



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

TICIANA PARENTE ARAGÃO

ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA CASCA DO CAULE DE
***Ximenia americana* L. (ameixa de espinho) (OLACACEAE) EM RATOS**

Recife

2019

TICIANA PARENTE ARAGÃO

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA CASCA DO CAULE DE
Ximenia americana L. (ameixa de espinho) (OLACACEAE) EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Atividade gastroprotetora.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Co-orientadores: Profa. Dra. Germana Freire Rocha Caldas e Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

Recife

2019

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

A659a Aragão, Tician Parente.
 Atividade gastroprotetora da casca do caule de ximenia americana l.
 (ameixa de espinho) (olacaceae) em ratos/ Tician Parente Aragão. –
 2019.
 56 f.: il.; tab.;

 Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Ximenia. 2. Olacaceae. 3. Flavonoides. 4. Úlcera gástrica. I. Lima,
 Almir Gonçalves Wanderley (Orientador). II. Título.

615.4 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-081)

TICIANA PARENTE ARAGÃO

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA CASCA DO CAULE DE *Ximenia americana*
L. (ameixa de espinho) (OLACACEAE) EM RATOS**

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

Aprovada em: 08/03/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Orientador/ Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Germana Freire Rocha Caldas (Co-orientadora)
Centro Universitário Dr. Leão Sampaio

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida (Co-orientador)
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

Prof(a). Dr(a). Ana Cristina Lima Leite
Examinador Interno - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
Examinador Interno - Universidade Federal de Pernambuco

Prof(a). Dr(a). Samara Alves Brito
Examinador Externo - Faculdade Santa Maria de Cajazeiras - PB

Prof. Dr. José Gildo de Lima
Suplente Externo - Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À Deus, Nossa Senhora e Santa Terezinha, por se fazerem presentes em minha vida.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley, por estar sempre presente, pelos ensinamentos e por ser compreensivo.

À Profa. Dra. Germana Freire Rocha Caldas, pela amizade, ensinamentos e parceria.

Ao Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, por se fazer presente sempre que precisei.

À Lady Dayane Kalline Travassos dos Prazeres Paixão, o meu carinho e admiração. Você foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Você me deu paz nas dificuldades e sempre ficou ao meu lado, desde o início.

À Tia Celide e Tio João, por me acolher, pelo carinho e cuidado.

Ao meu marido, Alan Parente de Carvalho, e filho, Heitor Parente de Carvalho Aragão, pela paciência na minha ausência, parceria e amor.

À você, meu lindo amor, Heitor, obrigada por me encorajar a buscar sempre o melhor para nós.

Aos meus pais, irmãos e cunhadas por tornarem meus objetivos possíveis de serem realizados.

Ao Povoado das Letras (Salgueiro, Pernambuco, Brasil), Ana Paula, Deize, Vinícius e Fabiana (Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF).

À todos, o meu carinho, respeito e admiração. A participação de vocês foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Ximenia americana L. (Olacaceae) popularmente conhecida como ameixa de espinho, têm suas cascas utilizadas na etnomedicina como cicatrizante e para o tratamento de distúrbios gástricos. Este estudo identificou os constituintes químicos do extrato aquoso da casca do caule de *Ximenia americana* (XaAE) e avaliou a atividade gastroprotetora em modelos *in vivo* de lesão gástrica aguda em roedores. Após liofilização, o extrato foi submetido à análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e seus constituintes majoritários identificados. O efeito gastroprotetor foi avaliado em lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina. A atividade antissecretória, a produção de muco e a participação dos compostos sulfidrílicos (-SH) e do óxido nítrico (NO) também foram avaliados. A análise cromatográfica identificou como compostos majoritários, procianidinas B e C e catequina/epicatequina. A administração oral do XaAE (100, 200 e 400 mg/kg) inibiu as lesões induzidas por etanol absoluto (76,1%, 77,5% e 100%, respectivamente), etanol acidificado (44,9%, 80,6% e 94,9%, respectivamente) e indometacina (56,4%, 52,7% e 64,9%, respectivamente). O XaAE (100 mg/kg) reduziu o conteúdo gástrico e a acidez (51,4% e 67,7%, respectivamente), mas não alterou a produção de muco gástrico. A redução dos compostos -SH e NO promovidos por N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg, i.p.) e N ω -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 70 mg/kg, i.p.), respectivamente, reduziu o efeito gastroprotetor do XaAE. Os resultados indicam que a atividade gastroprotetora do extrato esteja mediada, em parte, por -SH, NO e atividade antissecretora. Esta ação foi, inicialmente, correlacionada aos seus principais constituintes, procianidinas B e C e catequina/epicatequina.

Palavras-chave: *Ximenia*. Olacaceae. Flavonoides. Úlcera gástrica.

ABSTRACT

Ximenia americana L. (Olacaceae), popularly known as thorn plum, have their shells used in ethnomedicine as healing agent and also for the treatment of gastric disorders. This study identified the chemical constituents of the aqueous extract of the *Ximenia americana* stem shells (XaAE) and assessed gastroprotective activity in *in vivo* models of acute gastric mucosal injury in rodents. After lyophilization, the extract was submitted to analyses through Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and then its major constituents were identified. The gastroprotective effect was assessed in acute gastric mucosal injuries induced by absolute ethanol, acidified ethanol and indomethacin. Antisecretory activity, mucus production and the participation of sulfhydryl compounds (-SH) and nitric oxide (NO) were also assessed. The chromatographic analysis identified as major compounds: B and C-type procyanidins and catechin/epicatechin. Oral administration of XaAE (100, 200 and 400 mg/kg) inhibited the injuries induced by absolute ethanol (76.1%, 77.5% and 100%, respectively), acidified ethanol (44.9%, 80.6 % and 94.9%, respectively) and indomethacin (56.4%, 52.7% and 64.9%, respectively). XaAE (100 mg/kg) reduced gastric contents and acidity (51.4% and 67.7%, respectively), but did not change the production of gastric mucus. The reduction of the -SH and NO compounds promoted by N-ethylmaleimide (NEM, 10 mg/kg, i.p.) and N ω -nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME, 70 mg/kg, i.p.), respectively, mitigated the gastroprotective effect of XaAE. The outcomes signalize that the gastroprotective activity of the extract is partly mediated by -SH, NO and antisecretory activity. Originally, this action was correlated to its main constituents, B and C-type procyanidins and catechin/epicatechin.

Keywords: *Ximenia*. Olacaceae. Flavonoids. Stomach Ulcer.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	08
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
2.1	Considerações sobre o trato gastrointestinal e seus mecanismos de defesa.....	10
2.2	Úlceras pépticas – considerações gerais e terapêutica.....	13
2.3	Modelos experimentais de lesão gástrica.....	14
2.4	Plantas na gastroproteção.....	15
2.5	Considerações Botânicas e Farmacológicas – <i>Ximenia americana</i> Linn.....	16
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Objetivo geral.....	19
3.2	Objetivos específicos.....	19
4	RESULTADOS.....	20
4.1	Artigo – Contribution of secondary metabolites to the gastroprotective effect of aqueous extract of <i>Ximenia americana</i> L. (Olacaceae) stem bark in rats.	
5	CONCLUSÃO.....	48
5.1	PERSPECTIVAS.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICE A - CONTRIBUIÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EFEITO GASTROPROTETOR DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE XIMENIA AMERICANA L. (OLACACEAE) EM RATOS.....	54
	ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE.....	55
	ANEXO B - COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (SISGEN).....	56

1 INTRODUÇÃO

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

Segundo Zapata-Colindres (2006 citado por VIMALA, 2014), a úlcera é uma das principais doenças gastrointestinais do mundo, afetando 10% da população mundial. De acordo com dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 2010 e 2015, foram registrados no Brasil 9.196 casos de óbitos por doenças do aparelho digestivo/úlcera gátrica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Apesar de ser uma enfermidade potencialmente evitável e dos avanços no tratamento, com antagonistas dos receptores H₂, inibidores da bomba de prótons (IBPs) e antimicrobianos, as complicações advindas deste distúrbio permanecem como um problema importante para o sistema de saúde (OLATUNJI, 2015 e OLIVEIRA, 2015). Sendo assim, se faz necessário pesquisar e desenvolver novas alternativas terapêuticas que promovam a prevenção das úlceras e/ou sua recorrência.

Nesta compreensão, a utilização de espécies vegetais pelas populações como alternativa terapêutica, instrumento de prevenção e cura de enfermidades, servem de ponto norteador para o desenvolvimento de novos fármacos (XAVIER, 2006 e OLIVEIRA, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária. Cerca de 80% utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% utilizam plantas ou preparações destas (BRASIL, 2016).

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, que se traduz em mais de 20% do número total de espécies (MMA, 2018). No entanto, poucas espécies têm sua atividade biológica comprovada, sendo, ainda, seu uso empregado de forma empírica (RABELO, 2013). Estima-se que o Brasil participe com ínfimos 2-3% do faturamento mundial, de cerca de 25 bilhões de dólares, com produtos de ação terapêutica (ALVES, 2010).

As plantas são consideradas alternativas terapêuticas para o tratamento de úlceras gástricas, visto que seus extratos naturais mostram-se eficazes em sua ação gastroprotetora. Estudos relatam que extratos de plantas e compostos isolados deles, como os flavonoides, sejam responsáveis por esta ação (SOBREIRA, 2017 e ROCHA, 2017). No Brasil, esta atividade foi comprovada em algumas espécies, por exemplo: *Hyptis martiusii* (CALDAS, 2011), *Xylopi langsdorffiana* (MONTENEGRO, 2014), *Spondias purpurea* L. (ALMEIDA, 2017) e *Artemisia campestris subsp maritima* (CORRÊA-FERREIRA, 2018).

Ximenia americana L. (Olacaceae), popularmente conhecida como ameixa da caatinga, limão-bravo e ameixa de espinho, apresenta na medicina popular indicações de suas cascas para o tratamento de feridas, úlceras de pele, gastrite e úlceras do estômago (MAIA, 2004; LORENZI, 2008; OLIVEIRA, 2010).

Informações etnofarmacológicas quanto à utilização da casca de *Ximenia americana* L. para o tratamento de distúrbios gástricos e o não relato de estudos sobre a atividade gastroprotetora, reforçaram a importância de desenvolver pesquisas nesta área.

Isto posto, investigou-se o efeito gastroprotetor do extrato aquoso da casca do caule de *Ximenia americana* (XaAE) como possível terapêutica das lesões gástricas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre o trato gastrointestinal e seus mecanismos de defesa

O estômago divide-se anatomicamente em três áreas (fundo, corpo e antro) e duas áreas funcionais (glandular oxíntica e pilórica). A área glandular oxíntica, que compreende 80% do órgão (fundo e corpo), é constituída por célula parietal produtora de ácido clorídrico, e a área glandular pilórica, que compreende 20% do órgão (antro), possui células G produtoras de gastrina, que estimulam diretamente e indiretamente, por meio da histamina, a secreção ácida (SCHUBERT e PEURA, 2008) (Figura 1).

A somatostatina, localizada nas células D do antro, inibe a secreção de gastrina, das células G, de forma parácrina (HOOGERWERF e PASRICHA in GOODMAN, 2003).

Os principais estimulantes da secreção ácida ao nível das células parietais são: histamina (parácrina), gastrina (hormonal) e acetilcolina (ACh; neurócrina). Histamina, liberada das células tipo enterocromafins (ECL), liga-se aos receptores de histamina do tipo H_2 que ativam a adenilato ciclase (AC) e geram monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico (AMPC). Gastrina, liberada de células G, liga-se ao receptor de colecistocinina (CCK_2), que ativa a fosfolipase C induzindo a liberação de cálcio (Ca^{2+}) nas células citosólicas. A gastrina estimula diretamente a célula parietal e, mais importante, indiretamente, liberam histamina de células ECL. ACh, lançada de neurônios intra-murais, se liga aos receptores M_3 que estão acoplados a célula parietal para um aumento no cálcio intracelular. O AMPC intracelular e os sistemas de sinalização dependentes de cálcio ativam a bomba de prótons, $H^+ K^+ -ATPase$, (SCHUBERT e PEURA, 2008) (Figura 2).

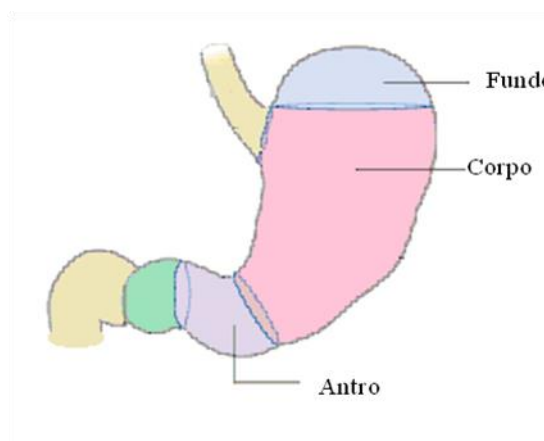


Figura 1. Divisões anatômicas do estômago (Adaptado de Mahadevan, 2017).

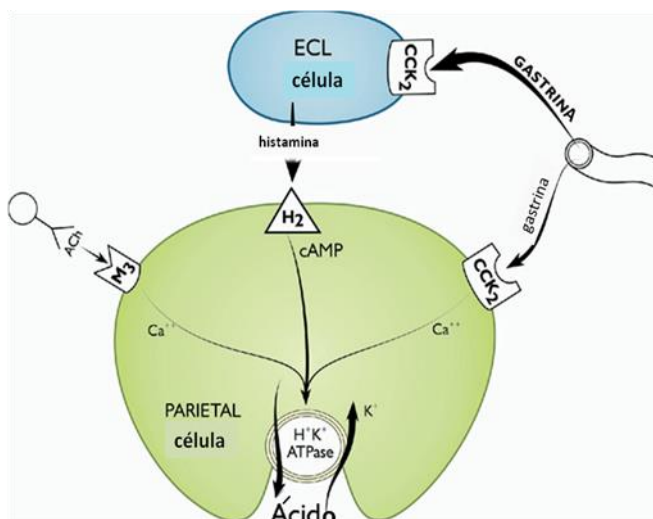


Figura 2. Modelo ilustrando os principais estimulantes (histamina, gastrina e acetilcolina, Ach) da secreção ácida nas células parietais, seus receptores e caminhos de transdução (Adaptado de Schubert e Peura, 2008).

Em condições normais, a integridade da mucosa é mantida por mecanismos de defesa: muco, bicarbonato, prostaglandinas (PGs), óxido nítrico, enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), fluxo sanguíneo e a barreira epitelial; e por mecanismos agressores: endógenos (HCl e pepsina), exógenos (etanol e anti-inflamatórios não-esteroides não-seletivos - AINEs) e agentes biológicos (*Helicobacter pylori*). As lesões podem ocorrer quando os fatores nocivos se sobrepõem sobre os mecanismos de defesa ou quando a defesa da mucosa está prejudicada (POSSENTI, 2012; LAINE, 2008).

As células da mucosa gástrica sofrem renovação constante, cuja taxa varia dependendo da demanda ditada pela saúde do tecido (inflamação, ulceração ou carcinogênese) (MODLIN, 2003). A substituição completa do epitélio da superfície gástrica geralmente leva de 3-7 dias (LAINE, 2008).

Há quase três décadas, desde a primeira evidência experimental do bicarbonato, foi relatada a existência da barreira, como um componente-chave dos mecanismos de proteção da mucosa contra o ácido e a pepsina. Durante a secreção de ácido, as células parietais liberam bicarbonato (HCO_3^-) para o interstício mucoso e vascular, o fluxo alcalino. A secreção de bicarbonato (HCO_3^-) na camada de mucina (gel estável e aderente) cria um gradiente de pH na superfície epitelial no estômago e duodeno e fornece a primeira linha de defesa da mucosa contra o ácido luminal. Quando esta barreira está sobrecarregada ou quando rompe na doença,

são ativados uma série de mecanismos de proteção, neutralização do ácido, reparo epitelial e manutenção e distribuição do fluxo sanguíneo da mucosa (ALLEN, 2005).

A resposta microcirculatória da mucosa também é um componente importante de defesa. O epitélio atua como uma barreira à difusão passiva de substâncias nocivas. A exposição ao agente irritante resulta em mudanças na permeabilidade vascular e aumento do fluxo sanguíneo, diluindo e neutralizando as toxinas, bem como evitando que a toxina se acumule na mucosa. A identificação de alguns dos principais mediadores químicos envolvidos no mecanismo de defesa da mucosa (por exemplo, prostaglandinas e óxido nítrico, NO) permitiu o desenvolvimento de novos agentes que podem proteger o trato gastrointestinal (MARTIN e WALLACE, 2006).

Os anti-inflamatórios não-esteroides não-seletivos (AINEs) são solúveis em ácidos, sendo absorvidos diretamente na camada de mucosa, interferindo nos processos celulares. Promovem inibição da ciclo-oxigenase 1 (COX-1, fisiológica ou constitutiva), enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs), resultando em lesão por sua ação direta na camada epitelial do estômago e principalmente por diminuir as prostaglandinas citoprotetoras (PGE₂ e PGI₂), resultando em diminuição de bicarbonato, muco, fluxo sanguíneo e comprometimento da restituição do tecido (LU, 2006 e STEWART, 2011) (Figura 3).

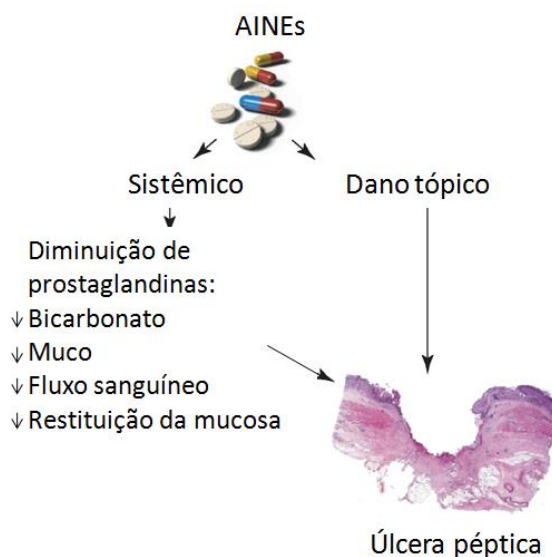


Figura 3. Efeitos gerados pelo uso de drogas anti-inflamatórias não-esteroides não-seletivos (AINEs) (Adaptado de Lu, 2006).

As prostaglandinas derivadas da COX-1 contribuem para a defesa da mucosa em vários sentidos, incluindo estimulação da secreção de muco e bicarbonato e regulação do

fluxo sanguíneo da mucosa. Prostaglandinas derivadas da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) também contribuem para a defesa da mucosa, por meio da regulação da proliferação epitelial e supressão da adesão de leucócitos ao endotélio vascular (MARTIN e WALLACE, 2006).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por uma reação enzimática entre o oxigênio molecular e a L-arginina, por meio da enzima óxido nítrico sintase (BIGHETTI, 2002). Segundo Whittle (1993, citado por CHAVEZ-PINA, 2010), este gás vasodilatador possui propriedades de manter a integridade da mucosa gástrica em condições basais por sua interação com neuropeptídeos e prostaglandinas (PGs), regulando o fluxo sanguíneo da mucosa, de ácido e muco. A PGE₂ além de melhorar o fluxo sanguíneo da mucosa e aumentar a secreção de muco e bicarbonato, também aumenta a secreção de compostos sulfidrílicos, ajudando fortalecer a resistência das células da mucosa gástrica (CHEN, 2015).

Os grupamentos sulfidrílicos (-SH) desempenham um papel essencial nos mecanismos citoprotetores gástricos (MIZUI, 1983). Encontra-se em alta concentração no estômago e se ligam a radicais livres que se formam após lesões (AVILA, 1996). Sua adesão contínua a camada de muco forma uma barreira criando uma camada estável para suportar a neutralização superficial de ácido (ALLEN, 2005). Os níveis de glutathione (GSH) podem sofrer um decréscimo quando existe a administração aguda de etanol. A formação de um complexo entre a glutathione e o acetaldeído, resultante da oxidação do etanol pela enzima álcool desidrogenase, induz a um aumento na peroxidação lipídica (JORDÃO-JÚNIOR, 1998). A redução de grupamentos sulfidrílicos não-protéicos na mucosa gástrica torna o muco solúvel em água e facilmente retirado pelo agente ulcerogênico, como o etanol (SZABO, 1981).

2.2 Úlceras pépticas – considerações gerais e terapêutica

As úlceras são caracterizadas histologicamente como uma descontinuidade da mucosa que se estende através da camada muscular da mucosa até a submucosa. Diferenciam-se das gastrites, que são inflamações da mucosa gástrica, podendo apresentar hemorragia e/ou destruição do tecido sem atingir a camada muscular (SOUZA, 2012).

A formação de úlceras é multifatorial. Porém, o ácido continua a desempenhar um papel importante no desenvolvimento das úlceras, sendo esta uma condição necessária, mas não suficiente, para sua causa (GUSTAFSON, 2010). *Helicobacter pylori* e os AINEs são as principais causas de resistência da mucosa prejudicada e de formação das úlceras pépticas (LU, 2006).

A incidência e o manejo da úlcera péptica mudaram consideravelmente desde as primeiras intervenções cirúrgicas, realizadas durante a segunda metade do século XX. A compreensão da etiologia com a descoberta da bactéria *Helicobacter pylori*, conhecida por estar associado a 95% dos casos de ulceração duodenal, o desenvolvimento farmacológico de antagonistas seletivos dos receptores H₂ e de inibidores da bomba de prótons foram significantes para o controle da secreção ácida no estômago sem ser necessário recorrer a procedimentos cirúrgicos invasivos (STEWART, 2011).

A úlcera péptica ainda é uma causa importante de morbidade e custos em cuidados de saúde. Estimativas de despesas relacionadas à perda do trabalho, hospitalização e atendimento ambulatorial (excluindo custos com medicação) são mais de US \$ 5 bilhões por ano nos Estados Unidos (LU, 2006).

As opções de tratamento para a úlcera péptica estão baseadas no uso de antiácidos, agentes citoprotetores, antagonistas muscarínicos, anti-histamínicos H₂, inibidores da bomba de prótons e antimicrobianos, para o tratamento de infecção por *Helicobacter pylori* (OLATUNJI, 2015 E MAHADEVAN, 2017).

Apesar de seguras, as terapias disponíveis apresentam elevada taxa de recidiva, alto custo e efeitos colaterais importantes. Estes efeitos englobam: alcalose, diarreia, constipação e distensão abdominal, em caso de uso de antiácidos (hidróxido de magnésio, hidróxido de alumínio e bicarbonato de sódio); boca seca, visão turva, taquicardia e constipação, na utilização de anticolinérgicos (pirenzepina); ginecomastia em homens, galactorreia em mulheres, náusea, tontura e alterações hematológicas na aplicação de os antagonistas seletivos de receptores H₂ (ranitidina e cimetidina) e hipergastrinemia, hipersecreção rebote, cefaleia, diarreia, náusea e constipação, no emprego de inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol e pantoprazol) (ALMEIDA, 2018). Nesta perspectiva, os produtos naturais, provenientes de plantas medicinais, surgem como alternativas terapêuticas acessíveis à população, servindo, também, de premissa para o desenvolvimento de novos fármacos.

2.3 Modelos experimentais de lesão gástrica

Segundo Souza (2012), a avaliação da atividade antiúlcera de um extrato vegetal divide-se em quatro modelos distintos em experimentação animal: indução por álcool, anti-inflamatórios não-esteroides não-seletivos (AINEs - ácido acetilsalicílico ou indometacina) e ácido acético. Os três primeiros representam os agentes etiológicos mais comuns envolvidos na doença da lesão gástrica humana e o último por promover uma úlcera mais parecida com a que ocorre no homem.

A formação de lesões na mucosa gástrica após a administração do etanol parece ocorrer de forma direta e indireta através de vários mecanismos, envolvendo depleção de mecanismos defensivos gástricos, incluindo a ruptura da barreira mucosa, diminuição do muco, redução do fluxo sanguíneo gástrico e alterações na permeabilidade, que contribuem para o desenvolvimento dos aspectos hemorrágicos e necróticos da lesão tecidual (GLAVIN E SZABO, 1992).

Os efeitos nocivos dos AINEs no trato gastrointestinal se dão principalmente através da inibição da cicloxigenase 1 (COX-1), por diminuição da secreção de bicarbonato, redução da secreção de muco e fluxo sanguíneo e comprometimento da restituição da mucosa. AINEs que são solúveis em meio ácido podem ser absorvidos diretamente na camada mucosa interferindo nos processos celulares que causam a lesão (LU, 2006).

A ligadura do piloro permite estudar o efeito de drogas na secreção gástrica e nos eventos envolvidos na gastroproteção, como a secreção de ácido, pepsinogênio, prostaglandinas e liberação de enzimas plasmáticas, utilizadas atualmente como índice de lesão celular. Nesse método, o conteúdo gástrico acumulado durante 4 horas é avaliado em termos de volume secretado, pH e acidez total. Os valores da acidez total, expressos em $\text{mEq}[\text{H}^+]/\text{L}/4 \text{ h}$, não correspondem sempre ao pH, pois as proteínas presentes na secreção podem tamponar parte da acidez (LAPA, 2002). Há indícios de que esta resposta se dê por reflexos do nervo vago, através de sensores de pressão localizados na região do piloro (HERNANDES, 2010).

Desde o seu desenvolvimento em 1969, o modelo de úlcera crônica por ácido acético tornou-se bem estabelecido na comunidade científica. Os motivos subjacentes ao uso frequente do modelo deve-se pelo processo simples de indução da úlcera, por serem muito parecidas com as úlceras humanas em características patológicas e mecanismos de cura e por responderem bem à várias drogas antiúlcera (inibidores das bombas de prótons, sucralfato) (OKABE, 2005).

2.4 Plantas na gastroproteção

Substâncias químicas derivadas de plantas foram utilizadas para tratar doenças desde o início da medicina. Aproximadamente 50% das novas entidades químicas introduzidas nas últimas duas décadas são de produtos naturais e derivados (VIMALA, 2014).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta e que, associada a uma diversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento tradicional no uso de plantas

medicinais com potencial para desenvolvimento de pesquisas em tecnologias e terapêuticas (BRASIL, 2006).

Segundo Gadekar (2010), *Ficus arnottiana*, *Alstonia scholaris* R. Br., *Asparagus racemosus* Willd, *Azadirachta indica* Juss. Syn. *Melia azadirachta* L., *Bauhinia variegata* Linn., *Butea frondosa* Roxb., *Carica papaya* L., *Annona squamoza* são as plantas medicinais mais comumente utilizadas no mundo para o tratamento de úlcera péptica, estando esta atividade relacionada, em parte, aos flavonoides.

Os flavonoides representam uma classe bastante diversificada de metabólitos secundários com efeitos potencialmente benéficos à saúde humana. Estes compostos protegem a mucosa gastrointestinal de lesões produzidas por modelos experimentais de úlcera e diferentes agentes necróticos. Vários mecanismos de ação podem estar envolvidos com este efeito protetor. A quercetina possui um mecanismo de ação antissecretor; flavonóis, apresenta propriedades anti-histamínicas e de inibição da bomba de prótons gástrica H^+/K^+ ; chalconas, em particular aqueles com mais de um grupo isopreniloxilo, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa, estimulam a síntese de substâncias mucosas na mucosa gástrica e aumentam os níveis de prostaglandinas. No entanto, o mais importante mecanismo de ação responsável pela atividade antiúlcera dos flavonoides é a sua propriedade antioxidante, observada em garcinol, rutina e quercetina. Logo, os flavonoides podem ter um potencial terapêutico mais eficaz e menos tóxico para o tratamento de doenças gastrointestinais, particularmente para as úlceras pépticas (MOTA, 2009).

A úlcera péptica trata-se de uma lesão na mucosa gástrica ou duodenal até a submucosa. Em todo o mundo, as duas causas mais comuns de ulceração péptica são infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e o uso prolongado de anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) (MAJUMDAR, 2010).

As atividades antiúlcera das drogas podem estar atribuídas às propriedades de eliminação de radicais livres, inibição de secreção ácida e fortalecimento da barreira da mucosa gástrica (GADEKAR, 2010).

2.5 Considerações Botânicas e Farmacológicas – *Ximenia americana* Linn.

Estima-se que no reino vegetal encontram-se aproximadamente 400.000 espécies de plantas superiores distribuídas no globo terrestre, onde o Brasil detém de 20%. Nossos biomas mais conhecidos e discutidos do ponto de vista da biodiversidade vegetal são representados pela Floresta Amazônica e Mata Atlântica, dando pouca ênfase ao Semi-Árido e Caatinga (LUCCHESI, 2006).

A família Olacaceae possui distribuição pantropical, compreendendo 27 gêneros com aproximadamente 200 espécies, seus representantes são plantas lenhosas, árvores ou arbustos. No Brasil encontram-se, aproximadamente, 13 gêneros e cerca de 60 espécies descritas, sendo os gêneros *Heisteria*, *Ximenia*, *Liriosma* e *Schoepfia* com o maior número de espécies (BRASILEIRO, 2008).

Ximenia americana L., da família das Olacaceas é uma árvore de 3-4 metros de altura e com porte de pequena árvore, armado de espinhos; fornece madeira compacta, leve e durável; casca fina, cinzenta, pouco rugosa; folhas alternadas, pecioladas, elípticas ou lanceoladas, inteiras, simples, glabras, coriáceas; flores amareladas, aromáticas, com pétalas notáveis e elegantemente recurvadas, dispostas em racimos curtos axilares ou terminais; fruto drupa amarelo-alaranjada quando madura, ovóide ou elipsóide, de 3-6 cm de comprimento, contendo polpa aromática, mais ou menos doce, pouco aquosa, comestível, envolvendo 1 semente com amêndoa branca (PIO CORRÊA, 1984; LIMA, 2011) (Figura 3).

Popularmente conhecida como ameixa da terra, ameixa da caatinga, limão-bravo, limãozinho da praia, ameixa da bahia, ameixa de espinho (LORENZI, 2008), é uma árvore frutífera não-cultivada e pouco frequente na natureza (LORENZI, 2006). No continente americano, o limite sul de sua distribuição é a região central da Argentina (LUCCHESI, 2006).

Tanto no Brasil como na África, a medicina popular e a medicina indígena atribuem aos seus frutos propriedades alimentícias e, às cascas, na forma de pó ou extrato aquoso, propriedades adstringentes e cicatrizantes no tratamento caseiro de feridas e úlceras da pele e mucosas; ao decocto das cascas, indicação para os casos de inflamação na região genital, crises hemorroidais, gastrite e úlcera do estômago (LORENZI, 2008; MAIA, 2004). As cascas têm seu emprego no tratamento da anemia, câncer, infecção urinária e problemas estomacais (OLIVEIRA, 2010).

Monte (2012) compila, em seu estudo de revisão, informações químicas e farmacológicas sobre a espécie *X. americana* atualizando dados importantes dos últimos 10 anos. Foram identificadas atividades biológicas antimicrobianas e antifúngicas (folhas, raiz, casca e caule), pesticida (sementes), analgésica (casca do caule e folhas), antipirética (casca do caule), antitripanossomal (casca do caule), anticancerígeno (caule), antiviral (casca do caule), antioxidante, efeitos hematológicos e hepáticos (folhas, casca do caule e raiz) e tóxicos (casca do caule).

Estudos posteriores determinaram a atividade antioxidante (ALMEIDA, 2016) e fotoprotetora (REIS, 2016) dos frutos e da casca do caule de *X. americana*, respectivamente.

A atividade antioxidante foi atribuída aos compostos polifenóis, flavonoides, antocianinas e a enzimas antioxidantes.

O extrato bruto de *X. americana* apresenta em seus constituintes, flavonoides, saponinas, alcaloides, quinonas, terpenoides, fenóis, glicosídeos e esteróis, produzindo uma base científica que pode justificar o uso de *Ximenia americana* na medicina (MONTE, 2012).

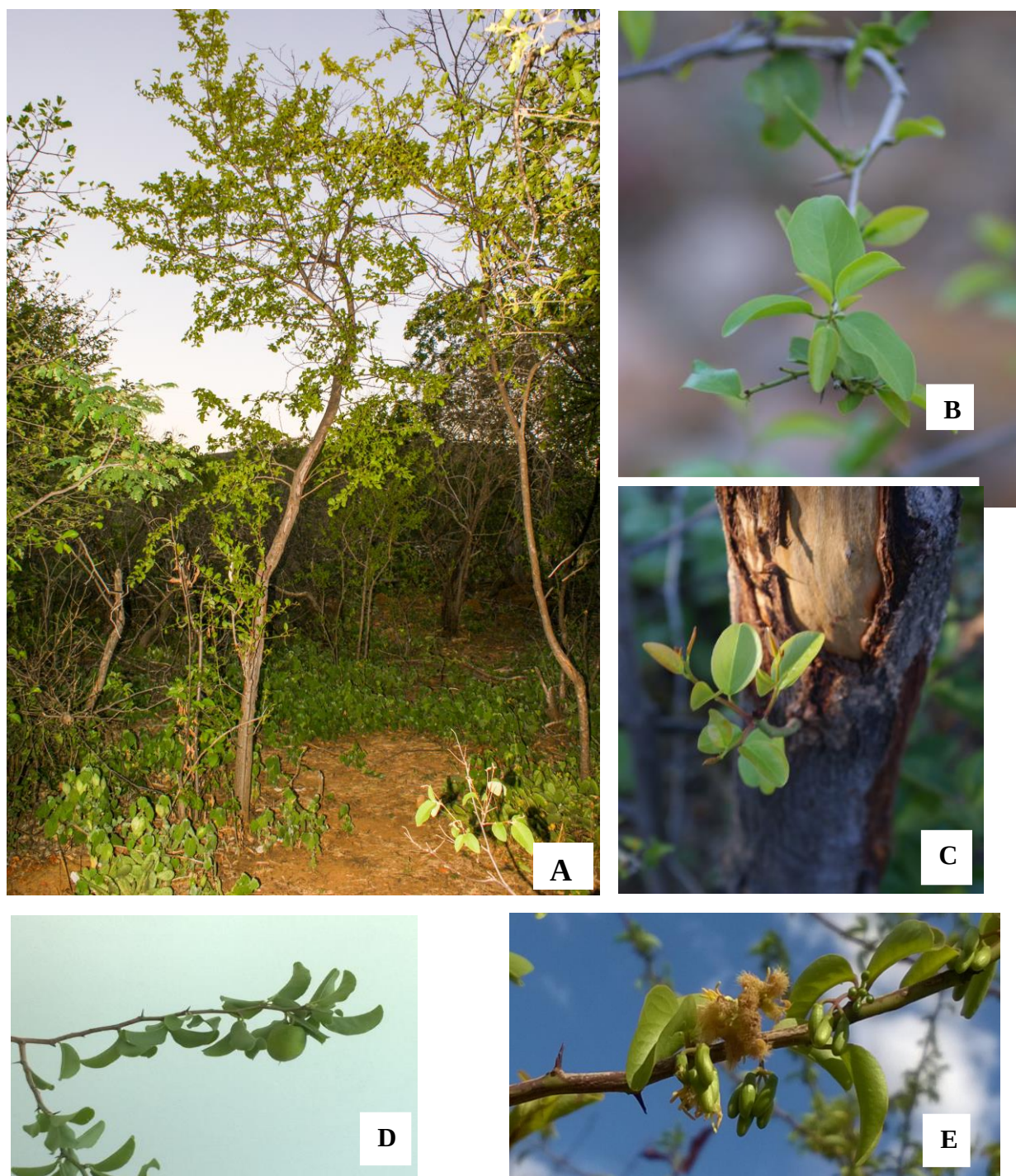


Figura 3. *Ximenia americana* L. (A) árvore, (B) folhas, (C) casca, (D) fruto, (E) flores. Fonte: autora, 2016.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar a composição fitoquímica e a atividade gastroprotetora do extrato aquoso da casca do caule de *Ximenia americana* (XaAE), por meio de diferentes modelos experimentais agudos de lesão gástrica.

3.2 Objetivos específicos:

- Identificar a classe dos constituintes químicos do XaAE, por meio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e os constituintes majoritários pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a toxicidade aguda do XaAE;
- Avaliar a atividade gastroprotetora do XaAE, em modelos agudos de lesão gástrica induzida por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina;
- Investigar a atividade antissecretória gástrica basal do XaAE, pelo método de ligadura pilórica;
- Analisar a participação dos compostos sulfidrílicos (-SH), do óxido nítrico (NO) e a produção de muco na gastroproteção;
- Propor a possível ação farmacológica envolvida na atividade gastroprotetora do XaAE.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo - Contribuição dos Metabólitos Secundários no Efeito Gastroprotetor do Extrato Aquoso da Casca do Caule de *Ximenia americana* L. (Olacaceae) em Ratos

Resumo: *Ximenia americana* L. (Olacaceae) é utilizada em etnomedicina como cicatrizante e para o tratamento de distúrbios gástricos. Este estudo identificou os constituintes químicos do extrato aquoso de *X. americana* (XaAE) e avaliou sua atividade antiulcerogênica. Após a liofilização, o XaAE foi analisado por cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massa (LC-MS) e seu efeito antiulcerogênico foi avaliado em lesões gástricas agudas induzidas por etanol, etanol acidificado e indometacina. Foram investigadas também a ação antissecretora, a produção de muco e a participação dos grupos sulfidril (-SH) e óxido nítrico (NO). A análise cromatográfica identificou procianidinas B e C e catequina/epicatequina como compostos majoritários. A administração oral de XaAE (100, 200 e 400 mg/kg) inibiu as lesões gástricas induzidas pelo etanol (76,1%, 77,5% e 100%, respectivamente), etanol acidificado (44,9%, 80,6% e 94,9%, respectivamente) e indometacina (56,4%, 52,7% e 64,9%, respectivamente). O XaAE reduziu o conteúdo gástrico e a acidez (51,4% e 67,7%, respectivamente), mas não alterou a produção de muco gástrico. A redução dos grupos -SH e NO promovida pela N-etilmaleimida (NEM) e pelo éster N ω -nitro-L-arginina-metílico (L-NAME), respectivamente, reduziu o efeito gastroprotetor da XaAE. Em conclusão, o XaAE tem atividade gastroprotetora mediada em parte pela atividade de -SH, NO e antissecretora. A ação gastroprotetora está inicialmente correlacionada aos seus compostos majoritários, procianidinas B e C e catequina/epicatequina.

Palavras-chave: *Ximenia*; Olacaceae; flavonóides; lesão gástrica

1. Introdução

A úlcera péptica é uma doença crônica, multifatorial, caracterizada por lesões que afetam a mucosa do esôfago, estômago e/ou duodeno, podendo se estender até a camada muscular da mucosa [1]. As lesões ocorrem devido a um desequilíbrio entre os fatores defensivos (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo da mucosa, prostaglandinas endógenas) e agressores (secreção ácida, álcool, anti-inflamatórios não-esteróides, *Helicobacter pylori* e espécies reativas de oxigênio) da mucosa gástrica [2].

Essas lesões acometem cerca de quatro milhões de pessoas em todo o mundo, mais frequentemente homens do que mulheres, sendo a úlcera duodenal mais prevalente entre os

jovens e a úlcera gástrica entre idosos [1,3]. Atualmente, as opções de tratamento para úlcera péptica baseiam-se no uso de antiácidos, agentes citoprotetores, antagonistas muscarínicos, anti-histamínicos H_2 , inibidores da bomba de prótons e, mais recentemente, o uso de antimicrobianos no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori* [4,5]. Essas drogas levaram a uma redução na incidência e prevalência de úlceras pépticas. No entanto, os efeitos colaterais do tratamento crônico com essas drogas e o aumento da resistência do *H. pylori* aos antibióticos indicam a necessidade de procurar novas substâncias que possam ajudar no tratamento dessa doença.

A inibição da secreção de ácido gástrico com drogas antissecretoras, como inibidores da bomba de prótons ou antagonistas dos receptores H_2 , tem sido uma opção terapêutica viável no tratamento de doenças gástricas, apesar de recorrência e/ou efeitos adversos [6]. Neste contexto, usamos pantoprazol ou ranitidina como drogas padrão nos modelos experimentais. Além disso, a carbenoxolona também foi usada como droga padrão em alguns modelos experimentais, considerando sua potente ação gástrica citoprotetora [7].

X. americana L. (Olacaceae), vulgarmente conhecida como ameixa de espinho, foi descrita pela primeira vez em 1606, na Austrália, pelo naturalista espanhol Francisco Ximenes [8]. É uma planta cosmopolita natural tropical, não-cultivada e incomum, ocorrendo principalmente na África e na América do Sul, inclusive nos planaltos costeiros do Nordeste do Brasil [9].

Na etnomedicina, a casca do caule de *X. americana* é utilizada como agente adstringente e curativo, sendo também indicado para o tratamento de feridas, ulcerações da pele e mucosas, gastrite e desconforto estomacal [9]. Alguns estudos têm explorado sua ação cicatrizante, anti-inflamatória [10,11], analgésica [12], antioxidante [13,14], antimicrobiana [15], anti-helmíntica [16] e anticancerígena [17].

A falta de suporte bibliográfico para a ação da casca do caule *X. americana* L. no tratamento de problemas gástricos, cujo uso é baseado em informações etnofarmacológicas, nos motivou a explorar a possível ação antiulcerogênica desta espécie em modelos pré-clínicos agudos de lesões gástricas.

2. Resultados

2.1. Perfil Fitoquímico

A análise revelou a presença de altos níveis de compostos fenólicos, lignanas, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, naftoquinonas, triterpenos e esteróides, e menores quantidades de alcalóides, saponinas e taninos hidrolisáveis (Tabela 1).

Tabela 1 - Compostos metabólicos identificados na caracterização fitoquímica do extrato aquoso de *X. americana* (XaAE).

Classes de Metabólitos Secundários	Padrões	Agente Revelador	Intensidade
Alcalóides	Yohimbina	Dragendorff	+
Flavonóides	Quercetina	NP/PEG	+++
Lignananas	-	Vanilina fosfórica	+++
Mono, sesqui e diterpenos	-	Vanilina sulfúrica	+++
Naftoquinonas	-	10% de KOH Etanólico	+++
Saponinas	Saponina	Vanilina sulfúrica	+
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	Cloreto férrico 2%	++
Triterpenos e esteróides	-	Vanilina sulfúrica	+++

Produtos naturais - reagente polietilenoglicol (NP/PEG) (= reagente NEU), KOH: hidróxido de potássio. (+++) forte; (++) médio; (+) fraco.

2.2. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC-DAD-MS/MS)

A análise cromatográfica do extrato aquoso de *X. americana* sugeriu a presença de procianidina B, procianidina C e compostos de catequina/ epicatequina para a similaridade entre o espectro de absorção ultravioleta, razão massa/carga e fragmentação (MS²) como descrito na Tabela 2. Os íons precursores e espectros de fragmentação dos principais constituintes do extrato *m/z* foram 577,16 (A), 866,19 (B) e 289,03 (C) e são mostrados nas Figuras 1 e 2 para comprovar a identidade das procianidinas B, procianidinas C, e catequinas/epicatequina, respectivamente.

Tabela 2 - Compostos detectados no extrato aquoso de *X. americana*.

Tempo de Retenção (min)	<i>m/z</i> (+)	MS ² (+)	<i>m/z</i> (-)	MS ² (-)	λ Max (nm)
7,8	355,11	343,87	168,91	124,91	278
16,8	579,14	427,11/291,07	577,16	425,04/288,95	278
18,9	867,20	-	866,19	695,12/577,16/407,04	278
20,6	603,10	313,02	289,03	245,02/204,96	278
32,3	459,11	415,13/353,05/291,09	435,16	329,03/166,91	278

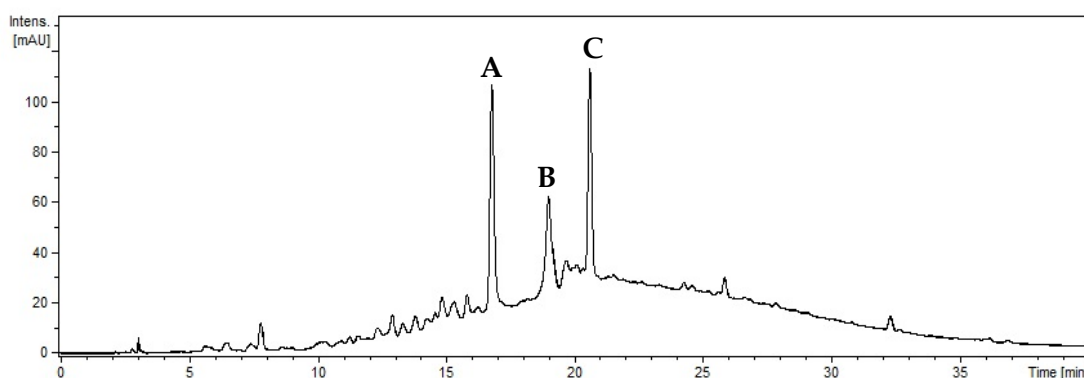


Figura 1 - Cromatograma do extrato de *X. americana* a 270 nm.

(A) Procianidina B; (B) Procianidina C; (C) catequina/epicatequina.

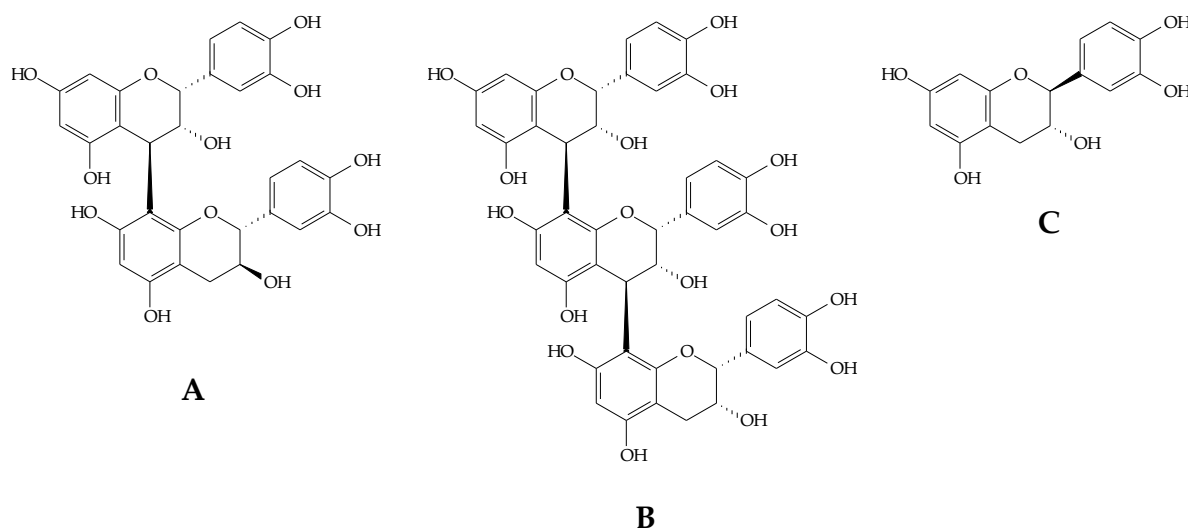


Figura 2 - Estruturas dos principais constituintes da casca do caule de *X. americana* L. (A) Procianidina B; (B) Procianidina C; (C) catequina/epicatequina.

O cromatograma na UV a 270 nm, Figura 1, mostra que os constituintes principais do extrato de *X. americana* são procianidinas. Embora não tenha sido possível identificá-las, elas são procianidinas B1, B2, B3 ou B4 por apresentarem o mesmo perfil de fragmentação descrito por outros autores [18].

2.3. Toxicidade Aguda

A administração oral de 2000 mg/kg de XaAE não induziu morte nem produziu sinais visíveis de alterações comportamentais ou toxicidade nos camundongos tratados durante os 14

dias de observação. Não houve diferenças significativas no consumo de água ($9,24 \pm 0,35$ vs. $8,66 \pm 0,29$ mL/dia/animal), consumo de alimentos ($5,32 \pm 0,13$ vs. $5,57 \pm 0,09$ g/dia/animal) e peso corporal ($36,67 \pm 0,27$ vs. $36,33 \pm 0,99$ g) entre o grupo controle e o tratado, respectivamente.

2.4. Protocolos Experimentais

2.4.1. Indução de Lesões Gástricas por Etanol Absoluto

A administração de extrato aquoso de *X. americana* reduziu a formação de lesões ulcerativas induzidas por etanol absoluto (Figuras 3 e 4). A porcentagem de inibição das lesões foi de 76,08%, 77,48% e 100% nos ratos pré-tratados com o extrato nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente, quando comparado ao grupo controle lesionado (CL, $116,5 \pm 19,67$ mm²). Ratos tratados com pantoprazol apresentaram redução de 69,86% da área lesionada.

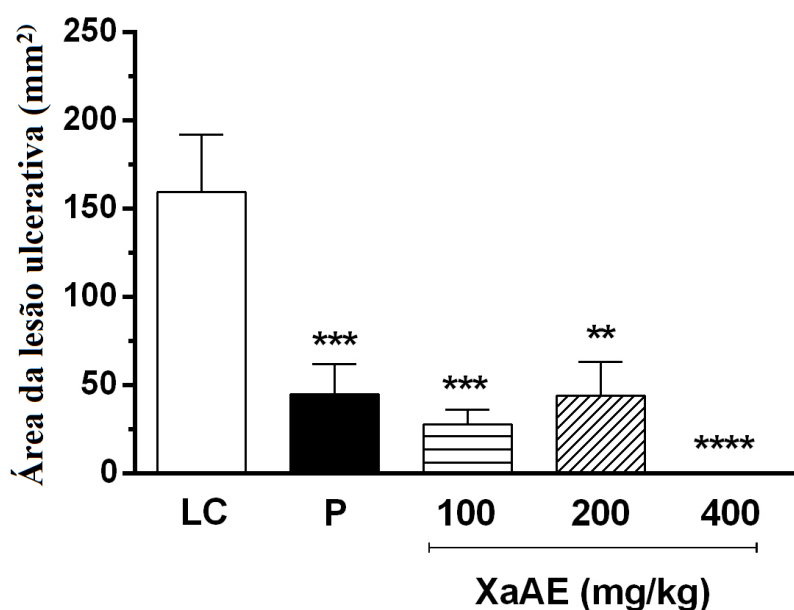


Figura 3 - Efeito gastroprotetor do extrato aquoso de *X. americana* (XaAE) em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto (99%, 1 mL, por via oral) em ratos Wistar. Os animais receberam solução de NaCl 0,9% (controle lesionado, CL, 10 mL/kg, via oral), pantoprazol (P, 40 mg/kg, via oral) ou XaAE (100, 200 e 400 mg/kg, via oral). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (6-7 animais/grupo). Diferença estatística em relação ao grupo controle lesionado foi apontada na análise de variância - ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, por valores de p : ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$.

2.4.2. Indução de Lesões Gástricas por Etanol Acidificado

O extrato aquoso de *X. americana* promoveu uma proteção gástrica significativa contra lesões induzidas por etanol acidificado (Figuras 5 e 6). Os resultados mostraram que os ratos pré-tratados por via oral com o extrato (100, 200 e 400 mg/kg) apresentaram uma porcentagem de inibição de 44,86%, 80,56% e 94,93%, respectivamente, em contraste com o grupo controle lesionado (CL, $231,60 \pm 29,54 \text{ mm}^2$). Ratos tratados com pantoprazol (P) apresentaram redução de 51,99% da área lesionada.

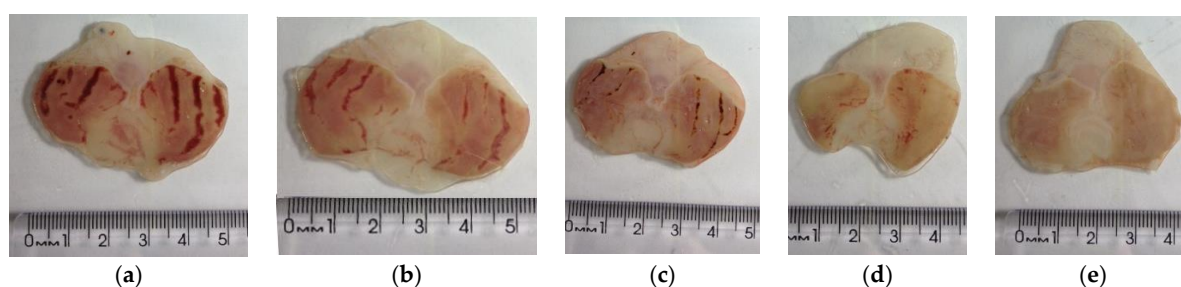


Figura 4 - Fotografia típica do efeito gastroprotetor do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* (XaAE) em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto (99%, 1 mL, por via oral) em ratos. (a) controle lesionado (NaCl 0,9%, 10 mL/kg, via oral); (b) pantoprazol (40 mg/kg, oralmente); (c – e) XaAE (100, 200 e 400 mg/kg, por via oral, respectivamente).

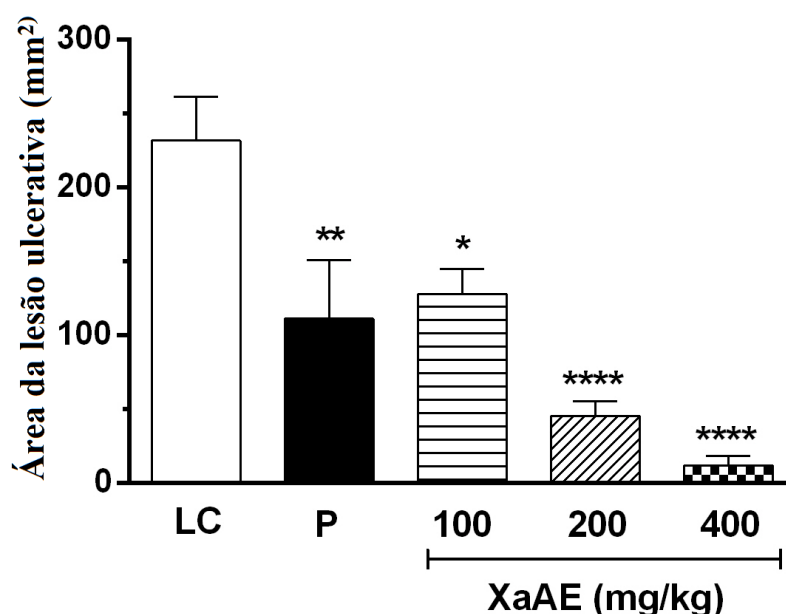


Figura 5 - Efeito gastroprotetor do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* (XaAE) em lesões gástricas induzidas por etanol acidificado (0,3 M HCl/60% etanol, 1 mL, via oral) em ratos Wistar. Os animais receberam solução de NaCl 0,9% (controle lesionado, CL, 10 mL/kg, via oral), pantoprazol (P, 40 mg/kg, via oral) ou XaAE (100, 200 e 400 mg/kg, via oral). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (6-7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle lesionado (ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, * $p < 0,02$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$).

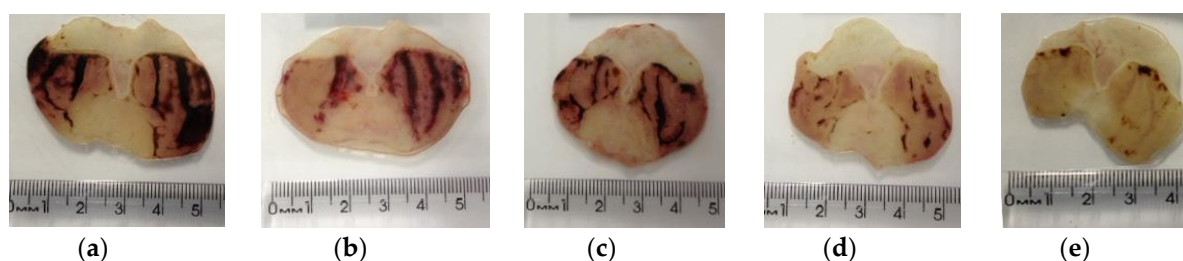


Figura 6 - Fotografia típica do efeito gastroprotetor do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* (XaAE) em lesões gástricas induzidas por etanol/HCl (0,3 M HCl/60% etanol, 1 mL, via oral) em ratos. (a) controle lesionado (NaCl 0,9%, 10 mL/kg, via oral); (b) pantoprazol (40 mg/kg, via oral); (c – e) XaAE (100, 200 e 400 mg/kg, via oral, respectivamente).

2.4.3. Indução de Lesões Gástricas por Indometacina

O extrato aquoso de *X. americana* promoveu proteção gástrica significativa contra lesões induzidas por indometacina (Figuras 7 e 8). As doses de 100, 200 e 400 mg/kg promoveram inibições de 56,43%, 52,67% e 64,91%, respectivamente, em contraste com ratos do grupo controle lesionado (CL, $12,56 \pm 2,91 \text{ mm}^2$). Ratos tratados com pantoprazol (P, 40 mg/kg) apresentaram redução de 98,70% da área lesionada.

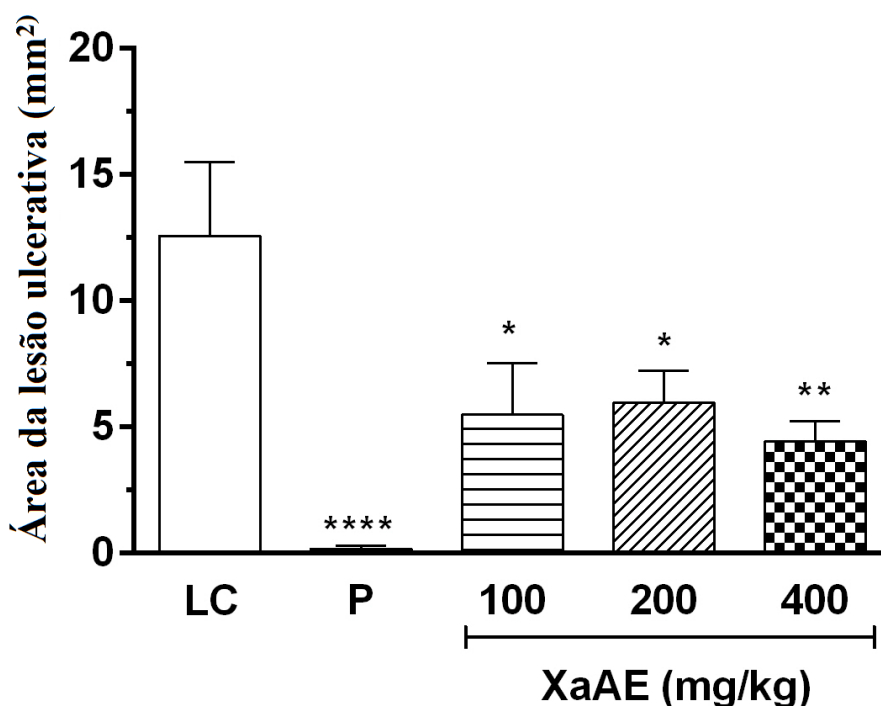


Figura 7 - Efeito gastroprotector do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* (XaAE) em lesões gástricas induzidas por indometacina (30 mg/kg, s.c.) em ratos Wistar. Os animais receberam solução de NaCl 0,9% (controle lesionado, CL, 10 mL/kg, via oral), pantoprazol (P, 40 mg/kg, via oral) ou XaAE (100, 200 e 400 mg/kg, via oral). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (6 a 8 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle lesionado (ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$).

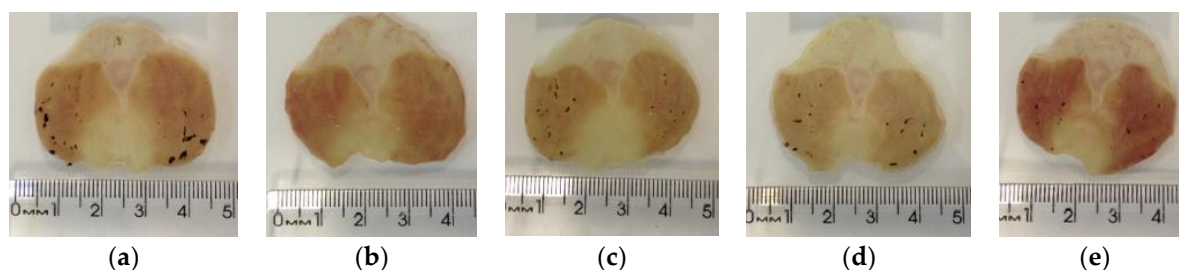


Figura 8 - Fotografia típica do efeito gastroprotector do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* (XaAE) em lesões gástricas induzidas por indometacina (30 mg/kg, s.c.) em ratos. (a) controle lesionado (NaCl 0,9%, 10 mL/kg, via oral); (b) pantoprazol (40 mg/kg, via oral); (c – e) XaAE (100, 200 e 400 mg/kg, via oral, respectivamente).

2.4.4. Avaliação da Atividade Antissecretora

Após quatro horas de ligadura pilórica em ratos, observou-se que o extrato aquoso da casca de *X. americana* (100 mg/kg) reduziu o conteúdo em 48,65% e a acidez total da secreção gástrica em 32,29% quando comparado com o grupo controle lesionado (CL, $0,74 \pm 0,08$ ge $17,90 \pm 1,53$ de Mequiv $[H^+]/mL/4$ h, respectivamente). Ratos tratados com ranitidina tiveram uma redução de 45,95% no conteúdo gástrico secretado e 50,34% na acidez total (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do extrato aquoso de *X. americana* (XaAE) sobre os parâmetros de secreção gástrica em ratos Wistar submetidos à ligadura pilórica.

Grupos	Dose (mg/kg, i.d.)	Conteúdo Gástrico (g)	Valor do pH Gástrico	Acidez Total (Mequiv. $[H^+]/mL/4$ h)
Controle não lesionado	-	$0,23 \pm 0,03$ ****	$4,39 \pm 0,51$ *	$12,13 \pm 2,16$ *
CL	-	$0,74 \pm 0,08$	$3,25 \pm 0,10$	$17,90 \pm 1,53$
Ranitidina	60	$0,40 \pm 0,08$ **	$3,83 \pm 0,15$	$8,89 \pm 0,99$ ***
XaAE	100	$0,38 \pm 0,07$ **	$3,40 \pm 0,08$	$12,12 \pm 0,84$ *

CL: grupo de controle lesionado (NaCl 0,9%, 2,5 mL/kg, intraduodenal). Valores representam médias $\pm$ EPM (5 a 7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle lesionado (ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$).

2.4.5. Avaliação da participação dos grupos sulfidríla (-SH) e óxido nítrico (ON) na proteção gástrica

Como esperado, na ausência de bloqueio, o extrato aquoso de XaAE e a carbenoxolona reduziram as lesões gástricas em ratos em 74,17% e 82,69%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle lesionado (CL, $137,40 \pm 18,90 \text{ mm}^2$). No entanto, na presença de bloqueio, ou seja, na presença do inibidor do grupo sulfidríla N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg, i.p.), o efeito gastroprotetor do extrato aquoso de *X. americana* foi revertido (9,92%) quando comparado ao grupo controle lesionado (CL, $311,60 \pm 40,82 \text{ mm}^2$). Por sua vez, a carbenoxolona continuou ativa, promovendo redução significativa de 74,48% das lesões gástricas. As comparações entre os grupos antes e depois do bloqueio também são mostradas na Figura 9.

As administrações do extrato aquoso de *X. americana* e da carbenoxolona reduziram a área de lesão gástrica nos ratos em 64,00% e 45,10%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle lesionado (CL, $109,43 \pm 16,08 \text{ mm}^2$) na condição não-bloqueada. No entanto, após o bloqueio com o inibidor da sintase do óxido nítrico, N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 70 mg/kg, i.p.), não houve efeito inibitório do extrato aquoso de *X. americana* e carbenoxolona nas lesões gástricas em relação ao grupo controle lesionado ($199,20 \pm 31,86 \text{ mm}^2$). As comparações entre os grupos antes e depois do bloqueio também são mostradas na Figura 10. A depleção dos grupos sulfidríla e óxido nítrico pelo pré-tratamento com NEM e L-NAME, respectivamente, foi capaz de eliminar o efeito gastroprotetor de XaAE.

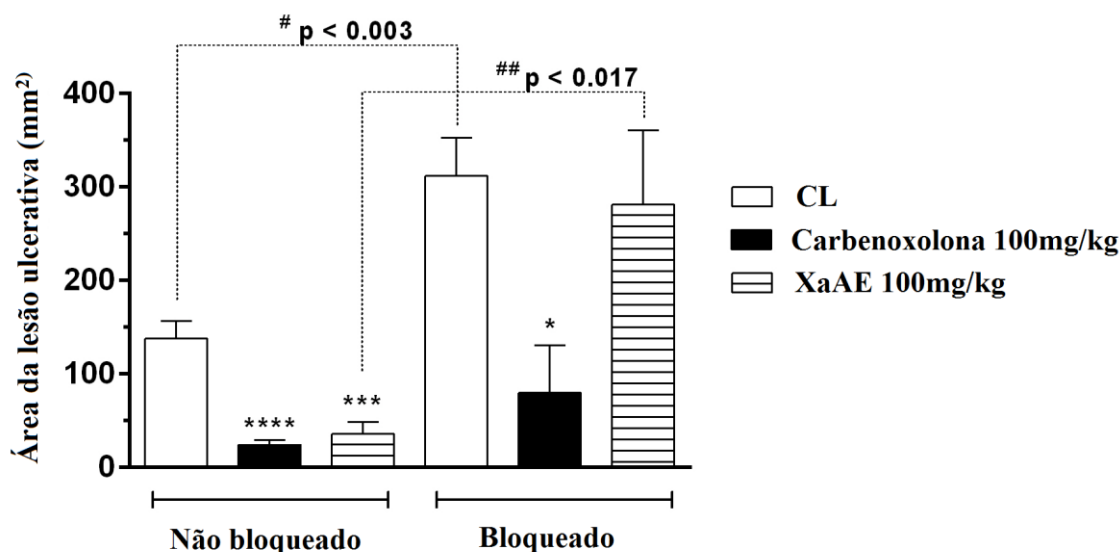


Figura 9 - Efeito gastroprotetor da casca do caule do extrato aquoso de *X. americana* (XaAE) em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto (99%, 1 mL, por via oral) em ratos Wistar antes (não bloqueado, NaCl 0,9%, 10 mL/kg, i.p.) e depois do tratamento (bloqueado) com NEM (10 mg/kg, i.p.). Os animais receberam solução de NaCl 0,9% por via oral (controle lesionado, CL, 10 mL/kg), carbenoxolona (via oral) ou XaAE (via oral). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (6-7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle lesionado (ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$). # Os grupos controle não bloqueado e bloqueado foram comparados através do teste t de Student não pareado, ## Os grupos XaAE 100 mg/kg não bloqueados e bloqueados foram comparados através do teste t de Student não pareado.

2.4.6. Determinação da Concentração de Muco da Mucosa Gástrica

A ligação do piloro nos ratos do grupo controle lesionado promoveu uma redução significativa nos níveis de muco gástrico ($7,89 \pm 0,56$ μ g de azul de Alcian/g de tecido) em comparação com os do grupo falso-operado (não lesionado, $13,35 \pm 0,96$ μ g de azul de Alcian/g de tecido).

Ratos tratados com XaAE não apresentaram aumento dos níveis de muco gástrico ($5,93 \pm 0,26$ μ g de azul de Alcian/g de tecido) em comparação com o grupo controle lesionado (CL, $7,89 \pm 0,56$ μ g de azul de Alcian/g de tecido). Entretanto, a carbenoxolona (CBX, 200 mg/kg) promoveu um aumento significativo nos níveis de muco gástrico de 148,79% em relação ao grupo controle lesionado (Figura 11).

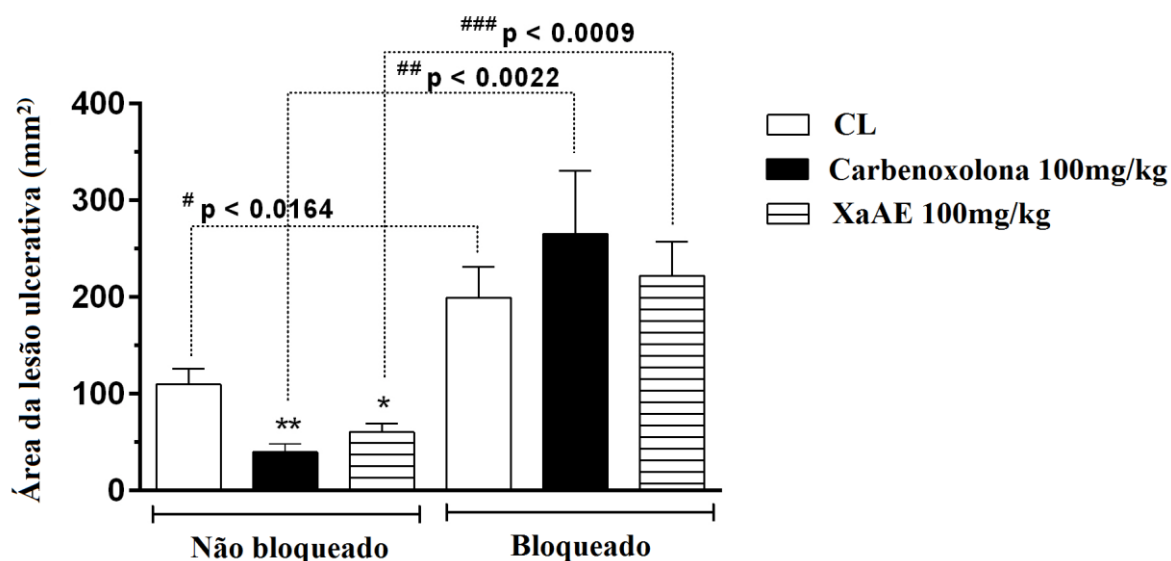


Figura 10 - Efeito gastroprotetor da casca do caule do extrato aquoso (XaAE) sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto (99%, 1 mL, por via oral) em ratos Wistar antes (não bloqueado, NaCl 0,9%, 10 mL/kg, i.p.) e após (bloqueado) tratamento com L-NAME (70 mg/kg, i.p.). Os animais receberam solução de NaCl 0,9% por via oral (controle lesionado, CL, 10 mL/kg), carbenoxolona (via oral) ou XaAE (via oral). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (6-7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle lesionado (ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$). # Os grupos de controle não bloqueado e bloqueado foram comparados através do teste t de Student não pareado. Os grupos de 100 mg/kg de carbenoxolona não bloqueado e bloqueado foram comparados através do teste t de Student não pareado. ### Os grupos XaAE 100 mg/kg não bloqueado e bloqueado foram comparados pelo teste t de Student não pareado.

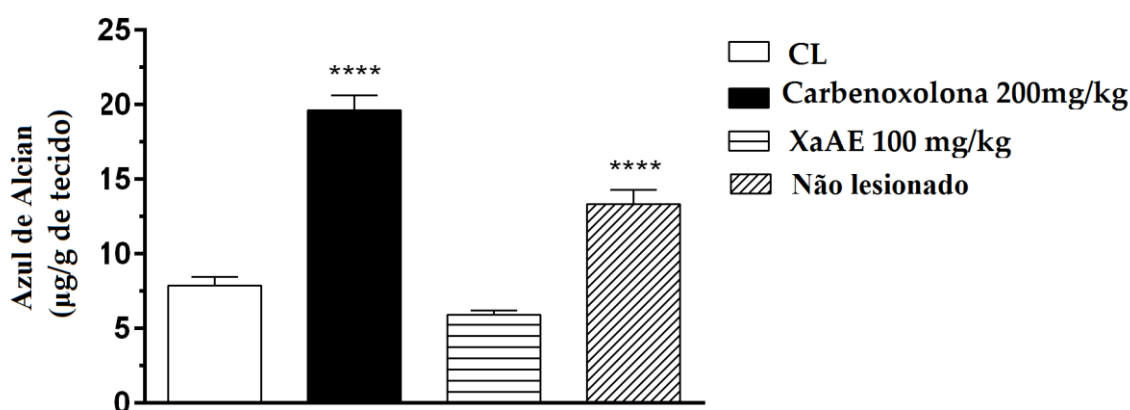


Figura 11 - Efeito do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* (XaAE) sobre o conteúdo de muco gástrico após a ligação do piloro em ratos Wistar. Os animais receberam solução de NaCl 0,9% por via oral (controle lesionado, CL, 10 mL/kg), carbenoxolona (via oral) ou XaAE (via oral). O grupo não lesionado não recebeu tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (6-7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle lesionado (ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, **** $p < 0,0001$).

3. Discussão

Este estudo investigou a atividade farmacológica antiulcerogênica do extrato aquoso de casca de caule *X. americana* sobre lesões gástricas agudas induzidas por etanol, etanol acidificado (HCl/etanol) e indometacina, bem como sua influência sobre parâmetros de secreção ácida gástrica, e grupos sulfidríla, óxido nítrico e muco.

Os resultados obtidos demonstram pela primeira vez que o extrato aquoso do *X. americana* possui efeito gastroprotetor nos modelos agudos testados. Esses modelos são os mais utilizados por representarem os agentes etiológicos mais comumente envolvidos nas úlceras gástricas [19]. Ácido clorídrico, radicais livres, etanol e anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e *H. pylori* são alguns dos fatores agressivos [4,20,21].

No teste de toxicidade aguda, o extrato aquoso de *X. americana*, quando administrado oralmente na dose de 2000 mg/kg, não produziu sinais de toxicidade ou morte. Estes dados indicam que a sua DL_{50} é superior a 2000 mg/kg e, portanto, pode ser considerada não tóxica nas presentes condições experimentais. Embora Maikai et al. [22] não registraram perda por morte ($DL_{50} > 5.000$ mg/kg) em camundongos e ratos pela administração oral e intraperitoneal do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana*, foram observados sinais clínicos de

toxicidade como excitação, inquietação, dificuldade respiratória, perda de apetite, fraqueza geral e depressão em altas doses, bem como perda de massa corporal. Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Agyigra et al. [23] que estimaram uma DL_{50} pela administração oral do extrato metanólico da casca do caule *X. americana* de mais de 5000 mg/kg em ratos e camundongos.

O etanol é considerado um dos agentes mais intensos que induz lesões gástricas, pois promove distúrbios sérios da mucosa devido à sua ação direta, enquanto que a acidez gástrica tem pouco efeito sobre a formação de úlceras [24,25].

As lesões formadas pelo etanol resultam de uma série de fatores como redução da produção de muco gástrico, prostaglandinas e grupos sulfidríla, diminuição da motilidade gástrica, potencial transmucoso alterado e fluxo sanguíneo da mucosa gástrica alterado, como aumento da geração de radicais livres, liberação de histamina, isquemia e permeabilidade vascular gástrica [20]. Sua administração produz lesões hemorrágicas e necróticas na mucosa consistindo em bandas alongadas geralmente paralelas ao eixo longitudinal do estômago [26]. A presença de HCl acelera o processo [24]. A administração oral de XaAE reduziu as lesões gástricas induzidas por etanol e HCl/etanol em todas as doses testadas, indicando uma ação gastroprotetora.

Há relato de que a indometacina diminui a atividade de enzimas antioxidantes [27], aumenta o estresse oxidativo e inibe a ciclooxigenase (COX), induzindo a ulceração gástrica no estômago [28,29]. Este mecanismo ulcerogênico da indometacina é atribuído a uma secreção reduzida de bicarbonato, fluxo de muco e sangue e inibição do reparo da mucosa [30].

No modelo de úlcera aguda induzida por indometacina, no qual as prostaglandinas são suprimidas, o extrato foi capaz de reduzir as lesões gástricas, inicialmente sugerindo uma ação inibitória na via da ciclooxigenase, reduzindo a produção de prostaglandinas citoprotetoras. Entretanto, outros mecanismos podem contribuir para essa atividade, uma vez que Soro [12] demonstrou que o extrato aquoso da casca do caule *X. americana* (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) apresentou atividade analgésica em ensaios de contorções abdominais por ácido acético e formalina apenas na 2ª fase, que caracteriza a possível ação anti-inflamatória do extrato.

Os inibidores da bomba de prótons são “pró-fármacos” considerados muito eficazes e relativamente equivalentes, reduzindo em até 95% a produção diária de ácido gástrico [31]. O pantoprazol tem um perfil farmacocinético linear (e, portanto, mais previsível), menor biodisponibilidade variável e um rápido início de ação quando comparado a outros representantes de classe, como o omeprazol e o lansoprazol [32]. Em todos os modelos de

indução de lesões gástricas agudas, ratos tratados com pantoprazol mostraram redução da área lesionada.

O estudo fitoquímico determinou a presença de alcalóides, flavonóides, lignanas, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, naftoquinonas, saponinas, taninos hidrolisáveis, triterpenos e esteróides. O HPLC-DAD-MS/MS identificou procianidinas B, procianidina C e catequina/epicatequina como os compostos mais abundantes.

Atualmente, não há como atribuir a atividade gastroprotetora a algum dos principais compostos identificados e, conseqüentemente, estimar a sua potência. Pretendemos tentar correlacionar o efeito do extrato com aqueles obtidos a partir dos compostos isolados. No entanto, a possibilidade de interações sinérgicas entre esses compostos no extrato bruto pode dificultar o estabelecimento de alguma correlação.

Shettar [13] relatou a presença de flavonóides em análises fitoquímicas e seu alto potencial antioxidante do extrato aquoso de folhas de *X. americana*. Seus estudos sugerem que as folhas podem ser usadas como antioxidantes naturais para prevenir a incidência e a progressão de muitas doenças. Nos últimos anos, os flavonóides têm sido os compostos naturais mais estudados com potencial para atividade antiúlcera [33-35]. Neste grupo, as catequinas são aquelas com o mecanismo de ação mais bem definido, que incluem a inibição da histidina descarboxilase [19,36] e a inibição da bomba de prótons [37].

A atividade gastroprotetora da epicatequina também foi relatada por Rozza et al. [38] que demonstraram que essa proteção da mucosa ocorre pela estimulação do aumento da barreira mucosa e pela neutralização do suco gástrico, bem como pelo envolvimento de compostos SH, ativação adrenérgica, NO, SOD e HSP-70. A catequina e seus derivados atuam como agentes gastroprotetores pela inibição da H^+ , K^+ -ATPase gástrica [37]. A catequina também demonstrou um mecanismo gastroprotetor da ação endócrina, reduzindo os níveis de gastrina e histamina [39]. Lewis [40] também demonstrou a atividade gastroprotetora da proantocianidina B-2 em camundongos contra lesões gástricas induzidas por estresse.

A obstrução promovida pela ligadura pilórica causa acúmulo de ácido no conteúdo gástrico e distensão exagerada da mucosa, levando à hipersecreção gástrica e à formação de lesões [41]. Além disso, a formação de histamina endógena e sua liberação dos mastócitos também estão relacionadas à patogênese das úlceras gástricas produzidas por ligadura pilórica, sugerindo que os anti-histamínicos H_2 e os inibidores da histidina descarboxilase podem ser úteis na prevenção dessas lesões [36]. Neste modelo, o tratamento com o extrato aquoso da casca do caule *X. americana* reduziu tanto o volume quanto a acidez total do suco gástrico, os principais parâmetros da secreção gástrica basal. Considerando que a inibição da bomba de prótons é um dos

mecanismos de ação associados às catequinas [37], é possível sugerir que a ação inibitória da acidez gástrica de XaAE possa estar relacionada à presença desses constituintes.

Com o intuito de compreender os mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora promovida pelos XaAE, modelos experimentais têm sido realizados com o intuito de investigar a participação dos grupos sulfidrílica (-SH), óxido nítrico e muco.

Os compostos sulfidrílicos endógenos são importantes para manter a integridade da mucosa gástrica, participando da produção de muco e da ligação aos radicais livres formados durante a inflamação ou exposição a agentes nocivos, promovendo a neutralização [42,43]. O etanol diminui a atividade dos grupos -SH, causando estresse oxidativo, e confirmando o envolvimento desses grupos com o efeito gastroprotetor [43]. Segundo El-Ashmawy et al. [44], o extrato de alho, que é rico em compostos sulfidrílicos, demonstrou atividade antioxidante e anti-inflamatória necessária para a proteção da mucosa gástrica.

Alterações no status redox intracelular, incluindo o aumento nos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), diminuição dos níveis de compostos sulfidrílicos e principalmente peroxidação, são importantes marcadores de estresse oxidativo envolvido na patogênese de várias doenças inflamatórias ou tumorais [45,46]. No entanto, vários estudos sugerem o efeito protetor de plantas medicinais e extratos no tratamento e prevenção da carga de estresse oxidativo tecidual, com uma melhora significativa nos níveis de biomarcadores de peroxidação lipídica [47-49].

Neste estudo, os dados demonstraram que a exposição gástrica ao etanol associada à depleção dos compostos sulfidrílicos promovida pelo NEM (inibidor do grupo -SH) diminuiu a proteção gástrica da mucosa. Nossos resultados também mostraram que o tratamento com NEM eliminou o efeito gastroprotetor do extrato previamente observado, sugerindo uma possível participação dos grupos sulfidrílica em sua ação.

O ON também desempenha um papel defensivo na mucosa, regulando o fluxo sanguíneo e estimulando a secreção de muco gástrico pela ativação da enzima guanilil ciclase [50]. A inibição da sintase do óxido nítrico (SON) pelo L-NAME resulta em uma diminuição desse mediador endógeno e, conseqüentemente, um aumento da lesão gástrica [51]. Em nosso experimento, o bloqueio da SON pelo L-NAME promoveu aumento significativo das lesões gástricas e também reverteu a ação gastroprotetora do extrato aquoso de *X. americana*, indicando também uma possível contribuição deste mediador. Deve-se notar que, embora a dose de 70 mg/kg de L-NAME com foco em mecanismos de proteção gástrica envolvendo o papel do óxido nítrico como mediador dessa proteção tenha sido obtida de estudos na

literatura [51-54], essa mesma dose também é capaz de aumentar a pressão arterial de ratos [55].

A função primária da camada de muco é estrutural, criando uma camada estável que suporta o contato superficial com o ácido e atuando como uma barreira física protetora contra a pepsina luminal. A secreção de bicarbonato (HCO_3^-) aderido à camada de muco (gel estável e aderente) cria um gradiente de pH quase neutro na superfície epitelial do estômago e do duodeno, fornecendo a primeira linha de defesa contra o ácido luminal [56].

A carbenoxolona, o agente citoprotetor usado como controle padrão no modelo de determinação da concentração de muco gástrico, é um derivado semissintético do ácido glicirrízico, o princípio ativo de *Glycyrrhiza glabra*, que tem sido extensivamente estudado e relatado como tendo efeito antiúlcera em animais experimentais e humanos [7]. A carbenoxolona mantém o conteúdo de prostaglandinas da mucosa gástrica em níveis elevados devido à sua ação inibitória sobre as enzimas catabólicas 15-hidroxi-prostaglandina-desidrogenase e $\Delta 13$ -prostaglandina-redutase, além de aumentar os níveis de AMP cíclico pela inibição das fosfodiesterases da mucosa. Altos níveis de prostaglandinas promovem a ação de defesa da mucosa contra a ulceração [40]. Nossos dados mostram que a carbenoxolona aumentou a concentração de azul de Alcian complexada a muco, mas este efeito não foi verificado com o extrato de *X. americana*, rejeitando inicialmente a hipótese da contribuição do muco no efeito gastroprotetor do extrato.

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta de Material Vegetal

A casca do caule de *X. americana* L. foi coletada em Letras rach (Coordenadas: 08°14'05.69'' S, 039°09'31.39'' W, 425 m de altitude), no município de Salgueiro, estado de Pernambuco, Brasil, durante o período de floração em novembro de 2015. Bastante material das espécies amostradas foi depositado no Herbário Trópico Semiárido (HTSA) da Embrapa, no município de Petrolina, estado de Pernambuco, sob o número de registro HTSA 6633.

4.2. Preparação do Extrato e Perfil Fitoquímico (TLC)

Para preparar o extrato, as cascas dos caules foram pulverizadas em um moinho de facas (Wyllie Macro - TE 650) e então imersas em água destilada, utilizando a proporção de 20% de seu peso seco, e reservadas por 24 h. A solução foi então filtrada e liofilizada. O rendimento do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. (XaAE) foi de 15,76% (p/p), que foi armazenado sob refrigeração (6 a 10°C) até os testes farmacológicos e análises

fitoquímicas. O extrato foi previamente analisado por cromatografia em camada delgada (thin layer chromatography - TLC) para identificar as classes fitoquímicas [57].

4.3. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC-DAD-MS/MS)

O extrato foi submetido à Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) utilizando uma coluna de octadecilsilano ($250 \times 4,6$ mm, 5 μ m, Luna C₁₈, Phenomenex-Shimadzu, Kyoto, Japão) como fase estacionária; e a fase móvel consistiu de 2 solventes: solvente A - ácido fórmico 0,1% em água ultrapura; e solvente B - ácido fórmico 0,1% em metanol (para HPLC) com taxa de fluxo de 1,0 mL/min.

A fase estacionária foi mantida a 30°C e o volume injetado foi de 20 μ L para as amostras (1 mg/mL) na cromatografia líquida de alta resolução acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS) para análises monitoradas de 190 a 400 nm e 50 a 1000 m/z . As análises utilizaram um LC-20 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um sistema de bombas quaternárias modelo LC-20ADVP, degaseificador modelo DGU-20A, detector modelo PDA SPD-20AVP, forno modelo CTO-20ASVP, injetor automático modelo SIL-20ADVP e controlador modelo SCL-20AVP acoplado a um espectrômetro de massa da AmaZonL (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) equipado com uma fonte de ionização por electropulverização operando no modo de analisador e por captura de íons positivos e negativos para dividir o eluente de HPLC e um fluxo de 0,2 mL/min foi introduzida na fonte. Foram utilizados os seguintes parâmetros do espectrômetro de massas: tensão capilar de 3,5 kV; temperatura de dessolvatação de 320°C; fluxo de gás de 10 L/min; e pressão de 60 psi, usando nitrogênio como gás de secagem e nebulização.

4.4. Animais

Ratos Wistar de três meses de idade (*Rattus norvegicus*) e camundongos Swiss (*Mus musculus*) de ambos os sexos foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (DFF/UFPE) e Aggeu Magalhães/Fiocruz Centro de Pesquisa (CPqAM/Fiocruz), respectivamente. Os animais foram mantidos sob condições controladas de iluminação, temperatura ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) e umidade (55–60%), e receberam água padrão e dieta *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFPE (Processo 0021/2016).

4.5. Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda foi avaliada em camundongos Swiss de ambos os sexos ($n = 3/\text{grupo}$) [58]. Os animais foram privados de alimentos durante 12 h e depois receberam uma dose oral única de XaAE (2000 mg/kg) ou veículo (solução de NaCl a 0,9%, 10 mL/kg). Após a administração, os animais foram observados individualmente durante os intervalos de 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 min e, diariamente, por 14 dias. Os seguintes parâmetros foram avaliados: alterações comportamentais, sinais clínicos de toxicidade, consumo de água e consumo de ração (não cumulativo), e variação da massa corporal [59].

4.6. *Protocolos Experimentais*

4.6.1. Indução de Lesões Gástricas por Etanol Absoluto

Após 16 h de jejum, os animais ($n = 6-7/\text{grupo}$) foram pré-tratados via oral com NaCl 0,9% (controle lesionado, CL), pantoprazol (P, 40 mg/kg) ou XaAE (100, 200 e 400 mg/kg) uma hora antes da administração do agente ulcerogênico (etanol absoluto, 1 mL, via oral) de acordo com o método descrito [60], com pequenas modificações. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ uma hora após a indução das lesões. Os estômagos foram removidos, fotografados e a área da úlcera gástrica foi determinada com o auxílio do Image J Software versão 1.4 (Bethesda, MD, EUA). Os resultados são expressos como área de lesão ulcerativa (mm²).

4.6.2. Indução de Lesões Gástricas por Etanol Acidificado (HCl/Etanol)

Após 16 h de jejum, os animais ($n = 6-7/\text{grupo}$) foram pré-tratados via oral com solução de NaCl 0,9% (controle lesionado, CL), pantoprazol (P, 40 mg/kg) ou XaAE (100, 200 e 400 mg/kg) uma hora antes da administração do agente ulcerogênico (solução 0,3 M HCl/60% etanol, 1 mL por via oral) de acordo com o método descrito [61], com pequenas modificações. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as áreas de úlcera gástrica foram determinadas conforme descrito anteriormente.

4.6.3. Indução de Lesões Gástricas por Indometacina

Após 16 h de jejum, os animais ($n = 6-8/\text{grupo}$) foram pré-tratados via oral com NaCl 0,9% (CL, controle lesionado), pantoprazol (P, 40 mg/kg) ou XaAE (100, 200 e 400 mg/kg). Após 30 min de tratamento, as lesões gástricas foram induzidas com indometacina (30 mg/kg, s.c.) de acordo com o método descrito [62], com pequenas modificações. Os animais foram

eutanasiados em câmara de CO₂ 6 h após a indução das lesões e as áreas de úlcera gástrica foram determinadas conforme descrito anteriormente.

4.6.4. Avaliação de Atividade Antissecretora

Essa metodologia foi realizada de acordo com o protocolo descrito anteriormente [63], com algumas adaptações. Os animais foram divididos em 4 grupos ($n = 5-7$) e submetidos a jejum por 16 horas, com livre acesso a solução aquosa de glicosídeo 5%. Para a ligadura do piloro, os animais foram anestesiados (xilazina 6 mg/kg associada com cetamina 60 mg/kg, i.p.), o abdômen foi aberto para exposição do estômago e o piloro foi amarrado com uma sutura. Imediatamente após a ligação do piloro foram administrados via intraduodenal solução de NaCl 0,9% (controle lesionado), ranitidina (60 mg/kg) ou XaAE (100 mg/kg); a parede abdominal também foi suturada. Quatro horas depois, os animais foram eutanasiados por asfixia com CO₂, o esôfago foi comprimido, o estômago removido e o conteúdo gástrico coletado e centrifugado a $176 \times g/30$ min. O peso e pH do conteúdo gástrico foram determinados. A acidez total do conteúdo gástrico foi determinada por titulação, usando 1% de fenolftaleína como indicador. A concentração total do ácido foi expressa como Mequiv. $[H^+]/mL/4$ h. Para este experimento, foi utilizado um grupo controle não lesionado, no qual os animais não receberam tratamento intraduodenal, mas foram submetidos a estresse cirúrgico.

4.6.5. Avaliação da Participação dos Grupos Sulfidríla (-SH) e Óxido Nítrico (NO) na Proteção Gástrica

Para determinação do papel dos grupos sulfidríla e óxido nítrico, após 24 h de jejum, os animais foram separados em 12 grupos ($n = 6-7$). Três grupos receberam pré-tratamento com NaCl 0,9% (controle lesionado, i.p.) e três grupos com N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg, i.p.). Para avaliar a participação do ON, três grupos foram pré-tratados com NaCl 0,9% (controle lesionado, ip) e três grupos tratados com éster metil-nitro-L-arginina-metilico (L-NAME, 70 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos de pré-tratamento, cada grupo recebeu uma dose oral de NaCl 0,9% carbenoxolona (CBX, 100 mg/kg) e XaAE (100 mg/kg). Após 1 h, todos os animais receberam 1 mL de etanol absoluto (via oral) para indução de lesões gástricas. Após 1 h de administração de etanol, os ratos foram eutanasiados numa câmara de CO₂, os estômagos foram removidos e abertos ao longo da curvatura maior. Os estômagos foram removidos, fotografados e a área de lesão gástrica foi determinada com o auxílio da Image J Software. Os resultados foram expressos como área de lesão ulcerativa (mm²) [51,64].

4.6.6. Determinação da Concentração de Muco da Mucosa Gástrica

O conteúdo de glicosaminoglicanos solúveis na mucosa gástrica foi investigado usando o corante azul de Alcian, específico para mucinas ácidas. Os animais foram divididos em quatro grupos ($n = 6-7$): NaCl 0,9% (controle lesionado), carbenoxolona (CBX, 200 mg/kg), XaAE (100 mg/kg) e Sham-operado (controle não lesionado). Após 1 h de tratamento, os animais foram anestesiados (xilazina, 6 mg/kg associada a cetamina, 60 mg/kg, i.p.) e o piloro foi amarrado. Após 4 h da ligadura, os animais foram eutanasiados, e o esôfago foi comprimido para que o conteúdo estomacal não fosse perdido. Os estômagos foram removidos, lavados com água destilada, secos e abertos ao longo da grande curvatura para remover o material gástrico a ser pesado. A porção não glandular foi descartada e a porção glandular foi pesada e reservada em recipiente individual com 10 mL de solução de 0,1% de azul de Alcian por 2 h. O excesso de corante foi removido por lavagem do estômago com 7 mL de solução de sacarose 0,25 mol/L; uma primeira lavagem foi realizada por 15 min e uma segunda por 45 min. O corante complexou com o muco da parede do estômago e foi removido com 10 mL de solução de cloreto de magnésio a 0,5 mol/L, misturado por vórtice, por 1 min em intervalos de 30 min, por 2 h. Os estômagos foram removidos e os tubos Falcon com a solução foram armazenados na geladeira por aproximadamente 8 h. Após esse tempo, os tubos foram agitados por 1 min; foram coletadas alíquotas de 4 mL e adicionadas a 4 mL de éter etílico e agitadas em vórtice por 2 min. A emulsão obtida foi centrifugada durante 10 min a 1016,6^x g/ 25°C. Os tubos foram colocados num banho de gelo; foi descartado o filme formado acima do sobrenadante e a fase aquosa foi separada. Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 595 nm e interpolados em uma curva padrão de azul de Alcian (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL) para calcular a concentração (µg) do corante retido no estômago em relação ao grupo controle [65].

4.6.7. Análises Estatísticas

Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. O nível de significância para rejeição da hipótese nula foi de 5% ($p < 0,05$). Para a toxicidade aguda e a influência dos grupos sulfidrido e óxido nítrico na proteção gástrica, foi utilizado um teste t de Student não pareado para verificar as diferenças estatísticas entre os dois grupos. As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Califórnia, EUA).

5. Conclusões

O conjunto de resultados indica que o extrato aquoso de *X. americana* possui ação gastroprotetora cujo mecanismo de ação inicial envolve a participação de grupos sulfidril, óxido nítrico e atividade antissecretora. Os dados também indicam que os flavonóides, procianidinas B, procianidinas C e catequina/epicatequina, identificados como constituintes principais, estão relacionados a essa atividade.

Agradecimentos: Prof. Norberto Peporine Lopes e José Carlos Tomaz do Centro de Espectrometria de Massa de Micromoléculas Orgânicas (CEMMO) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto) por nos permitirem utilizar o LC-MS.

Contribuições dos autores: T.P.A., L.D.K.T.d.P. e S.A.B. foram responsáveis pelo desenvolvimento de protocolos experimentais. J.R.G.d.S.A. contribuiu para a preparação do extrato aquoso. P.J.R.N. e L.A.R. foram responsáveis pela análise cromatográfica. A.G.W., G.F.R.C. e T.P.A. conduziram as análises, interpretaram os dados e redigiram o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Nascimento, R.F.; Sales, I.R.P.; Formiga, R.O.; Barbosa-Filho, J.M.; Sobral, M.V.; Tavares, J.F.; Diniz, M.F.F.M.; Batista, L.M. Review: Activity of alkaloids on peptic ulcer: What's new? *Molecules* **2015**, *20*, 929–950.
2. Magierowski, M.; Magierowska, K.; Kwiecien, S.; Brzozowski, T. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. *Molecules* **2015**, *20*, 9099–9123.
3. Almeida, C.L.F.; Brito, S.A.; Santana, T.I.; Costa, H.B.A.; Júnior, C.H.R.C.; Silva, M.V.; Almeida, L.L.A.; Rolim, L.A.; Santos, V.L.; Wanderley, A.G.; et al. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–14.
4. Cheung, K.S.; Chan, E.W.; Wong, A.Y.S.; Chen, L.; Wong, I.C.K.; Leung, W.K. Long-term proton pump inhibitors and risk of gastric cancer development after treatment for

- Helicobacter pylori*: A population-based study. *Gut* **2017**, doi:10.1136/gutjnl-2017-314605.
5. Olatunji, O.J.; Chen, H.; Zhou, Y. Anti-ulcerogenic properties of lycium chinense mill extracts against ethanol-induced acute gastric lesion in animal models and its active constituents. *Molecules* **2015**, *20*, 22553–22564.
 6. Madanick, R.D. Proton pump inhibitor side effects and drug interactions: Much ado about nothing? *Clevel. Clin. J. Med.* **2011**, *78*, 39–49.
 7. Takeuchi, K.; Yagi, K.; Kitamura, M.; Kubomi, M. Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by carbenoxolone in rats: A comparative study with prostaglandin E2. *Gen. Pharmacol.* **1998**, *30*, 739–744.
 8. Windolf, J.F.P. The first botanical record for Australia. *Austrobaileya* **2000**, *5*, 721–723.
 9. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Medicinais No Brasil: Nativas e Exóticas*, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, São Paulo, Brasil, 2008; pp. 399–400.
 10. Souza, R.K.; Silva, M.A.; Menezes, I.R.; Ribeiro, D.A.; Bezerra, L.R.; Souza, M.M. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Braz. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *157*, 99–104.
 11. Olabissi, O. A.; Moussa, O.; Moustapha, O.; Edgard, Z. F.; Eléonore, K.; Marius, L.; Pierre, G. I. Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). *African J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *5*, 806–811.
 12. Soro, T.Y.; Traore, F.; Sakande, J. Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *C. R. Biol.* **2009**, *332*, 371–377.
 13. Shettar, A.K.; Kotresha, K.; Kaliwal, B.B.; Vedamurthy, A.B. Evaluation of in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ximenia americana* extracts. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2015**, *5*, 918–923.
 14. Almeida, M.L.B.; Freitas, W.E.S.; Morais, P.L.D.; Sarmiento, J.D.A.; Alves, R.E. Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. *Food Chem.* **2016**, *192*, 1078–1082.
 15. Traore, M.S.; Balde, M.A.; Camara, A.; Balde, E.S.; Diane, S.; Diallo, M.S.T.; Keita, A.; Cos, P.; Maes, L.; Pieters, L.; et al. The malaria co-infection challenge: An investigation into the antimicrobial activity of selected Guinean medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *174*, 576–581.
 16. Morais-Costa, F.; Soares, A.C.M.; Bastos, G.A.; Nunes, Y.R.F.; Gerashev, L.C.; Braga, F.C.; Lima, W.D.; Duarte, E.R. Plants of the Cerrado naturally selected by grazing sheep

- may have potential for inhibiting development of *Haemonchus contortus* larva. *Trop. Anim. Health Prod.* **2015**, *47*, 1321–1328.
17. Pervaiz, A.; Adwan, H.; Berger, M.R. Riproximin: A type II ribosome inactivating protein with antineoplastic potential induces IL24/MDA7 and GADD genes in colorectal cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 981–990.
 18. Callemien, D.; Collin, S. Use of RP-HPLC-ESI(–)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2008**, *66*, 109–115.
 19. Lapa, J.A.; Souccar, C.; Lima-Landman, T.R.; Lima, T.C.M. *Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais*; CYTED/CNPQ: Brasília, Brasil, 2002; pp. 28–59.
 20. Glavin, G.B.; Szabo, S. Experimental gastric mucosal injury: Laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB J.* **1992**, *6*, 825–831.
 21. Stewart, D.J.; Ackroyd, R. Peptic ulcers and their complications. *Surgery* **2011**, *29*, 568–574.
 22. Maikai, V.A.; Kobo, P.I.; Adaudi, A.O. Acute toxicity studies of aqueous stem bark extract of *Ximenia americana*. *African J. Biotechnol.* **2008**, *7*, 1600–1603.
 23. Agyigra, I.A.; Ejiofor, J.I.; Magaji, M.G. Acute and subchronic toxicity evaluation of methanol stem-bark extract of *Ximenia americana* Linn. (Olacaceae) in Wistar rats. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **2017**, *55*, 263–267, doi:10.1016/j.bfopcu.2017.08.004.
 24. Szabo, S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: Time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand. J. Gastroenterol.* **1987**, *22*, 21–28.
 25. Hiruma-Lima, C.A.; Batista, L.M.; Almeida, A.B.A.; Magri, L.P.; Santos, L.C.; Vilegas, W.; Brito, A.R.M.S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *122*, 406–409.
 26. Sagradas, J.; Costa, G.; Figueirinha, A.; Castel-Branco, M.M.; Cabrita, A.M.S.; Figueiredo, I.V.; Batista, M.T. Gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* infusion on acute ethanol-induced gastric lesions in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *173*, 134–138.
 27. Sabiu, S.; Garuba, T.; Sunmonu, T.; Ajani, E.; Sulyman, A.; Nurain, I.; Balogun, A. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: Protective roles of *Spondias mombin* and *Ficus exasperate*. *Toxicol. Rep.* **2015**, *2*, 261–267.

28. Olaleye, S.B.; Farombi, E.O. Attenuation of indomethacin- and HCl/ethanol-induced oxidative gastric mucosa damage in rats by kolaviron, a natural biflavonoid of *Garcinia kola* seed. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 14–20.
29. Liu, Y.H.; Zhang, Z.B.; Zheng, Y.F.; Chen, H.M.; Yu, X.T.; Chen, X.Y.; Zhang, X.; Xie, J.H.; Su, Z.Q.; Feng, X.X.; et al. Gastroprotective effect of andrographolide sodium bisulfite against indomethacin-induced gastric ulceration in rats. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *26*, 384–391.
30. Lu, H.; Graham, D.Y. New development in the mechanistic understanding of peptic ulcer diseases. *Drug Discov. Today Discov. Mech.* **2006**, *3*, 431–437.
31. Varannes S.B; Coron E.; Galmiche J.P. Short and long term PPI treatment for GERD. Do we need more potent anti-secretory drugs? *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2010**, *24*, 905–921.
32. Hartmann M.; Theiss U.; Huber R.; Luhmann, R.; Bliesath, H.; Wurst, W.; Luckner, P.W. Twenty-four-hour intragastric pH profiles and pharmacokinetics following single and repeated oral administration of the proton pump inhibitor pantoprazole in comparison to omeprazole. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1996**, *10*, 359–366.
33. Parmar, N.S.; Parmar, S. Anti-ulcer potential of flavonoids. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **1998**, *42*, 343–351.
34. Mota, K.S.L.; Dias, G.E.N.; Pinto, M.E.F.; Luiz-Ferreira, A.; Souza-Brito, A.R.M.; Hiruma-Lima, C.A.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* **2009**, *14*, 979–1012.
35. Gadekar, R.; Singour, P.K.; Chaurasiya, P.K.; Pawar, R.S.; Patil, U.K. Review article: A potential of some medicinal plants as anti-ulcer agents. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4*, 136–146.
36. Parmar, N.S.; Ghosh, M.N. Gastric anti-ulcer activity of (+)-cyanidanol-3, a histidine decarboxylase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* **1981**, *69*, 25–32.
37. Murakami, S.; Muramatsu, M.; Otomo, S. Gastric H⁺, K⁺-ATPase inhibition by catechins. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, *44*, 926–928.
38. Rozza, A.L.; Hiruma-Lima, C.A.; Tanimoto, A.; Pellizzon, C.H. Morphologic and pharmacological investigations in the epicatechin gastroprotective effect. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2012**, *2012*, 1–9.

39. Sato H.; Matsui T.; Arakawa Y. The protective effect of catechin on gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. *J. Gastroenterol.* **2002**, *37*, 106–111, doi:10.1007/s005350200004.
40. Lewis, D.A.; Hanson, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. *Prog. Med. Chem.* **1991**, *28*, 201–231.
41. Baggio, C.H.; Freitas, C.S.; Rieck, L.; Marques, M.C.A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. *Pharmacol. Res.* **2003**, *47*, 93–98.
42. Avila, J.R.; Lastra, C.A.; Martin, M.J.; Moltiva, V.; Luque, I.; Delagado, D.; Esteban, J.; Herrerias, J. Role of endogenous sulphydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.* **1996**, *45*, 83–88.
43. Chen, H.; Liao, H.; Liu, Y.; Zheng, Y.; Wu, X.; Su, Z.; Zhang, X.; Lai, Z.; Lai, X.; Lin, Z.-X.; et al. Protective effects of pogostone from *Pogostemonis* Herba against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Fitoterapia* **2015**, *100*, 110–117.
44. El-Ashmawy N.E.; Khedr E.G.; El-Bahrawy H.A.; Selim, H.M. Gastroprotective effect of garlic in indomethacin induced gastric ulcer in rats. *Nutrition* **2016**, *32*, 849–854.
45. Achitei, D.; Ciobica, A.; Balan, G.; Gologan, E.; Stanciu, C.; Stefanescu, G. Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients. *Dig. Dis. Sci.* **2013**, *58*, 1244–1249.
46. Praticò, D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: New insights. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 563–567.
47. Ferrante, C.; Recinella, L.; Locatelli, M.; Guglielmi, P.; Secci, D.; Leporini, L.; Chiavaroli A.; Leone S.; Martinotti S.; Brunetti L.; et al. Protective effects induced by microwave-assisted aqueous harpagophytum extract on rat cortex synaptosomes challenged with amyloid β -Peptide. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 1257–1264.
48. Locatelli, M.; Ferrante, C.; Carradori, S.; Secci, D.; Leporini, L.; Chiavaroli, A.; Leone, S.; Recinella, L.; Orlando, G.; Martinotti, S.; et al. Optimization of aqueous extraction and biological activity of *harpagophytum procumbens* root on ex vivo rat colon inflammatory model. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 937–944.
49. Menghini, L.; Ferrante, C.; Leporini, L.; Recinella, L.; Chiavaroli, A.; Leone, S.; Pintore, G.; Vacca, M.; Orlando, G.; Brunetti, L. An hydroalcoholic chamomile extract modulates inflammatory and immune response in ht29 cells and isolated rat colon. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 1513–1518.

50. Calvo, T.R.; Lima, Z.P.; Silva, J.S.; Ballesteros, K.V.R.; Pellizzon, C.H.; Hiruma-Lima, C.A.; Tamashiro, J.; Brito, A.R.M.S.; Takahira, R.K.; Vilegas, W. Constituents and antiulcer effect of *alchornea glandulosa*: Activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 451–459.
51. 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. *Pharmacol. Lett.* **1999**, *65*, 27–32.
52. Bonamin, F.; Moraes, T.M.; Santos, R.C.; Kushima, H.; Faria, F.M.; Silva, M.A.; Junior, I.V.; Nogueira, L.; Bauab, T.M.; Souza Brito, A.R.M.; et al. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *212*, 11–19.
53. Ribeiro, A.R.S.; Diniz, P.B.F.; Pinheiro, M.S.; Albuquerque-Júnior, R.L.C.; Thomazzi, S.M. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive $K^{(+)}$ channels, and gastric mucus secretion. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *244*, 121–128.
54. Da Rosa, R.L.; De Almeida, C.L.; Somensi, L.B.; Boeing, T.; Mariano, L.N.B.; De Medeiros, A.K.C.; De Souza, P.; Filho, V.C.; Da Silva, L.M.; De Andrade, S.F. *Chrysophyllum cainito* (apple-star): A fruit with gastroprotective activity in experimental ulcer models. *Inflammopharmacology* **2017**, doi:10.1007/s10787-017-0427-z.
55. Yildirim, F.I.A.; Kizilay, D.E.; Ergin, B.; Ekmekçi, O.B.; Topal, G.; Kucur, M.; Tansel, C.D.; Doğan, B.S.U. Barnidipine ameliorates the vascular and renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *764*, 433–442.
56. Allen, A.; Flemström, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: Protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2005**, *288*, 1–19.
57. Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis—A Thin Layer Chromatography Atlas*; 2nd ed.; Springer: Berlin, Germany, 1996; p. 384.
58. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guidance No. 425. Acute Oral Toxicity—Up-and-Down Procedure, Adopted 17 December 2001. Available online: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948378.pdf> (accessed on 5 November 2017).

59. Malone, M.H. *Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York, 1977; pp. 24 -53.
60. 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* **1979**, 77, 433–443.
61. Mizui, T.; Douteuchi, M. Effect of polyamines on acidified ethanol gastric lesions in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **1983**, 3, 939–945.
62. Djahanguri, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* **1969**, 4, 265–267.
63. 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* **1945**, 5, 43–61.
64. Arrieta, J.; Benitez, J.; Flores, E.; Castillo, C.; Navarrete, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* **2003**, 69, 905–909.
65. Rafatullah, S.; Tariq, M.; Al-Yahya, M.A.; Mossa, J.S.; Ageel, A.M. Evaluation of Turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *J. Ethnopharmacol.* **1990**, 29, 25–34.

Disponibilidade da Amostra: Amostras do XaAE (extrato aquoso da casca do caule de *X. americana*) são disponibilizadas pelos autores.

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. têm ação gastroprotetora, cujo o mecanismo de ação inicial esteja mediado, em parte, pela atividade antissecretora e participação dos compostos sulfidrílicos (-SH) e óxido nítrico (NO). Os dados apontam que os flavonoides, procianidinas B, procianidinas C e catequina/epicatequina, identificados como compostos majoritários estão relacionados com esta atividade.

5.1 PERSPECTIVAS

Investigar a atividade antioxidante *in-vivo* e *in-vitro* do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L., sua ação cicatrizante em modelo crônico de lesão induzida por ácido acético em ratos, bem como a análise histopatológica e imunohistoquímica e sua ação gastroprotetora na infecção por *Helicobacter pylori*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. F. **Plantas Medicinais e Fitoquímica: Uma visão histórica**. São Paulo: Pharmabooks, 2010, 412 p.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 288, p. C1–C19, 2005.
- ALMEIDA, M. L. B.; et al. Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. **Food Chemistry**, 192, p. 1078–1082, 2016.
- ALMEIDA, C. L. F.; et al. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017, p. 1–14, 2017.
- ALMEIDA, C. L. F. **Avaliação das atividades antioxidante e gastroprotetora dos extratos de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae)**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- AVILA, J. R.; et al. Role of endogenous sulphydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflamm. Res.**, v. 45, p. 83-88, 1996.
- BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Regulação e modulação da secreção gástrica. **Revista de Ciências Médicas**, 11(1): 55-60, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.
- BRASILEIRO, M. T.; et al. *Ximenia americana* L.: botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 89, n. 2, p. 164-167, 2008.
- CHÁVEZ-PIÑA, A. E.; et al. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/cGMP/KATP pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 25, p. 717–722, 2011.
- CHEN, H.; et al. Protective effects of pogostone from *Pogostemonis Herba* against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Fitoterapia**, 100, p. 110-117, 2015.
- CORRÊA-FERREIRA, M. L.; et al. Gastroprotective effects and structural characterization of a pectic fraction isolated from *Artemisia campestris subsp maritima*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 107, Part B, p. 2395-2403, 2018.
- GADEKAR, R.; et al. REVIEW ARTICLE: A potential of some medicinal plants as an antiulcer Agents. **Pharmacognosy Reviews**. v. 4, n. 8, p. 136-146, 2010.

GLAVIN, G. B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal** . v. 6, n. 3, p. 825-831, 1992.

GUSTAFSON, J.; WELLING, D. “No Acid, No Ulcer”—100 Years Later: A Review of the History of Peptic Ulcer Disease. **J. American College of Surgeons**, v. 210, n. 1, p. 110-116, 2010.

KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M.; HERNANDES, L. S. Farmacobotânica e atividade antiúlcera de plantas medicinais brasileiras. p. 179-198. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **FARMACOGNOSIA: coletânea científica**. Ouro Preto: Ed. UFOP, 2012. 372 p.

HERNANDES, L. S. **Farmacologia e Fitoquímica dos extratos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HOOGERWERF, W. A; PASRICHA, P. J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003. p. 757-767.

JORDÃO-JÚNIOR, A. A.; et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina**, 31, p. 434-449, 1998.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology: Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.

LAPA, A. J.; et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. CYTED/CNPq, 2002. 89 p.

LIMA, J. L. S.; et al. **Plantas Medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. Campina Grande: MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2006. 81 p.

LIMA, B. G. **Caatinga: espécies lenhosas e herbáceas**. Rio Grande do Norte: Ed. Ufersa, 2011. 316 p.

LORENZI, H.; et al. **Frutas Brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2006. 640 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

LU, H.; GRAHAM, D. Y. New development in the mechanistic understanding of peptic ulcer diseases. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 3, n. 4, p. 431-437, 2006.

- LUCCHESE, A. M.; GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. **Plantas da caatinga**: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2006. v. 4, 497 p.
- MAHADEVAN, V. Anatomy of the stomach. **Surgery**. 35, 11, p. 608-611, 2017.
- MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004. 413 p.
- MAJUMDAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. **Medicine**. v. 39, n. 3, p. 154-161, 2010.
- MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Seminars**. v. 374, p. 1449-1461, 2009.
- MARTIN, G. R.; WALLACE, J. L. Minireview: Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Experimental Biology and Medicine**, p. 130-137, 2006.
- MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japan. J. Pharmacol.**, v. 33, p. 939-945, 1983.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Banco de dados**. Disponível em: <tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 16 ago 2017.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 19 mar 2018.
- MODLIN, I. M.; et al. Gastric stem cells: an update. **Keio J. Med**, 52 (2), p. 134-137, 2003.
- MONTE, F. J. Q.; et al. *Ximenia americana*: chemistry, pharmacology and biological properties, a review. p. 429-450. In: RAO, V. (Org.). **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. Europa: Ed. InTech, 2012. 538 p.
- MONTENEGRO, C. A.; et al. Gastroprotective Effect of *Xylopi langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae): Involvement of Endogenous Sulfhydryls Compounds and Nitric Oxide. **Records of natural products**. 8 (2), p. 165-183, 2014.
- MOTA, K. S. L.; et al. Flavonoids with Gastroprotective Activity. **Molecules**. 14, p. 979-1012, 2009.
- OKABE, S.; AMAGASE, K. Review: An overview of acetic acid ulcer models - The history and state of the art of peptic ulcer research. **Biol. Pharm. Bull.** v. 28, n. 8, p. 1321-1341, 2005.
- OLATUNJI, O.J.; CHEN, H.; ZHOU, Y. Anti-ulcerogenic properties of lycium chinense mill extracts against ethanol-induced acute gastric lesion in animal models and its active constituents. **Molecules**, 20, p. 22553-22564, 2015.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.

OLIVEIRA, A. F.; et al. Estimativas da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. **Epidemiol. Serv. Saúde**. v. 24, n. 1, p. 145-154, 2015.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. vi-vvi.

POSSENTI, A.; et al. Efeito de fermentado (utilizado como alimento funcional) sobre: a citoproteção gástrica, atividade antsecretória e a motilidade intestinal em animais. **International Journal of Nutrology**, v. 5, n. 1, p. 35-41, 2012.

RABELO, A. S.; et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p. 11-17, 2013.

REIS, S. A. G. B. **Desenvolvimento de formulações fitocosméticas fotoprotetoras a base de *Ximenia americana* L., nativa do semiárido brasileiro**. 2016. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.

ROCHA, C. Q.; et al. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, 135, p. 93-105, 2017.

SCHUBERT, M; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology: Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1842-1860, 2008.

SOBREIRA, F.; et al. Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and ethyl acetate fraction from *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 53 (1), p. 1-11, 2017.

STEWART, D. J.; ACKROYD, R. Peptic ulcers and their complications. **Oesophagus and Stomach**, 29(11), 2011.

SZABO, S.; TRIER, J. S.; FRANKEL, P. W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p. 200-202, 1981.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Rio Grande do Sul: Editora Agropecuária, 2003. 56 p.

VIMALA, G.; SHOBA, G. A Review on antiulcer activity of few Indian medicinal plants. **International Journal of Microbiology**. v. 2014, p. 1-14, 2014.

WHITTLE, B. J.; LÓPEZ-BELMONTE, J. Action and interaction of endothelins, prostacyclin and nitric oxide in the gastric mucosa. In: CHÁVEZ-PIÑA, A. E.; et al. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/cGMP/KATP

pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 25, p. 717–722, 2011.

ZAPATA-COLINDRES, J. C.; et al. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. In: VIMALA, G.; SHOBA, G. A Review on antiulcer activity of few Indian medicinal plants. **International Journal of Microbiology**. v. 2014, p. 1-14, 2014.

APÊNDICE A – CONTRIBUIÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EFEITO GASTROPROTETOR DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE *XIMENIA AMERICANA* L. (OLACACEAE) EM RATOS



Article

Contribution of Secondary Metabolites to the Gastroprotective Effect of Aqueous Extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats

Ticiana Parente Aragão ^{1,2}, Lady Dayane Kalline Travassos dos Prazeres ¹, Samara Alves Brito ¹, Pedro José Rolim Neto ³, Larissa Araújo Rolim ⁴, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida ⁵ , Germana Freire Rocha Caldas ⁶ and Almir Gonçalves Wanderley ^{1,7,*} 

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife 50740-521, PE, Brazil; ticianaragao@yahoo.com.br (T.P.A.); kallinetravassos@gmail.com (L.D.K.T.d.P.); samaralvesbritobrito19@gmail.com (S.A.B.)

² Department of Nutrition, University of Pernambuco, Petrolina 56328-903, PE, Brazil

³ Laboratory of Medication Technology, Federal University of Pernambuco, Recife 50740-521, PE, Brazil; rolim.pedro@gmail.com

⁴ Central of Analysis of Drugs, Medicines and Food, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina 56304-205, PE, Brazil; larissa.rolim@univasf.edu.br

⁵ Center for Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina 56304-205, PE, Brazil; jackson.guedes@univasf.edu.br

⁶ Graduate Program in Health Sciences, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhão, São Luís 65080-805, MA, Brazil; germanafreire@yahoo.com.br

⁷ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil

* Correspondence: almir.wanderley@ufpe.br; Tel.: +55-81-2126-8530; Fax: +55-81-2126-8976

Received: 30 November 2017; Accepted: 4 January 2018; Published: 9 January 2018

Abstract: *Ximenia americana* L. (Olacaceae) is used in ethnomedicine as cicatrizant and for the treatment of gastric disorders. This study identified the chemical constituents of the aqueous extract of *X. americana* (XaAE) and evaluated its antiulcerogenic activity. After lyophilization, XaAE was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and its antiulcerogenic effect was evaluated in acute gastric lesions induced by ethanol, acidified ethanol, and indomethacin. Antisecretory action, mucus production and the participation of sulfhydryl groups (–SH) and nitric oxide (NO) were also investigated. The chromatographic analysis identified procyanidins B and C and catechin/epicatechin as major compounds. Oral administration of XaAE (100, 200 and 400 mg/kg) inhibited the gastric lesions induced by ethanol (76.1%, 77.5% and 100%, respectively), acidified ethanol (44.9%, 80.6% and 94.9%, respectively) and indomethacin (56.4%, 52.7% and 64.9%, respectively). XaAE reduced gastric contents and acidity (51.4% and 67.7%, respectively) but did not alter the production of gastric mucus. The reduction of the –SH and NO groups promoted by *N*-ethylmaleimide (NEM) and *N*ω-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) respectively, reduced the gastroprotective effect of XaAE. In conclusion, XaAE has gastroprotective activity mediated in part by –SH, NO and antisecretory activity. This antiulcer action was initially correlated to its major constituents, procyanidins B and C and catechin/epicatechin.

Keywords: *Ximenia*; Olacaceae; flavonoids; gastric lesion

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Wilson Cavalcante, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 9381
Fax: (55 81) 2126 8350
www.cb@ufpe.br

Recife, 05 de setembro de 2016.

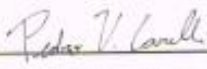
Ofício nº 86/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0021/2016

Certificamos que a proposta intitulada “**Ximenia americana (ameixa-brava): triagem fitoquímica e avaliação da atividade antitumorogênica.**”, registrada com o nº **0021/2016**, sob a responsabilidade de Prof. Dr. **Almir Gonçalves Wanderley** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 08/2019
Espécie/inhagem/raça	Ratos Wistar e camundongos Swiss
Nº de animais	324 ratos e 6 camundongos
Peso/idade	150-200g (ratos); 35-45g (camundongos) /90 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CB/UFPE

Atenciosamente,



Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CB - UFPE
UFPE - SAPE 2501584

ANEXO B – COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (SISGEN)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A5625C4

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A5625C4
Usuário:	Ticiane Parente Aragão
CPF/CNPJ:	010.858.073-39
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Ximenia americana

Título da Atividade:	ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA CASCA DO CAULE DE Ximenia americana L. (ameixa de espinho) (OLACACEAE) EM MODELOS ANIMAIS
----------------------	--

Equipe

Ticiane Parente Aragão	Universidade Federal de Pernambuco
Almir Gonçalves Wanderley	Universidade Federal de Pernambuco
Lady Dayane Kalline Travassos dos Prazeres Paixão	Universidade Federal de Pernambuco

Data do Cadastro:	07/11/2018 19:52:40
Situação do Cadastro:	Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 19:57 de 07/11/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**