3658-3667, 2005. ISSN 0022-1767.

ALLIWELL, Barry. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, -, v. 97, n. -, p.1634-1658, 2006.

ALMEIDA, A. L. S., ALBUQUERQUE, U. P., CASTRO, C. C. Reproductive biology of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), na endemic fructiferous species of the caatinga (dry forest), under different management conditions in northeastern Brazil. **Journal of arid environments**, v. 75, p. 330-337, 2011.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., DOS SANTOS, R. J., GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β - caroteno/Ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p.446-452, abr. 2006.

ALMEIDA, M. M. B., DE SOUSA, P. H. M., ARRIAGA, Â. M. C., DO PRADO, G. M., DE CARVALHO MAGALHÃES, C. E., MAIA, G. A., DE LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011. ISSN 0963-9969.

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.

ALQASOUMI, S., AL-SOHAIBANI, M., AL-HOWIRINY, T., AL-YAHYA, M., & RAFATULLAH, S. Rocket “Eruca sativa”: A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 16, p. 1958, 2009.

AQUIOLA, E., GARCIA-GUERRA, P. & MONTIEL, L. A Úlcera Gastroduodenal. Rio de Janeiro, Glaxo do Brasil, 1987.

ALRASHDI, A. S., SALAMA, S. M., ALKIYUMI, S. S., ABDULLA, M. A., HADI, A. H. A., ABDELWAHAB, S. I., 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.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M., DEKANSKI, D., RISTIĆ, S., RADONJIĆ, N. V., PETRONIJEVIĆ, N. D., GIAMPIERI, F., QUILES, J. L. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25878, 2011. ISSN 1932-6203.

ANAND, K. V., JAABIR, M., SULTAN, M., THOMAS, P. A., GERALDINE, P. Protective role of chrysin against oxidative stress in d- galactose- induced aging in an experimental rat model. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 12, n. 4, p. 741-750, 2012. ISSN 1447-0594.

ANTONISAMY, P., DURAIPANDIYAN, V., ARAVINTHAN, A., AL-DHABI, N. A., IGNACIMUTHU, S., CHOI, K. C., & KIM, J. H. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 167-175, 2015. ISSN 0014-2999.

AOLOYE, A. Hormonal variation in gravid does after oral treatment with crude ethanol extract of *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v. 6, p.56-60, 2013.

ASUQUO, O R. Antigonadotrophic effect of *Spondias mombim* leaf extract in male rats. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcar**, v. 2, p.14-18, 2012.

ASUQUO, O R. Histomorphological study of the anti-fertility effect of *Spondias mombim* L. in adult male rats. **Journal of Pharmacy And Biological Sciences**, v. 3, p.29-34, 2012.

ASUQUO, O. R., FISCHER, C. E., MESEMBE, O. E., IGIRI, A. O., EKOM, J. I. Comparative Study of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Spondias mombim* on

neurobehaviour in male rats. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 5, p. 29-35, 2013.

AYALA, G., ESCOBEDO-HINOJOSA, W. I., DE LA CRUZ-HERRERA, C. F., ROMERO, I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 6, p. 1450, 2014.

AYOKA, A. O., AKOMOLAFE, R. O., IWALEWA, E. O., AKANMU, M. A., UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L.(Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 166-175, 2006. ISSN 0378-8741.

AYOKA, A. O., AKOMOLAFE, R. O., AKINSOMISOYE, O. S., UKPONMWAN, O. E. Medicinal and Economic Value of *Spondias mombin*. **African Journal of Biomedical Research**, V. 11, p. 129 – 136, 2008.

AYOKA, A. O., OWOLABI, R. A., BAMITALE, S. K., AKOMOLAFE, R. O., ALADESANMI, J. A., UKPONMWAN, E. O. Effect of fractionated extracts and isolated pure compounds of *spondias mombin* (l. *Anacardiaceae*) leaves on novelty-induced rearing and grooming behaviours in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, V. 10(5), p. 244-255, 2013.

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, p. 499–571, 2009.

BAGGIO, C. F, DA- SILVA, C. H , SANTOS JE, RIECK L, DE MORAES SANTOS CA, JUNIOR CC, MING LC, CORTEZ DAG, Marques M.C Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sci** v.74:p. 1167-1179., 2004

BAIUBOL, P., KUNANUSORN, P., KHONSUNG, P., CHIRANTHANUT, N., PANTHONG, A., RUJJANAWATE, C. Gastroprotective activity of the rhizome ethanol

extract of *Zingiber simaoense* YY Qian in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 571-576, 2016. ISSN 0378-8741.

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. ISSN 0378-8741.

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.

BARROS, L.M. Botânica, origem e distribuição geográfica. In *Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção* (J.P.P. Araújo & V.V. Silva, orgs.). Embrapa/CNPAT, Fortaleza, p.55-71, 1995.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. v. 2. Imprensa Universitária, Viçosa, 1978. **Biochemical Systematics and Ecology**. Amsterdam: Elsevier, 1992.

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**, vol. 239, no. 1, pp. 70– 76, 1996.

BHATTACHARYYA, A., CHATTOPADHYAY, R., MITRA, S., & CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological reviews**, v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014. ISSN 0031-9333.

BLOIS M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199–1200, 1958.

BONACORSI, C., RADDI, M. S. G., CARLOS, I. Z., SANNOMIYA, M., & VILEGAS, W. Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied.(Malpighiaceae). **BMC complementary and alternative medicine**, v. 9, n. 1, p. 2, 2009. ISSN 1472-6882.

BORA, K., MIGUEL, O. G., ANDRADE, C. A., & DE OLIVEIRA, A. O. T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Visão Academ**, v. 6, p.6-15, 2005.

BORA, P. S., NARAIN, N., HOLSCHUH, H. J., VASCONCELOS, M. A. D. S. Changes in physical and chemical composition during maturation of yellow mombin (*Spondias mombin*) fruits. **Food Chemistry**, v. 41, p. 341-348, 1991.

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, p. 49-52, 2007.-

BRASSEUR & ANGENOT. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate d'aminoethanol -PEG 400. **Journal Chromatography**, v. 351, p.351-355. 1986.

BRUNTON, L. L. In Goodman The Pharmacological Basis of Therapeutic's, Hardman, J. G., Limberd, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Goodman, A. G., Eds., 10th ed., McGraw-Hill: New York, 2001, pp 1006–1019.

CABRAL, B., SIQUEIRA, E., BITENCOURT, M. A., LIMA, M. C., LIMA, A. K., ORTMANN, C. F., REGINATTO, F. H. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 304-311, 2016. ISSN 0102-695X.

CALAM, J., BARON, J. ABC of the upper gastrointestinal tract: Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **BMJ: British Medical Journal**, v. 323, n. 7319, p. 980, 2001.

CALDAS, G. F. R., DA SILVA OLIVEIRA, A. R., ARAÚJO, A. V., QUIXABEIRA, D. C. A., DA COSTA SILVA-NETO, J., COSTA-SILVA, J. H., WANDERLEY, A. G. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil of *Hyptis martiusii* Benth.(Lamiaceae). **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e84400, 2014. ISSN 1932-6203.

CALDAS, G. F. R., DA SILVA OLIVEIRA, A. R., ARAÚJO, A. V., LAFAYETTE, S. S. L., ALBUQUERQUE, G. S., DA COSTA SILVA-NETO, J., WANDERLEY, A. G. Gastroprotective mechanisms of the monoterpene 1, 8-cineole (eucalyptol). **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134558, 2015. ISSN 1932-6203.

CALDAS, GERMANA FREIRE ROCHA. **Efeito gastroprotetor e segurança de uso do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* benth. (lamiaceae) e do monoterpeneo 1,8-cineol.** 2013. 176 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, 2013

CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHANDRANATH, S., BASTAKI, S., 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 and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 3, p. 173-180, 2002. ISSN 1440-1681.

CHEY, William D. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 102, p.1808-1825, 2007.

CHUKWUKA, N, ISEK, T. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. **African Health Sciences**, v. 8, p.163-167, set. 2008.

CORRÊA, M. Pio. **Diccionario das Plantas Uteis no Brasil**. Imprensa Nacional, 1926.

CORREIA, S. J., DAVID, J. D., DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Quimica Nova**, v. 29, No. 6, p. 1287-1300, 2006

CORTHOUT J., PIETERS L. A., CLAEYS M., VANDEN, B. D. A., VILETINCK, A. J. Antibacterial and molluscicidal phenolic acid from *Spondias mombin*. **Planta Medica**. V. 60, p. 460 – 463, 1994.

CORTHOUT, J., PIETERS L. A., CLAEYS, M., VANDEN, B. D. A., VILETINCK, A. J. Antiviral Caffeoylesters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 31, n° 79, 1992.

CRUZ, M. P., ANDRADE, C. M., SILVA, K. O., DE SOUZA, E. P., YATSUDA, R., MARQUES, L. M., CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and flavones isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0150839, 2016. ISSN 1932-6203.

DA SILVA, A. R. A., DE MORAIS, S. M., MENDES MARQUES, M. M., DE OLIVEIRA, D. F., BARROS, C. C., DE ALMEIDA, R. R., GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 2012. ISSN 1388-0209.

DE ALBUQUERQUE, U. P., DE MEDEIROS, P. M., DE ALMEIDA, A. L. S., MONTEIRO, J. M., NETO, E. M. D. F. L., DE MELO, J. G., & DOS SANTOS, J.

P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007. ISSN 0378-8741.

DE ALMEIDA, C. L. F., BRITO, S. A., DE SANTANA, T. I., COSTA, H. B. A., DE CARVALHO JÚNIOR, C. H. R., DA SILVA, M. V., Wanderley, A. G., DA SILVA, T. G. *Spondias purpurea* L.(Anacardiaceae): Antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017. ISSN 1942-0900.

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

DOLBEARE, F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. **The Histochemical Journal**, v. 27, n. 5, p. 339-369, 1995. ISSN 0018-2214.

DUTRA, R. L. T., DANTAS, A. M., DE ARAÚJO MARQUES, D., BATISTA, J. D. F., DE ALBUQUERQUE MEIRELES, B. R. L., DE MAGALHÃES CORDEIRO, Â. M. T., BORGES, G. D. S. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650-657, 2017. ISSN 0963-9969.

EL-ABHAR, H. S. Coenzyme Q10: A novel gastroprotective effect via modulation of vascular permeability, prostaglandin E2, nitric oxide and redox status in indomethacin-induced gastric ulcer model. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n. 1-3, p. 314-319, 2010. ISSN 0014-2999.

ELUFIOYE, T. O., OBUOTOR, E. M., AGBEDAHUNSI, J. M., ADESANYA, S. Anticholinesterase constituents from the leaves of *Spondias mombin* L.(Anacardiaceae). **Biologics: targets & therapy**, v. 11, p. 107, 2017.

ESCOBEDO-HINOJOSA, W. I., DEL CARPIO, J. D., PALACIOS-ESPINOSA, J. F., ROMERO, I. Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori*

knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 363-371, 2012. ISSN 0378-8741.

ESPINDOLA, P. P. D. T., ROCHA, P. D. S. D., CAROLLO, C. A., SCHMITZ, W. O., PEREIRA, Z. V., VIEIRA, M. D. C., DE PICOLI SOUZA, K. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2016, 2016. ISSN 1942-0900.

FAROOQUI, A., KHAN, A., BORGHETTO, I., KAZMI, S. U., RUBINO, S., PAGLIETTI, B. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0118431, 2015. ISSN 1932-6203.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, 2015.

FRANKE, A., TEYSSEN, S., SINGER, M. V. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. **Digestive Diseases**, v. 23, n. 3-4, p. 204-213, 2005. ISSN 0257-2753.

GASPARETTO, M., PESCARIN, M., GUARISO, G. *Helicobacter pylori* eradication therapy: current availabilities. **Gastroenterology**, v. 2012, 2012.

GEY, K. F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health: A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. **Biofactors**, Oxford, v. 7, p.113-174, 1998

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

GUPTA, P. C., RAO, C. V. Gastroprotective effect of standardized leaf extract from *Careya arborea* on experimental gastric ulcers in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 8, p. 1003-1008, 2014. ISSN 1388-0209.

HAJREZAIE, M., GOLBABAPOUR, S., HASSANDARVISH, P., GWARAM, N. S., HADI, A. H. A., ALI, H.M., ABDULLA, M. A. Acute toxicity and gastroprotection studies of a new schiff base derived copper (II) complex against ethanol-induced acute gastric lesions in rats. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51537, 2012. ISSN 1932-6203.

HALLAS, J., DALL, M., ANDRIES, A., ANDERSEN, B. S., AAALUKKE, C., HANSEN, J. M., ANDERSEN, M., LASSEN, A. T. Use of single and combined antithrombotic therapy and risk of serious upper gastrointestinal bleeding: population based case-control study. **Ugeskrift for Laeger**, v. 169, p.1577–1579, 2006.

HAMANO, P. S., MERCADANTE, A. Z. Composition of Carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). **Journal of food composition and analysis**, v. 14, p. 335-343, 2001.

HAMILTON, W. J. **Tratado de anatomia humana**. 2a ed. Rio de Janeiro:

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods*. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall, 1998

HAVSTEEN, BENT H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p.67– 202, 2002.

HOUGHTON, P. J., MENSAH, A. Y., IESSA, N., & HONG, L. Y. Terpenoids in Buddleja: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. **Phytochemistry**, v. 64, p.385-393, set. 2003.

HU, X. T., DING, C., ZHOU, N., & XU, C. Quercetin protects gastric epithelial cell from oxidative damage in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 754, p. 115-124, 2015. ISSN 0014-2999.

IGWE, C U. Evaluation of the antioxidant activity of African plants: Activity of the aqueous leaf extract of *Spondias mombin* Linn. **Journal of Research in Pharmacology**, v. 1, p.1-9, 2012.

ISMAIL, I. F., GOLBABAPOUR, S., HASSANDARVISH, P., HAJREZAIE, M., ABDUL MAJID, N., KADIR, F. A., ABDULLA, M. A. Gastroprotective activity of *Polygonum chinense* aqueous leaf extract on ethanol-induced hemorrhagic mucosal lesions in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. ISSN 1741-427X.

ITOKAWA, Y. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.35, p.16-20, 1987.

JACKSON, D. A., POMBO, A. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 6, p. 1285-1295, 1998. ISSN 0021-9525.

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.

Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://flora.dobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 13 Fev. 2018.

JORGE, E. C., BORGES, S. V., DE CASTRO, F. T., AMORIM, E., LUCHESE, R.,CAVALCANTI, N. B. Preservation of “umbu” (*Spondias tuberosa* arruda câmara) pulp in the green stage of maturation by combined methods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 31, p. 286-297, 2007.

KA, A. B. O., V. O., OQUNLEYE, J. S., ASHID I. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, p.494-497, set. 1999.

KAGAN, V. E., GLEISS, B., TYURINA, Y. Y., TYURIN, V. A., ELENSTRÖM-MAGNUSSON, C., LIU, S. X., FADEEL, B. A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 487-499, 2002.

KESHINRO O. O. The unconventional sources of ascorbic acid in the tropics. **Nutrition Report International**. V.31, p. 381 – 387, 1985.

KUSKOSKI, E. Marta, ASUERO, Agustín G., TRONCOSO, Ana M. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p.726-732, 2005.

KUSKOSKI, E.M., ASUERO, G.A., TRONCOSO, A. M., MANCINI-FILHO, J., FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LASKIN, D. L. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. **Chemical research in toxicology**, v. 22, n. 8, p. 1376-1385, 2009. ISSN 0893-228X.

LEE, P.-J., CHEN, S. Effect of adding ball-milled achenes to must on bioactive compounds and antioxidant activities in fruit wine. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 3, p. 1551-1560, 2016. ISSN 0022-1155.

LEMO, 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. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**v. 280, p. 159-68,2014.

LEMO, 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 Chem. 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, W., WANG, X., ZHI, W., ZHANG, H., HE, Z., WANG, Y., ZHANG, X. The gastroprotective effect of nobiletin against ethanol-induced acute gastric lesions in mice: impact on oxidative stress and inflammation. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 39, n. 6, p. 354-363, 2017. ISSN 0892-3973.

LIMA, E. D. P. A., LIMA, C. D. A., ALDRIGUE, M. L., GONDIM, P. J. S. Caracterização física e química dos frutos da umbu-cajazeira (*Spondias spp*) em cinco estádios de maturação, da polpa congelada e néctar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 338-343, 2002.

LU, Y., CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 5, p. 723-738, 2008. ISSN 0891-5849.

MALATY, H. M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 21, n. 2, p. 205-214, 2007. ISSN 1521-6918.

MALFERTHEINER, P., CHAN, F. K., MCCOLL, K. E. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 374, n. 9699, p. 1449-61, Oct 24 2009. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683340>>.

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

MATON, P.N., BURTON, M.E. Antacids revisited: a review of their clinical pharmacology and recommended therapeutic use. **Drugs**, v.57, p.855–870, 1999.

MATSUDA, H., LI, Y., YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. PL27-PL32, 1999. ISSN 0024-3205.

MATSUI, H., SHIMOKAWA, O., KANEKO, T., NAGANO, Y., RAI, K., HYODO, I. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries

in stomach and small intestine. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 2, p. 107-111, 2011. ISSN 0912-0009.

MENSOR, L. L., MENEZES, F. S., LEITÃO, G. G., REIS, A. S., DOS SANTOS, T. C., COUBE, C. S., LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

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

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.

MIZUSHIMA, N., LEVINE, B. Autophagy in mammalian development and differentiation. **Nature Cell Biology**, v. 12, p.223-230, set. 2010.

MORIMOTO, Y., SHIMOHARA, K., OSHIMA, S., SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 495-505, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. ISSN 0022-1759.

MURAKAMI, S., ISOBE, Y., KIJIMA, H., NAGAI, H., MURAMATU, M., & OTOMO, S. Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase and acid secretion by ellagic acid. **Planta Medica**, v. 57, n. 04, p. 305-308, 1991. ISSN 0032-0943.

MURAKAMI, S., MURAMATSU, M., OTOMO, S. Gastric H⁺, K⁺-ATPase inhibition by catechins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, n. 11, p. 926-928, 1992. ISSN 2042-7158.

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. ISSN 0163-2116.

NAKAO, K.-I., RO, A., KIBAYASHI, K. Evaluation of the morphological changes of gastric mucosa induced by a low concentration of acetic acid using a rat model. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 22, p. 99-106, 2014. ISSN 1752-928X.

NAKASHITA, M., SUZUKI, H., MIURA, S., TAKI, T., UEHARA, K., MIZUSHIMA, T., 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. ISSN 0163-2116.

NDAMBA, J, LEMMICH, e, MØLGAARD, P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. **Phytochemistry**, v. 35, p.95-99, jan. 1994.

NIV, Y., BANIĆ, M. Gastric barrier function and toxic damage. **Digestive Diseases**, v. 32, n. 3, p. 235-242, 2014. ISSN 0257-2753.

NJOKU, P. C., AKUMEFALA, M. I. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias Mombin* Leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**. V. 6, 613-615, 2007.

NWORU, C. S., AKAH, P. A., OKOYE, F.B., TOUKAM, D. K., UDEH, J. ESIMONE, C. O. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- α and nitric oxide (NO). **Journal of immunotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 10-16, 2011. ISSN 1547-691X.

ODUM, L., PETERSEN, H. D., ANDERSEN, I. B., HANSEN, B. F. & REHFELD, J. F. Gastrin and somatostatin in *Helicobacter pylori* infected antral mucosa. **Journal of the British Society of Gastroenterology**, v. 35, p. 615- 618, 1994.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. *Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*. Guideline: 423. <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDGL423.pdf>. Acesso em março de 2015.

OFFIAH V. N., ANYANWU I. I. Abortifacient activity of an aqueous extract of *Spondias mombin* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, p. 317 – 320, 1989.

OFFIAH, V. N., ANYANWU, I. I. ABORTIFACIENT ACTIVITY OF AN AQUEOUS EXTRACT OF SPONDIAS MOMBIN LEAVES. **Journal of Ethnopharmacology**, Nsukka, v. 26, p.317-320, 1989.

OHKAWA, HIROSHI, OHISHI, NOBUKO, YAGI, KUNIO. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OKABE, S., AMAGASE, 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. ISSN 0918-6158.

OKWUOSA, O. M., CHUKWURA, E. I., CHUKWUMA, G. O., OKWUOSA, C. N., ENWEANI, I. B., AGBAKOBA, N. R., UMEDUM, C. U. Phytochemical and antifungal activities of *Uvaria chamae* leaves and roots, *Spondias mombin* leaves and bark and *Combretum racemosum* leaves. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 41, p. 99-103, 2012. ISSN 0309-3913.

OLADIMEJI, A. O., ALIYU, M. B., OGUNDAJO, A. L., BABATUNDE, O., ADENIRAN, O. I., BALOGUN, O. S. Identification and comparison of the volatile constituents of fresh and dried leaves of *Spondias mombin* found in North-central Nigeria: in vitro evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2674-2678, 2016. ISSN 1388-0209.

OLUFUNKE OLA-DAVIES, O.S. AJANI, M.O .OYEYEMI AND S. EKUNDAYO. Testicular and Epididymal Parameters of *Spondia mombin*. L. (Anacardiaceae) Protected Male Wistar Rats Exposed to Sodium Arsenite. **Global Veterinaria**, v 12 (2), p. 232-236, 2014.

OLUWASOLA, A. O., OLA, S. O., SALIU, L., & SOLANKE, T. F. Helicobacter pylori infection in South Nigerians: a serological study of dyspeptic patients and healthy individuals. **West African journal of medicine**, v. 21, n. 2, p. 138-141, 2002.

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

PARIMALA, M., SHOBA, F. G. In vitro antimicrobial activity and HPTLC analysis of hydroalcoholic seed extract of *Nymphaea nouchali* Burm. f. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 361, 2014. ISSN 1472-6882.

PARSONS, M.E, GANELLIN, C.R, Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147(Suppl 1):S127– S135, 2006.

PIETRO, P., M, Pineda, M, Aguilar. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, -, v. 269, n. -, p.337-341, 1999.

PLANTAMED:

http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Spondias_mombin.htm Disponível em 28 de março de 2015.

POLJSAK, B., ŠUPUT, D., MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013. ISSN 1942-0900.

PRABHA, T., DORABABU, M., GOEL, S., AGARWAL, P. K., SINGH, A., JOSHI, V. K., GOEL, R. K. Effect of methanolic extract of *Pongamia pinnata* Linn seed on gastro-duodenal ulceration and mucosal offensive and defensive factors in rats. 2009. ISSN 0975-1009.

PRANCE, G.T., SILVA, M. F. Árvores de Manaus: INPA, p. 312, 1975.

RANTALA, I., PARONEN, I., KAINULAINEN, H. & ALA- KAILA, K. Enterocromaffin cell density in the gastric mucosa of patients with chronic renal failure. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 104, p. 362-366, 1996.

.

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 & Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999

REBAYA, Ahlem, BELGHITH, Souad Iguel, BAGHDIKIAN, Béatrice. 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.

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

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

ROSS, D., MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGOPELFREY, C. (Ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. **Boca Raton: CRC Press**, 1991, p.151-170.

ROZZA, A. L., HIRUMA-LIMA, C. A., TANIMOTO, A., & PELLIZZON, C. H. Morphologic and pharmacological investigations in the epicatechin gastroprotective effect.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2012, 2012. ISSN 1741-427X.

RUJJANAWATE, C., KANJANAPOTHI, D., AMORNLERDPISON, D., & POJANAGAROON, S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 120-122, 2005. ISSN 0378-8741.

RAMALHO, S. A., GUALBERTO, N. C., NETA, M. T. S. L., BATISTA, R. A., ARAÚJO, S. M., DA SILVEIRA MOREIRA, J. D. J., & NARAIN, N. Catechin and Epicatechin contents in wines obtained from Brazilian exotic tropical fruits. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 05, p. 449, 2014.

SINGH, A., BHAT, T. K., & SHARMA, O. P. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. J Clinic Toxicol S4: 001. doi: 10.4172/2161-0495. S4-001 J Clinic Toxicol Clinical Pharmacology: Research & Trials ISSN: 2161-0495 JCT, an open access journal. **vitro Systems**, 2011.

RAFATULLAH, S., TARIQ, M., AL-YAHYA, M. A., MOSSA, J. S E AGEEL, A.M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 25-34, 1990. ISSN 0378-8741.

SABIU, S., GARUBA, T., SUNMONU, T., AJANI, E., SULYMAN, A., NURAIN, I. E BALOGUN, A. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: Protective roles of *Spondias mombin* and *Ficus exasperata*. **Toxicology Reports**, v. 2, p.261-267, 2015.

SACRAMENTO, C. K., SOUZA, F. X. de. **Cajá** (*Spondias mombin* L.). Jaboticabal: FUNEP, p. 42, 2000 (Frutas Nativas).

SAHEED, S., OLATUNDE TAOFIK, S., OLADIPO, A. E., TOM, O., ANOFI, A. *Spondias mombin* L.(Anacardiaceae) enhances detoxification of hepatic and macromolecular oxidants in acetaminophen-intoxicated rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 30, n. 6, 2017

SAIRAM, K., RAO, CH. V., DORA BABU, M., KUMAR, K. V., AGRAWAL, V. K., GOEL, R. K. Antiulceratogenic effect of methanolic extract of *Emblica officinallis*: experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p. 1–9, 2002.

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. ISSN 0009-2797.

SAMEH, S., AL-SAYED, E., LABIB, R. M., SINGAB, A. N.. Genus Spondias: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

SANKEY, E. A., HELLIWELL, P. A. & DHILLON, A. P. Immunostaining of antral gastrin cells is quantitatively increased in helicobacter pylori gastritis. **Histopathology**, v. 16, p. 151-155, 1990.

SANTOS, M. B. D. U., CARDOSO, R. L., FONSECA, A. A. D. O., & CONCEIÇÃO, M. D. N. U. Caracterização e qualidade de frutos de umbu-cajá (*Spondias tuberosa* X *S. mombin*) provenientes do recôncavo sul da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1089-1097, 2010.

SAVARINO, V., DULBECCO, P., DE BORTOLI, N., OTTONELLO, A., SAVARINO, E. The appropriate use of proton pump inhibitors (PPIs): Need for a reappraisal. **European Journal of Internal Medicine**, v. 37, p. 19-24, 2017. ISSN 0953-6205.

SCHMIDT, R. J., EVANS, F. J., Skin irritant effects of esters of phorbol and related polyols. **Arch Toxicol**. V.44(4), p. 279-89, 1980.

SCHOLZEN, T., GERDES, J. The Ki- 67 protein: from the known and the unknown. **Journal of cellular physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000. ISSN 1097-4652.

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

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.

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.

SILVA, A. R. A., MORAIS, S. M., MARQUES, M. M. M., LIMA, D. M., SANTOS, S. C. C., ALMEIDA, R. R. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 406–413, 2011. ISSN 1678-9199.

SILVA, A. R. A., MORAES S. M., MARQUES, M. M. M., OLIVEIRA, D. F., BARROS, C. C., ALMEIDA, R. R., VIEIRA, I. G. P., GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50(6), p. 740–746, 2012.

SILVA, F. A. M., BORGES, M. F. M., FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVA, F. V. G., SILVA, S. M., SILVA, G. C., MENDONÇA, R. M. N., ALVES, R. E., DANTAS, A. L. Bioactive compounds and antioxidant activity in fruits of clone and ungrafted genotypes of yellow mombin tree. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2012.

SINGH, D. P., BORSE, S. P., NIVSARKAR, M. Co-administration of quercetin with pantoprazole sodium prevents NSAID-induced severe gastroenteropathic damage efficiently: Evidence from a preclinical study in rats. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 69, n. 1, p. 17–26, 2017. ISSN 0940-2993.

SMIT, M.J, LEURS, R, ALEWIJNSE, A.E. Inverse agonism of histamine H₂ antagonist accounts for upregulation of spontaneously active histamine H₂ receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 25, p.6802–6807, 1996.

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

STAMATIS, G., KYRIAZOPOULOS, P., GOLEGOU, S., BASAYIANNIS, A., SKALTSAS, S., SKALTSA, H. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 175-179, 2003. ISSN 0378-8741.

STEWART, D. J., ACKROYD, R. Peptic ulcers and their complications. **Surgery: Esophagus & Stomach**, v. 26, n. 11, p. 452–457, 2008.

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.

TAHA, M. M. E., SALGA, M. S., ALI, H. M., ABDULLA, M. A., ABDELWAHAB, S. I., & HADI, A. H. A. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 273-281, 2012. ISSN 0378-8741.

TAKAGI, K., OKABE, S., SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 418-426, 1969. ISSN 0021-5198.

TANAKA, T., KAWASE, M., TANI, S. Urease inhibitory activity of simple α , β -unsaturated ketones. **Life sciences**, v. 73, n. 23, p. 2985-2990, 2003. ISSN 0024-3205.

TARNAWSKI, A., TANOUE, K., SANTOS, A. M., & SARFEH, I. J. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment?

Scandinavian Journal of Gastroenterology, v. 30, n. sup210, p. 9-14, 1995. ISSN 0036-5521.

TAYLOR, L. The healing power of rainforest herbs: A guide to understanding and using herbal medicinals. **Square One Publishers Inc.** p 1-2, 2004.

THOLEN, D. W., KROLL, M., ASTLES, J. R., CAFFO, A. L., HAPPE, T. M., KROUWER, J., & LASKY, F. **Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A statistical Approach, Approved Guideline.** CLSI, 2003.

THOMSON, A. B., SAUVE, M. D., KASSAM, N., & KAMITAKAHARA, H. Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. **World Journal Of Gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 19, p. 2323, 2010.

TIBURSKI, J. H., ROSENTHAL, A., DELIZA, R., DE OLIVEIRA GODOY, R. L., PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2326-2331, 2011. ISSN 0963-9969.

TIVERON, Ana Paula. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil.** 2010. Dissertação (Mestrado) Piracicaba, 2010.

TOMA W, TRIGO J.R, BENSUASKI DE PAULA A.C, MONTEIRO S.B. R. Modulation of gastrin and epidermal growth factor by pyrrolizidine alkaloids obtained from *Senecio brasiliensis* in acute and chronic induced gastric ulcers. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.82: p.319-325, 2004

TRAOREL, M. S., DIANEL, S. DIALLO, M. S. T., BALDEL, E. S., BALDEL, M. A. CAMARA, A., DIALLO, A., KEITA, A., COS, P., MAES, L., PIETERS, L., *In Vitro* Antiprotozoal and Cytotoxic Activity of Ethnopharmacologically Selected Guinean Plants. **Planta Med.** v. 80, p. 1340–1344, 2014.

UCHENDU, C. N., Isek, T. Uchendu, C. N., Isek, T. Thomas. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. **African health sciences**, v. 8, n. 3, p. 163-167, 2008.

UCHENDU, C. N., CHOUDHARY, M. I. The *in vitro* effects of butanolic leaf extract of *Spondias mombin* on rat uterine muscle. **Nigerian Journal of Experimental and Applied Biology**, v. 5(1), p. 109-113, 2004.

VIEIRA, G., SANQUETTA, C. R., KLÜPPEL, M. L. W., BARBEIRO, L. DA S. S. Teores de carbono em espécies vegetais da Caatinga e do cerrado. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 7, n.2, p. 145-155, 2009.

VILLACHIA, H. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazônia. **Lima: Tratado de Cooperacion Amazônica**, p. 85-95, 1996.

VILLAÑO, D., FERNANDEZ-PCHÓN, M.S., TRONCOSO, A.M., GARCIA-PARRILLA, M.C. influence of enological practices on the antioxidant activity of wines, **Food Chemistry**, v. 95, p. 394-404, 2006.

VILLEGAS, L. F., FERNÁNDEZ, I. D., MALDONADO, H., TORRES, R., ZAVALA, A., VAISBERG, A. J., HAMMOND, G. B. Evaluation of the woundhealing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. **J Ethnopharmacol**, v. 55, p. 193–200, 1997.

VOGL, O., MITCHELL, J. D. Oriental lacquer. 11. Botany and chemistry of the active components of poisonous Anacardiaceae. J. M. S. - **Pure and Applied Chemistry**. V. 33, p. 1581-1599, 1996

WAGNER, H., BLADT. S. Plant drug analysis. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1547-1565, 2008. ISSN 0031-9333.

WANG, L., WANG, X., ZHANG, S. L., ZHU, X. M., LIU, Y. Q., SONG, Z. J., ZHANG, C. F. Gastroprotective effect of palmatine against acetic acid-induced gastric ulcers in rats. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 1, p. 257-264, 2017. ISSN 1340-3443.

WANNAN, B. S. Analysis of generic relationships in Anacardiaceae. **Blumea**, v. 51, p. 165-195, 2006.

WILSON, K.T., RAMANUJAM, K.S., MOBLEY, H.L., MUSSELMAN, R.F., JAMES, S.P., MELTZER, S.J. *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. **Gastroenterology**, v. 111, n. 6, p. 1524-1533, 1996. ISSN 0016-5085.

WILT, F. M., MILLER, G. C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of Wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis*: Asteraceae). **Biochemical systematics and ecology**, v. 20, n. 1, p. 53-67, 1992. ISSN 0305-1978.

WINTOLA, O. A., AFOLAYAN, A. J. The antibacterial, phytochemicals and antioxidants evaluation of the root extracts of *Hydnora africana* Thunb. used as antidysenteric in Eastern Cape Province, South Africa. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 307, 2015. ISSN 1472-6882.

WOISKY, R. G, SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Of Apicultural Research**, São Paulo, v. 37, p.99-105, 1998.

ZAMORA RODRÍGUEZ, Z.B., GONZÁLEZ ÁLVAREZ, R., GUANCHE, D., MERINO, N., HERNÁNDEZ ROSALES, F., MENÉNDEZ CEPERO, S., SCHULZ, S Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. **Mediators of inflammation**, v. 2007, 2007. ISSN 0962-9351.

ZAKARIA, Z. A., BALAN, T., AZEMI, A. K., OMAR, M. H., MOHTARRUDIN, N., AHMAD, Z., SALLEH, M. Z. Mechanism (s) of action underlying the gastroprotective effect

of ethyl acetate fraction obtained from the crude methanolic leaves extract of *Muntingia calabura*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 78, 2016. ISSN 1472-6882.

ZAKARIA, Z. A., ZAINOL, A. S. N., SAHMAT, A., SALLEH, N. I., HIZAMI, A., MAHMOOD, N. D., ABDUL HAMID, S. S. Gastroprotective activity of chloroform extract of *Muntingia calabura* and *Melastoma malabathricum* leaves. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 5, p. 812-826, 2016. ISSN 1388-0209.

WEEKS, D. L., ESKANDARI, S., SCOTT, D. R., SACHS, G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 482-485, 2000.