



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

LADY DAYANE KALLINE TRAVASSOS DOS PRAZERES PAIXÃO

**ESTUDO NÃO CLÍNICO DE EFICÁCIA (atividades antioxidante e antiulcerogênica)
E SEGURANÇA DE USO DO EXTRATO SECO DAS VAGENS DE *Libidibia ferrea*
(FABACEAE)**

Recife

2019

LADY DAYANE KALLINE TRAVASSOS DOS PRAZERES PAIXÃO

**ESTUDO NÃO CLÍNICO DE EFICÁCIA (atividades antioxidante e antiulcerogênica)
E SEGURANÇA DE USO DO EXTRATO SECO DAS VAGENS DE *Libidibia ferrea*
(FABACEAE)**

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

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof^o. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

P149e Paixão, Lady Dayane Kalline Travassos dos Prazeres
Estudo não clínico de eficácia (atividades antioxidante e antiulcerogênica) e segurança de uso do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea* (FABACEAE)/ Lady Dayane Kalline Travassos dos Prazeres Paixão. – 2019.
138 f. : il. fig., tab.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Fabaceae. 2. Antioxidantes 3. Úlcera péptica. 4. Toxicidade. I. Wanderley, Almir Gonçalves (orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2020 - 015)

LADY DAYANE KALLINE TRAVASSOS DOS PRAZERES PAIXÃO

**ESTUDO NÃO CLÍNICO DE EFICÁCIA (atividades antioxidante e antiulcerogênica)
E SEGURANÇA DE USO DO EXTRATO SECO DAS VAGENS DE *Libidibia ferrea*
(FABACEAE)**

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

Aprovada em: 14/11/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Samara Alves Brito (Examinadora Externa)
Faculdade Santa Maria

Prof. Dr. Leucio Duarte Viera Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho as minhas avós Severina Travassos e Severina Ferreira, com todo o meu amor, respeito, gratidão e eternas saudades.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado saúde, sabedoria, discernimento, forças, perseverança, paciência e equilíbrio. Agradeço por todas as vezes que em meio as dificuldades eu clamei e Ele me ouviu, aumentando a minha fé e confiança. Obrigada Senhor!

Aos meus pais, Aderildo (*in memorian*) e Linalda por terem prezado pelos meus estudos. Obrigado mãe por ter suportado minhas ausências, pela sua confiança e amor incondicional. Amo vocês!

Ao meu querido irmão Charles Travassos, que tenho o maior orgulho! Obrigada por todo seu amor, cuidado e instinto protetor.

Ao meu amado esposo Hamilton Júnior, pelo amor, paciência, ensinamentos, por me fazer mais forte e por diversas vezes ter suportado meus momentos de estresse com tanta sabedoria. Amo você!

A minha querida filha Maria Helena que está a caminho e não deixou que eu me sentisse sozinha enquanto estive dedicada a escrita, pois me fez sentir suas carinhosas mexidinhas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley, por ter me recebido no grupo de pesquisa em Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Bioativos da UFPE. Obrigada professor pela sua confiança, orientações, e pela sua dedicação à docência e pesquisa científica, que inspiram meu respeito e admiração.

A Amanda Silva e Mariana Pontes, pela oportunidade de co-orientação nas iniciações científicas. Posso ter contribuído, mas tenham certeza que aprendi o dobro com vocês. Agradeço pelos momentos de foco e descontração durante nossa caminhada.

A Cynthia Layse, Samara Brito, e Ticiane Aragão pela amizade, disponibilidade, ensinamentos, e por serem minhas companheiras de bancada, onde aprendi, realizei e cresci. Obrigada meninas!

A Anne Catharine e Jamilka Leopoldina pelo prazer de compartilhar os protocolos de toxicidade, pelo amadurecimento das ideias, troca de conhecimentos, treinamentos das técnicas e execuções. Obrigada pelo carinho e suporte!

Aos queridos integrantes do LFTPPB, Alisson Rodrigo, Allysson Rocha, Bruno Santos, Carolina Santos, Daíllo Augusto, Gláucia Dal Santo, Hyago Teixeira, Isabela Barbosa, Jéssica Figueiredo, Maria Joanellys, Mirella Maciel, Juliano Ribeiro, pelo suporte e ajuda nas dificuldades cotidianas.

Aos colegas Maria de Fátima, Henrique Bandeira e José Wellinton, pela disponibilidade em ajudar, todas as vezes em que os solicitei.

Aos examinadores da Banca de Qualificação: Profº Dr. Leucio Duarte, Profº Dr. Danilo Bedor e Profº Dr. Tadeu Peixoto pelas valiosas contribuições.

Aos professores da Banca de Defesa de Tese por aceitarem o convite e pelas contribuições.

A Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, aos professores, funcionários Nerilin e Rilvan, e colegas pela oportunidade de aprendermos juntos.

A Veterinária Cláudia pela atenção, disponibilidade e apoio.

A Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Instituição que sempre admirei e que me proporcionou enorme aprendizado, um verdadeiro “mundo” de conhecimentos e parcerias.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE, pelo suporte financeiro.

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

Muito obrigada.

RESUMO

Estudos etnomedicinais na comunidade Amazônica e na região Nordeste do Brasil destacam o uso de frutos de *Libidibia ferrea* no tratamento de problemas gástricos. No entanto, não existem dados na literatura sobre essa atividade. Assim, o objetivo deste estudo foi fornecer uma base científica para o uso do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) no tratamento de úlceras pépticas e avaliar sua segurança de uso em ratos Wistar. A caracterização fitoquímica foi realizada por CLAE/EM. A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada usando os modelos ABTS, DPPH, AAT e radical superóxido. Empregaram-se modelos agudos e crônicos de lesão gástrica, atividade anti-secretória, produção de muco, influência dos compostos sulfidrílicos (-SH) e óxido nítrico (NO) na atividade antiulcerogênica do ESvLf e atividade anti-*Helicobacter pylori*. Na segurança de uso foram realizados testes de toxicidade aguda, de dose repetida e reprodutiva (fases de pré-implantação e organogênese). Os resultados do CLAE/EM identificaram a presença de compostos fenólicos, ácidos gálico e elágico no ESvLf. O extrato apresentou atividade antioxidante *in vitro*. As úlceras induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado foram inibidas pelo ESvLf com valores de ED₅₀ de 113,0 e 185,7 mg/kg, respectivamente. O ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg) inibiu as lesões induzidas por indometacina em 66,7; 69,6 e 65,8%, respectivamente. ESvLf (200 mg/kg) reduziu a secreção gástrica e a concentração de H⁺ no conteúdo gástrico e mostrou ser independente do ON, e dependente dos compostos -SH na proteção da mucosa gástrica. O ESvLf reduziu a área de lesão gástrica crônica e apresentou atividade anti-*H. pylori*. Com relação à segurança de uso, o ESvLf apresentou DL₅₀ ≥ 2000mg/kg. A administração de doses repetidas (30 dias) por via oral do ESvLf (100, 500 e 1000mg/kg/dia) causou apenas alterações pontuais nos consumos de água e ração, na massa corporal e dos tecidos e nos indicadores hematológicos e bioquímicos. No período de pré-implantação, o ESvLf não interferiu na capacidade de reprodução e na implantação dos blastocistos no útero. No entanto, a administração do ESvLf (1000 mg/kg) no período de organogênese, causou variação no padrão de ossificação durante o desenvolvimento dos blastocistos. Em conclusão, o ESvLf possui atividades antioxidante, gastroprotetora, cicatrizante e antiulcerogênica que suportam seu uso medicinal e possui baixa toxicidade nos indicadores hematológicos, bioquímicos e reprodutivos, contudo o ESvLf (1000 mg/kg) apresentou potencial embriofetotóxico.

Palavras-chave: Fabaceae. Antioxidantes. Úlcera péptica. Toxicidade.

ABSTRACT

Ethnomedicinal studies in the Amazon community and in the Northeast region of Brazil highlight the use of *Libidibia ferrea* fruits for the treatment of gastric problems. However, there are no data in the literature of this pharmacological activity. Thus, the aim of this paper is to provide a scientific basis for the use of the dry extract of *L. ferrea* pods (DELfp) for the treatment of peptic ulcers and evaluate its safety of use in Wistar rats. Phytochemical characterization was performed by HPLC/MS. *In vitro* antioxidant activity was assessed using ABTS, DPPH, TAA and superoxide radical models. The gastroprotective activity, the ability to stimulate mucus production, the anti-secretory activity, and the influence of -SH and NO compounds on the antiulcerogenic activity of DELfp were evaluated. The healing activity was determined by the acetic acid-induced chronic ulcer model. Anti-*Helicobacter pylori* activity was investigated. In the safety of use, acute toxicity, repeated dose toxicity and reproductive toxicity tests (pre-implantation and organogenesis phases) were performed. HPLC/MS identified the presence of phenolic compounds, gallic acid, and ellagic acid in DELfp. The extract showed antioxidant activity *in vitro*. In ulcers induced by absolute ethanol and acidified ethanol, the ED₅₀ values of DELfp were 113 and 185.7 mg/kg respectively. DELfp (100, 200 and 400 mg/kg) inhibited indomethacin-induced lesions by 66,7; 69,6 and 65,8%, respectively. DELfp (200 mg/kg) reduced gastric secretion and H⁺ concentration in the gastric contents and showed to be independent of NO and dependent on -SH compounds in the protection of the gastric mucosa. In the chronic ulcer model, DELfp reduced the area of the gastric lesion. DELfp also showed anti-*H. pylori* activity. With respect to safety of use, DELfp has a LD₅₀ ≥ 2000mg/kg. Oral administration of DELfp (100, 500 and 1000 mg/kg/day) by 30 days causes only occasional changes in water and feed intake, body mass and tissues and hematological and biochemical indicators. In the pre-implantation period, the DELfp does not interfere with the reproduction capacity and the implantation of blastocysts in the uterus. However, the administration of DELfp (1000 mg/kg) during the organogenesis period caused variation in the ossification pattern during blastocyst development. In conclusion, DELfp showed antioxidant, gastroprotective, healing and antiulcerogenic activities that support its medicinal use and has low toxicity on hematological, biochemical and reproductive indicators, however the DELfp (1000 mg/kg) showed potential embryophetotoxic.

Keywords: Fabaceae. Antioxidants. Peptic ulcer. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Anatomia e corte histológico do estômago	26
Figura 2 –	Secreção gástrica via receptores da célula parietal.....	27
Figura 3 –	Fatores protetores da mucosa gástrica.....	29
Figura 4 –	Apresentação esquemática da fisiopatologia da úlcera péptica.....	31
Figura 5 –	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P Queiroz var. <i>ferrea</i>	36
Figura 6 –	Fluxograma dos métodos utilizados na avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i>	51
Figura 7 –	Esquema representativo da mensuração da peroxidação lipídica na mucosa gástrica de ratos Wistar.....	55
Figura 8 –	Esquema representativo da mensuração dos compostos sulfidrílicos não-protéicos na mucosa gástrica de ratos Wistar	56
Figura 9 –	Fluxograma dos métodos utilizados na avaliação da segurança de uso do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i>	62
Figura 10 –	Fotomicroscopia da citologia vaginal de ratas na fase de estro. A seta indica a presença de espermatozoides, confirmando a cópula	65
Figura 11 –	Análise das anomalias e/ou malformações externas (grupo controle).....	67
Figura 12 –	Apresentação esquemática dos cortes realizados no estudo de malformações viscerais (A); Dissecção de feto (grupo controle) para a visualização anatômica dos órgãos das regiões de terço médio torácico e abdominal inferior (B).....	67
Figura 13 –	Representação de feto após as etapas de desidratação, diafanização e coloração com vermelho de alizarina (Staples e Schenell, 1964)	69
Figura 14 –	Representação esquemática dos pontos de ossificação observados na análise esquelética	69
Figura 15 –	Cromatograma do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> a 270 nm..	71
Figura 16 –	Espectros de Massas obtidos dos cromatogramas, bem como a proposta dos compostos identificados.....	74

Figura 17 –	Efeito gastroprotetor do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar.....	78
Figura 18 –	Fotografias típicas do efeito gastroprotetor do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar. (a) controle negativo, (b) pantoprazol (40 mg/kg), (c, d, e, f) ESvLf (50, 100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente).....	79
Figura 19 –	Histopatologia da mucosa gástrica de ratos dos grupos experimentais pré-tratados com NaCl 0,9% (controle negativo, a), pantoprazol (40 mg/kg, b) e extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf 50, 100, 200 e 400 mg/kg, c, d, e, f, respectivamente) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol.....	82
Figura 20 –	Efeito gastroprotetor do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) nas lesões gástricas induzidas por etanol/HCl em ratos Wistar.....	83
Figura 21 –	Fotografias típicas do efeito gastroprotetor do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por etanol/HCl em ratos Wistar. (a) controle negativo, (b) pantoprazol (40 mg/kg), (c, d, e), ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente).....	83
Figura 22 –	Efeito gastroprotetor do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) em lesões gástricas induzidas por indometacina (30 mg/kg, s.c.) em ratos Wistar.....	84
Figura 23 –	Fotografias típicas do efeito gastroprotetor do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos Wistar. (a) controle negativo, (b) pantoprazol (40 mg/kg), (c, d, e) ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente).....	85
Figura 24 –	Efeito do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) na quantificação de muco. O grupo controle negativo (CN) recebeu NaCl 0,9%; o grupo controle positivo recebeu carbenoxolona (200 mg/kg) e o grupo ESvLf (200 mg/kg). O grupo não lesionado (NL) não recebeu tratamento.....	86

Figura 25 –	Efeito do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) na cicatrização da mucosa gástrica em ratos Wistar. Os animais receberam, por via oral, NaCl 0,9% (controle negativo, CN), ranitidina (60 mg/kg) ou ESvLf (200 mg/kg).....	90
Figura 26 –	Fotografias típicas do efeito cicatrizante do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) na úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos Wistar. (a) grupo controle negativo, (b) ranitidina (60 mg/kg), (c) ESvLf (200 mg/kg).....	90
Figura 27 –	Fotomicrografias da mucosa gástrica corada com Hematoxilina/Eosina (painel superior) e Tricômico de Masson (painel inferior) de ratos submetidos à indução de úlcera crônica por ácido acético 30%. Os animais foram tratados por via oral com solução de NaCl 0,9% (controle negativo, CN), ranitidina (60 mg/kg) ou ESvLf (200 mg/kg) por 14 dias.....	93
Figura 28 –	Efeito do extrato seco das vagens de <i>Libidibia ferrea</i> (ESvLf) na massa corporal (g) de ratos Wistar machos (linhas sólidas) e fêmeas (linhas pontilhadas) tratados por via oral durante 30 dias consecutivos.....	96
Figura 29 –	Efeito do extrato seco das vagens de <i>Libidibia ferrea</i> (ESvLf) no consumo de água (linhas sólidas) e ração (linhas pontilhadas) de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral durante 30 dias consecutivos. Os grupos são representados por símbolos: ■ (Controle), □ (ESvLf 100 mg/kg), ▲ (ESvLf 500 mg/kg) e ♦ (ESvLf 1000 mg/kg).....	97
Figura 30 –	Fotomicrografias do tecido hepático de ratos Wistar, machos (1) e fêmeas (2), submetidos ao tratamento com o extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) durante 30 dias consecutivos. Os animais foram tratados por via oral, (A) controle (NaCl 0,9%), (B) ESvLf (100 mg/kg), (C) ESvLf (500 mg/kg), (D) ESvLf (1000 mg/kg).....	107

Figura 31 –	Fotomicrografias do tecido renal de ratos Wistar, machos (1) e fêmeas (2), submetidos ao tratamento com o extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf), durante 30 dias consecutivos. Os animais foram tratados por via oral, (A) controle (NaCl 0,9%), (B) ESvLf (100 mg/kg), (C) ESvLf (500 mg/kg), (D) ESvLf (1000 mg/kg).....	108
Figura 32 –	Efeito do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) sobre os consumos de água (linha sólida) e ração (linha pontilhada) e sobre o ganho de massa corporal em ratas Wistar prenhes tratadas por via oral durante os períodos de pré-implantação (A) e organogênese (B). Os grupos estão representados por símbolos: ■ (Controle), □ (ESvLf 100 mg/kg), ▲ (ESvLf 500 mg/kg) e ◆ (ESvLf 1000 mg/kg).....	110
Figura 33 –	Fotografias apresentam o comprometimento fetal com a presença de micrognatia e falha no desenvolvimento e crescimento dos fetos de progenitoras que receberam ESvLf (1000 mg/kg) no período da organogênese, em comparação aos fetos do grupo controle.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Metabólitos secundários, padrões e reveladores utilizados na caracterização fitoquímica do extrato seco das vagens de <i>Libidibia ferrea</i>	50
Tabela 2 –	Dados dos compostos detectados por CLAE-EM do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (modo negativo)	72
Tabela 3 –	Atividade antioxidante IC ₅₀ <i>in vitro</i> (µg/mL) do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) e padrões antioxidantes	76
Tabela 4 –	Efeito do pré-tratamento oral com extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) sobre indicadores do estresse oxidativo nas lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar...	81
Tabela 5 –	Efeito do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) nos parâmetros de secreção gástrica em ratos Wistar submetidos à ligadura do piloro	87
Tabela 6 –	Efeito da administração oral do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar pré-tratados com N ^o -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 70 mg/kg) ou N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg).....	89
Tabela 7 –	Efeito do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) na ingestão de ração e água, e na massa corporal de ratos Wistar após 14 dias de tratamento no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	91
Tabela 8 –	Efeito do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos Wistar após 14 dias de tratamento no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	92
Tabela 9 –	Efeito do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) no consumo de água, ração e na massa corporal de ratas Wistar durante 14 dias.....	95

Tabela 10 –	Efeito do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) sobre os parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral durante 30 dias consecutivos.....	100
Tabela 11 –	Efeito do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf) sobre os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral durante 30 dias consecutivos.....	101
Tabela 12 –	Efeito do extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> (ESvLf), sobre as massas absoluta (g) e relativa dos órgãos (g/100 g de massa corporal de animal) de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral, durante 30 dias consecutivos.....	104
Tabela 13 –	Parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas por via oral com o extrato seco das vagens de <i>Libidibia ferrea</i> (ESvLf), durante o período de pré-implantação (0° ao 5° dia de prenhez)...	111
Tabela 14 –	Parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas por via oral com extrato seco das vagens de <i>Libidibia ferrea</i> (ESvLf), durante o período de organogênese (6° ao 15° dia de prenhez).....	112
Tabela 15 –	Avaliação dos pontos de ossificação da prole de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia), por via oral, com o extrato seco das vagens de <i>L. ferrea</i> , ESvLf(100, 500 e 1000 mg/kg).....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aaa	absorbância do ácido ascórbico
AAT	atividade antioxidante total
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
Ac	absorbância do controle
AC	adenilil ciclase
ACh	acetilcolina
AINE	anti-inflamatório não esteroide
ALT	alanina aminotransferase
ALU	área de lesão ulcerativa
AMPc	adenosina 3'5'monofosfato-cíclico
ANOVA	análise de variância
AARS	atividade antioxidante aos radicais superóxido
As	absorbância na presença do extrato
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
BHI	infusão de cérebro e coração
CBM	concentração bactericida mínima
CCK-2	receptor de colecistocinina 2
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
COX	ciclooxigenase
DE ₅₀	dose efetiva 50%
DL ₅₀	dose letal 50%
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	ácido 5, 5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
EC	células enterocromafins
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EAG	equivalente de ácido gálico

EQ	equivalente de quercetina
EPM	erro padrão da média
EROs	espécies reativas de oxigênio
ESvLf	extrato seco das vagens de <i>Libidibia ferrea</i>
FA	fosfatase alcalina
FAP	fator ativador de plaquetas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GGT	gama-glutamil-transpeptidase
G _q /11	Proteína Gq ou proteína 11
GSH	glutathiona
GSH-Px	glutathiona peroxidase
Hb	hemoglobina
HCl	ácido clorídrico
HCM	hemoglobina corpuscular média
H & E	hematoxilina/eosina
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Ht	hematócrito
IBPs	inibidores da bomba de prótons
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50%
i.p.	intraperitoneal
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
LDH	lactato desidrogenase
<i>L. ferrea</i>	<i>Libidibia ferrea</i>
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina-metil-éster
MDA	malondialdeído
NBT/NADH	cloreto de nitrotetrazólio azul/nicotinamida adenina dinucleotídeo
NEM	n-etilmaleimida
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
NO	óxido nítrico
NO sintase	óxido nítrico sintase

PGs	prostaglandinas
PGE ₂	prostaglandina da série E
pH	potencial hidrogeniônico
PGI ₂	prostaglandina da série I
receptores H ₂ e H ₃	receptores de histamina 2 e 3
receptor M ₃	receptor muscarínico 3
s.c.	subcutânea
SDS	dodecil sulfato de sódio
-SH	compostos sulfidrílicos não protéicos
SNE	sistema nervoso entérico
SST ₂	receptor de somatostatina 2
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TGI	trato gastrointestinal
TM	Tricômico de Manson
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRIS	hidroximetil aminometano
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UP	úlceras pépticas
UV	ultravioleta
VCM	volume corpuscular médio
v.o.	via oral
VPM	volume plaquetário médio

LISTA DE SÍMBOLOS

Al	alumínio
AlCl ₃	cloreto de alumínio
([Ca ²⁺] _i)	cálcio intracelular
CO ₂	dióxido de carbono
H ⁺	íon hidrogênio
HCO ³⁻	íon bicarbonato
(H ⁺ /K ⁺ -ATPase)	bomba de prótons
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IP ₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
K ⁺	íon potássio
KCl	cloreto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
Na ⁺	íon sódio
NaCl	cloreto de sódio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
OH ⁻	radical hidroxila
PCL-β1	fosfolipase C beta 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1	O ESTÔMAGO	25
2.2	MECANISMOS REGULATÓRIOS DA SECREÇÃO GÁSTRICA	27
2.3	MECANISMOS DE DEFESA DA MUCOSA GÁSTRICA	29
2.4	ÚLCERA PÉPTICA	31
2.4.1	Terapêutica das úlceras pépticas	33
2.5	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P Queiroz var. <i>ferrea</i>	35
2.5.1	<i>Libidibia ferrea</i>: atividades biológicas e composição fitoquímica	37
2.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SUBSTÂNCIAS GASTROPROTETORAS	38
2.6.1	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	39
2.6.2	Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	41
2.7	ESTUDOS DA SEGURANÇA DE USO DE PLANTAS MEDICINAIS	42
2.7.1	Toxicidade aguda	42
2.7.2	Toxicidade de doses repetidas	43
2.7.3	Toxicologia do desenvolvimento	43
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO	49
4.2	PERFIL FITOQUÍMICO	49
4.2.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	49
4.2.2	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-EM)</i>	50
4.3	QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO ESvLf	52
4.3.1	Determinação do Conteúdo de Fenois Totais	52
4.3.2	Determinação do Conteúdo de Flavonoides	52
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO ESvLf	52

4.4.1	Atividade sequestradora do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS)	52
4.4.2	Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH) ..	53
4.4.3	Atividade Antioxidante Total (AAT)	53
4.4.4	Atividade sequestradora do radical superóxido (O₂-)	53
4.5	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	54
4.5.1	Animais	54
4.5.2	Avaliação da Atividade Gastroprotetora	54
4.5.2.1	Úlcera Induzida por Etanol	54
4.5.2.1.1	<i>Determinação da Peroxidação Lipídica e dos Níveis de Compostos Sulfidrílicos Não-Protéicos</i>	<i>55</i>
4.5.2.1.2	<i>Análise Histológica</i>	<i>56</i>
4.5.2.2	Úlcera Induzida por Etanol Acidificado (Etanol/HCl)	56
4.5.2.3	Úlcera Induzida por Indometacina	57
4.5.3	Avaliação dos Fatores Protetores da Mucosa Gástrica	57
4.5.3.1	Determinação da Concentração de Muco na Mucosa Gástrica	57
4.5.3.2	Determinação da Secreção Ácida Gástrica	58
4.5.3.3	Envolvimento do Óxido Nítrico (NO) e dos Compostos Sulfidrílicos (-SH) na Gastroproteção	59
4.5.4	Avaliação das propriedades cicatrizantes do ESvLf	59
4.5.4.1	Úlcera Gástrica Induzida por Ácido Acético	59
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-<i>HELICOBACTER PYLORI</i>	60
4.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	63
4.8	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE DOSES REPETIDAS	63
4.8.1	Análises Hematológica e Bioquímica	64
4.8.2	Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	64
4.8.3	Análise Morfológica	64
4.9	TOXICIDADE REPRODUTIVA	65
4.9.1	Período de acasalamento	65
4.9.2	Período de prenhez	65
4.9.3	Avaliação da performance reprodutiva materna	66
4.9.4	Teratologia	66
4.9.4.1	Análise das anomalias e/ou má-formações externas	66

4.9.4.2	Análise das anomalias e/ou má-formações internas	67
4.9.4.2.1	<i>Análise visceral no período de organogênese</i>	67
4.9.4.2.2	<i>Análise esquelética no período de organogênese</i>	69
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	PERFIL FITOQUÍMICO	71
5.1.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	71
5.1.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE- EM)	71
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO ESvLf	74
5.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO ESvLf	76
5.3.1	Atividade antioxidante total	77
5.3.2	Atividade de eliminação de radicais superóxido (O₂-)	77
5.4	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	77
5.4.1	Avaliação da Atividade Gastroprotetora	77
5.4.1.1	Úlcera induzida por etanol	78
5.4.1.2	Análise Histotológica	81
5.4.1.3	Úlcera induzida por etanol acidificado (Etanol/HCl)	83
5.4.1.4	Úlcera induzida por indometacina	84
5.4.2	Fatores de Proteção da Mucosa Gástrica	86
5.4.2.1	Efeito do ESvLf na produção de muco gástrico	86
5.4.2.2	Efeito do ESvLf na secreção ácida gástrica	87
5.4.2.3	Envolvimento do óxido nítrico (NO) e compostos sulfidrílicos (-SH) na gastroproteção	88
5.4.3	Avaliação das propriedades cicatrizantes do ESvLf	89
5.4.3.1	Úlcera gástrica induzida por ácido acético	89
5.4.3.1.1	<i>Análise Histológica</i>	92
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	93
5.6	TOXICIDADE AGUDA	94
5.7	TOXICIDADE DE DOSES REPETIDAS	95
5.7.1	Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	102
5.7.1.1	Níveis de peroxidação lipídica nos tecidos hepático e renal	102
5.7.1.2	Níveis de glutathiona reduzida (GSH) nos tecidos hepático e renal	102

5.8	TOXICIDADE REPRODUTIVA	109
5.8.1	Avaliação da performance reprodutiva materna	109
5.8.2	Teratologia	113
5.8.2.1	Análise das anomalias e/ou má-formações externas	113
5.8.2.2	Análise das anomalias e/ou má-formações internas	114
5.8.2.2.1	<i>Análise visceral no período de organogênese</i>	114
5.8.2.2.2	<i>Análise esquelética no período de organogênese</i>	114
6	CONCLUSÕES	116
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA Nº 0016/2016	135
	ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA Nº 0032/2016	136
	ANEXO C - CADASTRO DO PROJETO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO	137
	ANEXO D - ACEITE DA OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY PARA A PUBLICAÇÃO DO ARTIGO	138

1 INTRODUÇÃO

Úlcera péptica (UP) é um termo usado para se referir à lesão péptica ácida do trato gastrintestinal, esôfago, estômago e duodeno, e são causadas por um desequilíbrio entre os fatores agressores e defensores da mucosa, resultando em ruptura da mucosa e submucosa (BANSAL *et al.*, 2009; CALDAS *et al.*, 2014; LANAS; CHAN, 2017).

Hábitos alimentares inadequados, consumo de álcool e tabaco, estresse, infecção por *Helicobacter pylori* e uso inadvertido de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são fatores de desequilíbrio da mucosa gástrica (KALAYCI *et al.*, 2017). Nessas situações, os mecanismos de defesa, como secreção de muco e bicarbonato, equilíbrio ácido-base, grupamentos sulfidrílicos endógenos e fator de crescimento epidérmico (KALAYCI *et al.*, 2017; MANJEGOWDA; RAJAGOPAL; DHARMESH, 2017) dependendo da intensidade dos agentes agressores, podem ser insuficientes para manter a homeostase tecidual, favorecendo o desenvolvimento de lesões.

Estima-se que 10 a 20% dos casos de UP estejam associados à complicações como hemorragias, obstruções e perfurações, com uma taxa de mortalidade variando de 10 a 40% dos casos (SIVRI, 2004; BERTLEFF; LANGE, 2010; LAU *et al.*, 2011, THORSEN *et al.*, 2013; LACERDA NETO *et al.*, 2017). Diante desse cenário, a comunidade científica tem sido continuamente desafiada a contribuir com pesquisas nessa área (BANSAL *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MATÉS, 2000). O excesso das EROs prejudica as proteínas celulares (RAO; BAKER, R., BAKER, S., 1999) e interrompe a barreira do trato gastrintestinal, aumentando a permeabilidade tecidual, o que contribui para inflamação. As EROs também causam inflamação por estimular leucócitos polimorfonucleares, intensificando o dano tecidual (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

A terapêutica da UP evoluiu com o advento dos inibidores da secreção ácida gástrica, com os anti-histamínicos (H_2) e inibidores da bomba de prótons. (BIGHETTI *et al.*, 2005). Apesar dos avanços, estas classes farmacológicas apresentam efeitos adversos. Anti-histamínicos podem causar arritmia, ginecomastia e alterações hematológicas (ALMASAUDI

et al., 2016), e o tratamento com inibidores da bomba de prótons pode provocar hiperplasia das células parietais das glândulas gástricas (THOMSON *et al.*, 2010).

Além dos tratamentos farmacológicos conhecidos, a não responsividade ao tratamento apresentada por alguns indivíduos (KANGWAN *et al.*, 2014), as recidivas e complicações devem ser consideradas. Segundo Fan *et al.* (2005), a úlcera péptica além de ser uma doença de elevada incidência clínica, tem taxas de recidivas que oscilam entre 65-80% no intervalo de um ano após o tratamento, e quase 100% após dois anos.

Neste sentido, o desenvolvimento de pesquisas na área de produtos naturais e a relação entre as estruturas químicas dos seus constituintes e as propriedades biológicas tem recebido o reconhecimento da comunidade científica, como importantes recursos terapêuticos (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Libidibia ferrea (Mart. ex. Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*, anteriormente classificada como *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* pertence à família Fabaceae. É popularmente conhecida como “pau-ferro” ou “jucá” (LORENZI, 2002; MATOS, 2007), e bem representada nas regiões semi-áridas do Norte e Nordeste do Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

Estudos etnofarmacológicos em comunidades Amazônicas no Brasil reportaram o uso da *Caesalpinia ferrea* na forma de chá e xarope, e a infusão dos frutos usada no controle de problemas gástricos (SAMPAIO *et al.*, 2009).

Libidibia ferrea apresenta diversas atividades farmacológicas, os frutos e a casca do caule tem propriedades anti-inflamatória (CARVALHO *et al.*, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2014); Carvalho *et al.* (1996) e Lima *et al.* (2012) comprovaram a atividade analgésica dos frutos e Sampaio *et al.* (2009) a atividade antibacteriana. Menezes *et al.* (2007) verificaram a atividade anti-hipertensiva e Vasconcelos *et al.* (2011) a atividade anti-diabética da casca do caule. Apesar do conhecimento farmacológico já adquirido, pouco se sabe sobre a possível toxicidade no uso subcrônica e toxicidade reprodutiva da espécie.

Os diversos estudos com a *Libidibia ferrea* mostram a presença de compostos bioativos com atividade antioxidante, importante no tratamento de diversas doenças. Diante do exposto, foi proposto avaliar as atividades antioxidante e antiulcerogênica, bem como a segurança de uso das vagens da *Libidibia ferrea*, a parte renovável do vegetal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O ESTÔMAGO

O trato gastrointestinal (TGI) é constituído por uma porção superior, delimitando a boca, esôfago e estômago, por uma porção mediana, constituindo o intestino delgado e uma porção inferior, representada por ceco, cólon e reto (PORTH; KUNERT, 2004).

O estômago, órgão de interesse nesse estudo, corresponde a parte dilatada do trato gastrointestinal. Contínuo proximalmente com o esôfago e distalmente com o duodeno, o estômago encontra-se na cavidade peritoneal, em grande parte na região hipocondrial esquerda sob cobertura da parte inferior da caixa torácica. O estômago atua como um reservatório responsável por realizar a digestão e absorção de substâncias, além de armazenar e distribuir os alimentos de forma regulada ao intestino (FEHER, 2012; SCHUBERT, 2014; MAHADEVAN, 2017).

Anatomicamente, o estômago é dividido em três regiões: fundo, corpo e antro (Figura 1), sendo limitado por dois sistemas de esfíncteres: o proximal, chamado de esfíncter cárdico e através deste o estômago se comunica com o esôfago; e o esfíncter pilórico, através do qual o estômago se comunica com o duodeno (SCHUBERT; PEURA, 2008; HAMILTON, 1982).

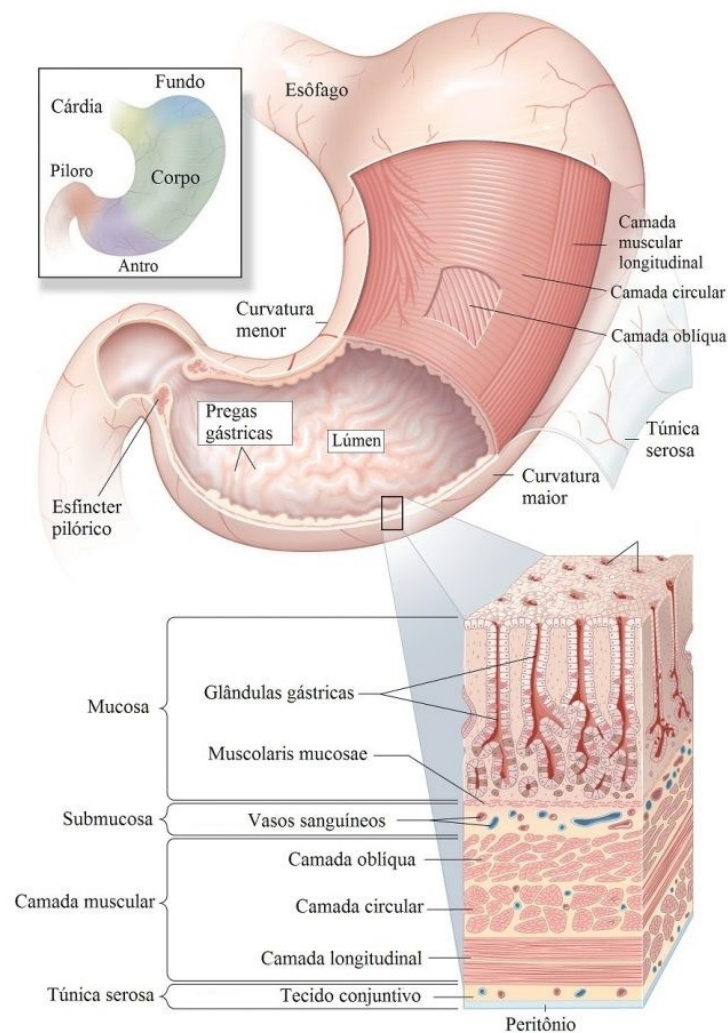
O fundo do estômago é a parte que se projeta para cima, superior ao nível do orifício cárdico. O corpo do estômago se estende do orifício cárdico até o nível do entalhe angular, é a maior e mais distensível parte do estômago. O fundo e o corpo gástrico contêm cerca de 80% das glândulas gástricas oxínticas ou parietais. A parte pilórica do estômago se estende desde o entalhe angular até a junção gastro-duodenal, compreende o antro pilórico proximalmente e o canal pilórico distalmente; é nesta porção antral do estômago que se localizam as glândulas pilóricas (MAHADEVAN, 2017).

As glândulas oxínticas ou parietais são compostas por células mucosas, que secretam muco; células pépticas ou principais, responsáveis pela secreção do pepsinogênio, o qual, quando em contato com o ácido clorídrico (HCl) é convertido em pepsina atuando como enzima proteolítica; células parietais, que secretam o ácido clorídrico e o fator intrínseco; células D, que secretam somatostatina; e por fim, há as células enterocromafins (EC), que secretam a histamina, um importante regulador endócrino da secreção ácida gástrica. As glândulas pilóricas possuem células mucigênicas, produtoras de muco; células G, que quando estimuladas liberam o hormônio gastrina, que tem papel fundamental na secreção ácida gástrica; e também

células D, a qual secreta somastostatina, uma substância parácrina inibitória. Então, na região de antro pilórico há células produtoras de muco e células G produtoras de gastrina (SCHUBERT; PEURA, 2008).

No que tange à histologia gástrica, a camada serosa é a mais externa, constituída por duas camadas (uma camada mais interna de tecido conjuntivo e uma camada externa formada por epitélio pavimentoso). A camada muscular, por sua vez, compreende três túnicas: (1) túnica externa longitudinal; (2) túnica média circular e (3) túnica interna oblíqua. Mais profundamente, estão presentes a camada submucosa e a camada mucosa (SEELEY; STEPHEN; TATE, 2003), (Figura 1).

Figura 1 - Anatomia e corte histológico do estômago



Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013.

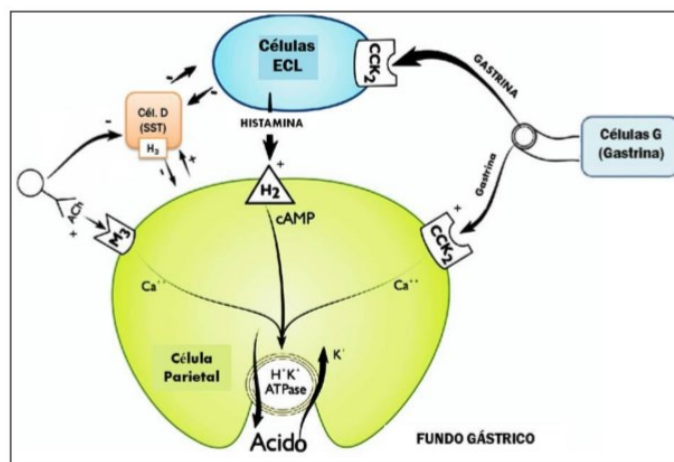
2.2 MECANISMOS REGULATÓRIOS DA SECREÇÃO GÁSTRICA

A fonte da secreção de ácido gástrico é a célula parietal, célula consideravelmente especializada em sua função. A membrana basolateral da célula parietal contém receptores de histamina, gastrina e ACh (BARRETT, 2015). O controle da secreção ácida é complexo e envolve as sinalizações neurócrina, representada pela acetilcolina (ACh); parácrina, exercida pela histamina; e endócrina, pela gastrina (SANTOS *et al.*, 2001), (Figura 2).

O estímulo neural representa um importante mecanismo para a regulação da secreção gástrica. A distensão do estômago é percebida por receptores de estiramento e ativa os reflexos de secreção ácida. A ACh participa na estimulação das células parietais, principais e EC, na supressão das células D e nas sinapses entre nervos no sistema nervoso entérico (SNE) (BARRETT, 2015).

A ACh, ao se ligar diretamente aos receptores muscarínicos M_3 localizados na membrana basolateral das células parietais (JAIN *et al.*, 2007; SCHUBERT, 2007), que acoplados à proteína $G_{q/11}$ promovem a ativação da fosfolipase C beta 1 ($PLC-\beta_1$), com consequente geração de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e o aumento da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Este mecanismo ativa proteínas cinases, que regulam a fusão das vesículas contendo a bomba de prótons ($H^+/K^+-ATPase$) com a membrana apical destas células (SCHUBERT, 2011).

Figura 2 - Secreção gástrica via receptores da célula parietal



Fonte: SCHUBERT; PEURA, 2008 (Adaptado).

A ACh também estimula a liberação de histamina estocada nas células enterocromafins (EC) localizadas no fundo gástrico, e a liberação de gastrina pelas células G do antro gástrico (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A histamina, ao ser liberada, estimula a secreção ácida, pois desencadeia uma cascata de eventos intracelulares, pela ligação ao receptor H_2 acoplado à proteína estimulatória Gs na célula parietal. Esta proteína ativa a enzima adenilil ciclase (AC) que permite a conversão de ATP em adenosina 3' 5' monofosfato-cíclico (AMPc). A ativação da via dependente de AMPc estimula a (H^+/K^+ -ATPase) na célula parietal, e permite extrusão de H^+ para o lúmen gástrico e a entrada de K^+ na célula, resultando na secreção ácida via parácrina (JAIN *et al.*, 2007; BANSAL *et al.*, 2009; FRY, 2009).

Além disso, a histamina modula a secreção do ácido de maneira indireta, por atuar em receptores H_3 na célula D, inibindo a secreção de somatostatina, substância que tem função de inibir a secreção do ácido por suprimir a liberação de gastrina; A histamina também atua nas células G, estimulando a liberação de gastrina (ROULEAU *et al.*, 2004).

A gastrina é produzida pela célula G do antro gástrico, mas também pode ser produzida em pequenas quantidades no intestino delgado e no pâncreas. Este hormônio é o principal mediador da secreção ácida estimulada pela alimentação. Como agonista endócrino da secreção, age de forma direta estimulando os receptores de colecistocinina 2 (CCK-2) das células parietais, os quais acoplados a proteína $G_{q/11}$, ativam a via da PLC- β_1 , o que provoca aumento de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, que estimulará a H^+/K^+ -ATPase. (SCHUBERT; PEURA, 2008; SCHUBERT, 2011; KOPIC; GEIBEL, 2013).

Os receptores CCK-2 presentes nas células EC, aos quais a gastrina pode ligar-se, promovem a liberação de histamina; esta é a forma indireta de a gastrina estimular a secreção ácida (ALY; SHULKES; BALDWIN, 2004; BEALES, 2004).

Os receptores de histamina H_2 estão ligados predominantemente a vias de sinalização que envolvem o monofosfato de adenosina cálcio (AMPc), enquanto a ACh e a gastrina estimulam por meio do cálcio. Quando a célula parietal sofre a ação simultânea dos três estímulos, há uma potencialização da secreção gástrica. A implicação fisiológica desse sinergismo é a maior secreção ácida, e a importância farmacológica é que a interferência em um dos estímulos secretórios pode inibir de maneira significativa a secreção ácida (BARRETT, 2015).

A secreção ácida também pode ser influenciada negativamente, especialmente pela somatostatina presente nas células D da glândula oxíntica e pilórica. A somatostatina inibe a secreção ácida por inibir as células parietais e a cascata de sinalização da adenilil ciclase (AC); e por se ligar ao receptor de somatostatina ($SSTR_2$), acoplado a proteína G_i , inibindo a secreção de histamina e gastrina. Quando ocorre redução excessiva do pH do lúmen gástrico, a secreção

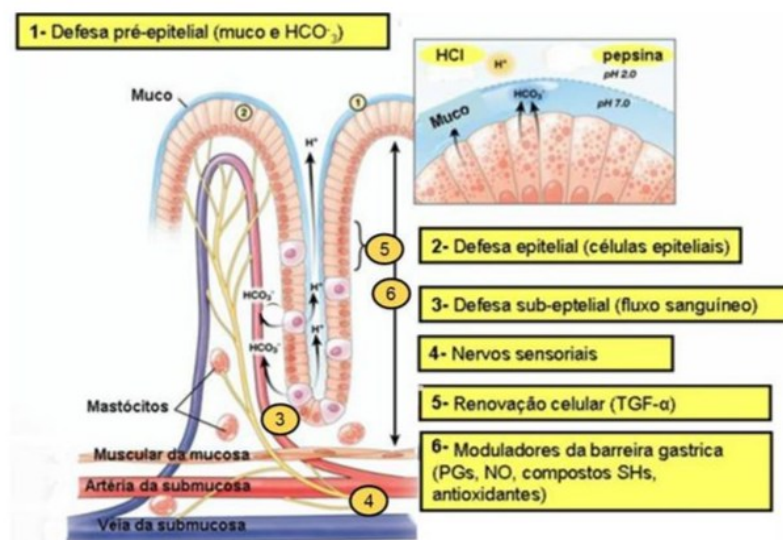
de somatostatina é estimulada, que por outro lado, atenua a liberação de histamina, gastrina e consequentemente a formação de ácido (SCHUBERT, 2005; KOPIC; GEIBEL, 2013).

2.3 MECANISMOS DE DEFESA DA MUCOSA GÁSTRICA

A mucosa gástrica está em constante susceptibilidade à agressão causada por fatores fisiológicos, como a presença do HCl, da pepsina e de sais biliares e fatores exógenos, quando da ingestão de bebidas alcoólicas e do uso de antiinflamatórios não-esteroides (AINEs) sem os devidos cuidados (SAIRAM *et al.*, 2002; TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

Dessa forma, há a necessidade de mecanismos fisiológicos para garantir a integridade da mucosa gástrica. Existem, para este fim, fatores de defesa pré-epitelial, como a produção de muco e bicarbonato; fatores de defesa epitelial, formado pelas células epiteliais; fatores de defesa sub-epitelial, como o fluxo sanguíneo, inervação sensorial, renovação epitelial e moduladores da barreira gástrica, como as prostaglandinas (PGs), o óxido nítrico, os compostos sulfidrílicos (GSH) e o sistema de defesa antioxidante (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; ZHU; KAUNITZ, 2008) (Figura 3).

Figura 3 - Fatores protetores da mucosa gástrica



Fonte: LAINE, TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008 (Adaptado).

O muco é a primeira linha de defesa da mucosa gástrica. Associado ao bicarbonato, forma uma camada sobre o epitélio, que o protege da colonização bacteriana e das forças mecânicas da digestão proteolítica (REPETTO; LLESUY, 2002). Por sua vez, o bicarbonato

(HCO_3^-) secretado no estômago e no duodeno tem a capacidade de neutralizar os íons hidrogênio que se difundem na superfície da mucosa, mantendo um pH próximo ao neutro, na interface formada entre o muco e mucosa gástrica. Qualquer fator que interfira nesta homeostase, diminuindo a quantidade de muco e bicarbonato, como os antiinflamatórios não-esteroides (AINEs) e a presença de sais biliares, pode tornar a mucosa vulnerável à agressão ácida (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005).

A renovação celular e fisiológica do epitélio gástrico ocorre a cada 2-4 dias (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Em um quadro de lesão celular, como ocorre com a formação de úlcera, inicia-se um processo de reparação epitelial através de crescimento e formação de glândulas gástricas, crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e o processo de proliferação, com rápida migração celular (TARNAWSKI, 2005). A restituição do tecido epitelial depois de lesionado inicia-se dentro de minutos e a renovação completa ocorre no intervalo de 3-7 dias (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Na presença de substâncias irritantes à mucosa gástrica, o fluxo sanguíneo local aumenta consideravelmente, causando hiperemia tecidual. Nesta tentativa de debelar o processo, estão envolvidos os nervos aferentes sensoriais (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010) e o óxido nítrico (NO) (HOLZER, 2006).

Como mecanismo de defesa, as fibras parassimpáticas são ramificações de troncos vagais posteriores que acompanham o esôfago no abdome e se prolongam ao longo da menor curvatura do estômago. Estas fibras controlam a motilidade e a secreção gástrica (MAHADEVAN, 2017). Quando estas fibras aumentam o estímulo da secreção gástrica e ocorrem altas concentrações de ácido na mucosa gástrica, os nervos aferentes sensoriais respondem de forma imediata (WALLACE, 2008) liberando neurotransmissores, resultando no relaxamento do músculo liso das arteríolas e elevação do fluxo sanguíneo da mucosa (HOLZER, 1998; EVANGELISTA, 2006).

As prostaglandinas (PGs) e o óxido nítrico (NO) representam importantes mediadores locais de defesa da mucosa gástrica (MOLLACE *et al.*, 2005). As principais PGs sintetizadas pela mucosa gástrica são as prostaglandinas: E_2 (PGE_2) e I_2 (PGI_2). Estas atuam no mesmo sentido do (NO), mantendo a integridade da mucosa gástrica por meio de diversos eventos, como a inibição da secreção ácida, a estimulação da secreção de muco e bicarbonato, o aumento ou manutenção do fluxo sanguíneo e a citoproteção do trato gastrointestinal (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

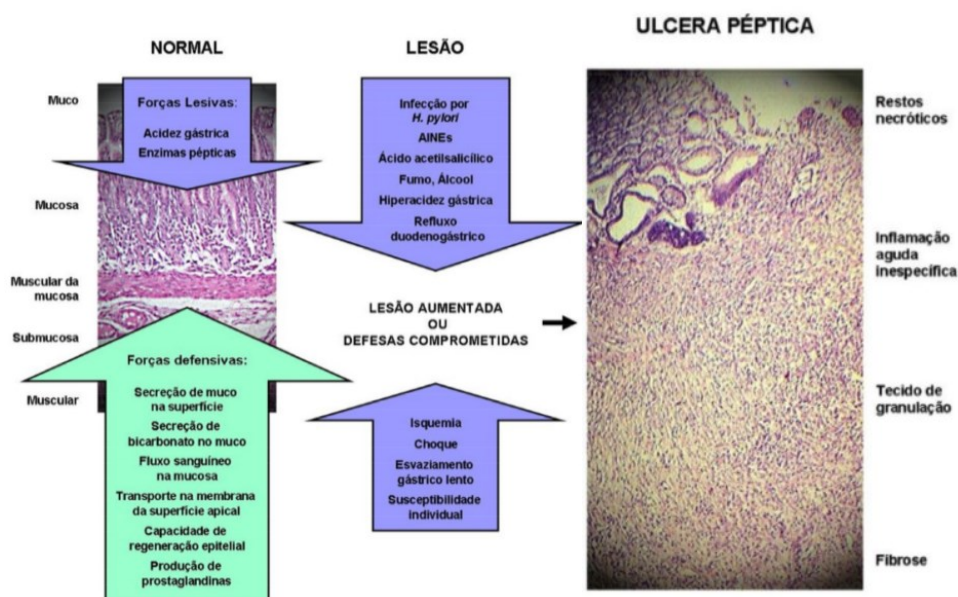
2.4 ÚLCERA PÉPTICA

É uma doença crônica e multifatorial. Geralmente as lesões aparecem isoladas e apresentam de 4 cm de diâmetro. Embora possam ocorrer em qualquer porção do trato gastrointestinal, a grande maioria se localiza no duodeno e no estômago. As úlceras são caracterizadas histologicamente como uma descontinuidade na mucosa que se estende através da camada muscular da mucosa até a submucosa, ou mais profundamente (SOUZA; MELLO; LOPES, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Essas lesões são geradas por um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo da mucosa, prostaglandinas endógenas) e os fatores agressores (secreção ácida, álcool, AINEs, *Helicobacter pylori*, e espécies reativas de oxigênio) da mucosa gástrica (Figura 4). A hiperacidez não é um requisito para o desenvolvimento das lesões, apenas uma minoria dos pacientes com úlcera gástrica apresenta essa característica (embora quando presente é um fator fortemente ulcerogênico) (SOUZA; MELLO; LOPES, 2012; MAGIEROWSKI *et al.*, 2015).

As úlceras pépticas e suas complicações podem ocorrer em qualquer idade, no entanto, os casos se mostram mais acentuados na população acima de 50 anos, fato que pode estar relacionado à infecção por *H. pylori*, ingestão de álcool, hábito de fumar e ao uso contínuo de AINEs (HALLAS *et al.*, 2006).

Figura 4 - Apresentação esquemática da fisiopatologia da úlcera péptica



Fonte: SOUZA, MELLO; LOPES, 2012 (Adaptado de KUMAR, ABBAS; FAUSTO 2005).

As espécies reativas de oxigênio participam na patogênese da úlcera gástrica, inclusive quando essas lesões são ocasionadas por etanol. Atribui-se ao álcool o aumento de ânions superóxido, radicais hidroxila e peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzindo estresse oxidativo intracelular (REPETTO; LLESUY, 2002; KWIECIEŃ, BRZOWSKI; KONTUREK, 2002).

Em relação aos AINEs, o efeito colateral mais conhecido é o dano provocado à mucosa gástrica, que pode ocorrer por dois mecanismos. O primeiro é a conhecida inibição das enzimas cicloxigenases, reduzindo a produção de prostaglandinas endógenas. O outro mecanismo consiste na formação de um gradiente iônico que favorece o influxo de H^+ para o interior das células da mucosa gástrica, com efluxo de K^+ e Na^+ para o lúmen com consequente lesão celular (GLAVIN; SZABO, 1992).

A atividade antiúlcera de uma substância desconhecida pode ser determinada em animais de experimentação frente aos modelos agudos: indução de lesões gástricas por medicamentos (ácido acetilsalicílico ou indometacina), ou indução de lesões gástricas por álcool. Tais modelos são os mais utilizados porque representam os agentes etiológicos mais comuns envolvidos na patologia da úlcera gástrica humana (LAPA *et al.*, 2002).

O etanol absoluto induz uma proporção significativa de úlceras independentes da secreção ácida, uma vez que destrói as células epiteliais no estômago (ROBERT *et al.*, 1979). A lesão se caracteriza pela presença de focos hiperêmicos e hemorrágicos indicando o comprometimento de fluxo sanguíneo pelo agente lesivo. A aspirina ou a indometacina, anti-inflamatórios não-esteroides, induzem lesões gástricas por inibirem a enzima cicloxigenase e consequentemente a biossíntese de prostaglandinas (PGE_2) importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica (GLAVIN E SZABO, 1992).

A indução de úlceras gástricas por ácido acético consiste no modelo em que a úlcera e o processo de reparação mais se assemelham aos observados em humanos. O ácido acético provoca um aumento no volume de ácido, principal responsável pela necrose da mucosa e obstrução pilórica, capaz de produzir na mucosa gástrica do rato uma lesão bem definida envolvendo a camada muscular, de cicatrização demorada, semelhante à úlcera péptica humana (TAKAGI *et al.*, 1969).

O método de ligadura pilórica é um modelo que permite estudar o efeito de drogas na secreção gástrica. Por meio dele, é possível avaliar o efeito sistêmico de substâncias com potencial efeito gastroprotetor e sua interferência em parâmetros da secreção ácida como volume, pH e acidez total. A obstrução promovida pela ligadura pilórica causa acúmulo de

ácido no conteúdo gástrico e distensão exagerada da mucosa, consequentemente levando a uma hipersecreção gástrica e à formação de úlceras (BAGGIO *et al.*, 2003). Vale salientar que os valores de acidez total, expressos em (mEqiv. $[H^+]$ /mL/4h) não correspondem sempre ao pH, pois as proteínas presentes na secreção podem tamponar parte da acidez (LAPA *et al.*, 2002).

2.4.1 Terapêutica das úlceras pépticas

Os avanços na compreensão da etiologia, da fisiopatologia e no diagnóstico das úlceras pépticas são fatores importantes para o tratamento. O tratamento farmacológico das UP pode ser realizado com o uso de diversas classes farmacológicas: antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas do receptor H_2 para histamina e inibidores da bomba de prótons (JAIN *et al.*, 2007).

O diagnóstico e tratamento da bactéria *Helicobacter pylori* também contribuem para o tratamento das UP. Uma das abordagens terapêuticas para a *H. pylori* consiste na terapia ácido-independente (BIGHETTI *et al.*, 2005) através da administração de inibidores da bomba de prótons associados a antibióticos. Esta combinação diminui a secreção ácida e aumenta a concentração dos antibióticos no suco gástrico, promovendo um melhor tratamento (HUNT, 2005).

Os antiácidos, a partir de uma reação de neutralização com o ácido gástrico, formam água e dióxido de carbono. Os mais encontrados são o hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, carbonato de sódio e carbonato de cálcio. No entanto, causam efeitos colaterais como alcalose, náuseas, distensão abdominal, flatulência, diarreia e constipação (JAIN *et al.*, 2007).

Uma vez que os mecanismos da secreção gástrica também envolvem receptores muscarínicos, surgiram no mercado os anticolinérgicos, que antagonizam receptores muscarínicos localizados nos gânglios intramurais da parede do estômago, reduzindo a dor e a motilidade duodenal. Entretanto efeitos indesejáveis podem ocorrer, como: boca seca, visão turva e constipação (JAIN *et al.*, 2007).

O receptor H_2 apresenta importante papel na modulação da secreção gástrica e antagonistas deste receptor são amplamente utilizados no tratamento de úlceras gastrintestinais (SOLL; WALSH, 1979). Antagonistas dos receptores histaminérgicos do tipo H_2 , cimetidina e ranitidina, impedem a interação da histamina com os receptores, reduzindo o volume do suco gástrico, bem como a concentração de íons H^+ . Estas drogas são consideradas seguras, apesar

da incidência de efeitos adversos como, diarreia, cefaleia e tontura (AIHARA *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2007).

O reconhecimento de que a enzima (H^+/K^+ -ATPase ou bomba de prótons) constitui a etapa final da secreção ácida levou ao desenvolvimento de uma classe de fármacos, a dos inibidores da bomba de prótons (IBPs), usadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais (WOLFE, 2003).

Todos os inibidores da bomba de prótons são “pró-fármacos”, necessitam de meio ácido para serem ativados. Os fármacos dessa classe entram na célula parietal a partir do sangue e acumulam-se nos canálculos secretores de ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons, que resulta na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Essa forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da (H^+/K^+ -ATPase), inibindo a produção de ácido (HOOGERWERF; PASRICHA, 2005). A restauração da enzima (H^+/K^+ -ATPase) ocorre cerca de 96 horas após a dose oral de pantoprazol (KROMER, 1995), um dos inibidores da bomba de prótons.

Alguns dos efeitos adversos dos inibidores da bomba de prótons incluem náuseas, diarreia e tontura (JAIN *et al.*, 2007; SCHUBERT e PEURA, 2008). O ideal é que os IBPs sejam utilizados por pouco tempo, uma vez que continuam a existir preocupações sobre o impacto à saúde no uso destes a longo prazo (BRAGA; DA SILVA; ADAMS, 2011).

Na dose habitual (20 a 40 mg/dia), o omeprazol, outro inibidor da bomba de prótons, inibe acima de 90% a secreção ácida por 24 horas na maioria dos pacientes, tornando muitos destes pacientes quase aclorídricos. Devido a esta potência, há dúvidas sobre a segurança do seu uso a longo prazo. O ácido gástrico, por um mecanismo de "feedback", inibe a secreção endócrina da gastrina pelas células G. Se a acidez gástrica é nitidamente reduzida, as células G secretam maiores quantidades de gastrina, levando à hipergastrinemia. Por sua vez, a gastrina é um hormônio trófico, estimula a proliferação, o crescimento celular e tecidual. A utilização de omeprazol por períodos longos pode produzir proliferação de células e tumores carcinoides (DE GIACOMO, 1990).

Vanderhoff e Tahboub (2002) relataram que a administração de pantoprazol por longo prazo, 24 meses, em ratos e camundongos causou a inibição da secreção ácida gástrica e levou a hipergastrinemia, resultando na hiperplasia das células e formação de tumores carcinóides no estômago nos animais testados.

Apesar do considerável avanço no tratamento das úlceras gástricas, deve-se levar em consideração os efeitos adversos e ainda o fato de alguns pacientes não responderem ao tratamento (KANGWAN *et al.*, 2014). Estes aspectos apontam a necessidade de novas ferramentas terapêuticas que apresentem efetividade no tratamento e induzam menos efeitos colaterais.

Segundo Lewis e Hanson (1991), destacam-se como principais compostos de plantas com atividade antiulcerogênica os terpenos, flavonóides, compostos fenólicos, taninos, alcalóides, glicosídeos, saponinas e polissacarídeos. Estes compostos apresentam atividade antiulcerogênica possivelmente por atuarem estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, aumentando a produção de prostaglandinas e/ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002).

Estudos etnofarmacológicos reportaram o uso tradicional de preparações aquosas e alcoólicas da *L. ferrea* no tratamento de diarreia, inflamações, sintomatologias dolorosas (BRAGANÇA, 1996) e no controle de problemas gástricos (SAMPAIO *et al.*, 2009), por isso a importância de avaliar e comprovar cientificamente a possível atividade gastroprotetora da espécie, visando uma opção terapêutica mais segura e acessível à população.

2.5 *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P Queiroz var. *ferrea*

A espécie *Libidibia ferrea* é uma árvore (Figura 5) popularmente conhecida como “pau-ferro” ou “jucá” (CAVALHEIRO *et al.*, 2009) predominante nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, com destaque nos estados do Ceará e Pernambuco (ALZUGARAY, 1983), no Norte do país está distribuída nos estados do Pará, Roraima, Amazonas, Rondônia e Amapá (DA SILVA *et al.*, 1988). Há relatos históricos de que esta espécie, tenha sido inserida na Floresta Amazônica por imigrantes nordestinos durante o período da borracha. A floração ocorre entre os meses de abril e maio, na estação seca e se estende até o início da estação chuvosa. A frutificação ocorre entre os meses de maio a agosto, que coincide com o final da estação seca e se prolonga pela chuvosa, produzindo grande quantidade de frutos (SOUZA, 2007; LORENZI, 2014).

Figura 5 - *Libidibia ferrea*

A- Árvore; B- Folhas e Flores; C- Frutos (vagens). Fonte: Arquivo pessoal.

Seu tronco, liso e de cerne duro, possui manchas esbranquiçadas. As folhas são compostas e bipinadas, apresentando até 5 pares de folíolos oblongos ou ovais. As flores são de coloração amarela, pequenas e em cachos, sendo possível o florescimento da planta mesmo sem a presença das folhas. Os frutos, de cor marrom escura, são do tipo legume (vagem) com sementes também escura. (LORENZI, 1998; VASCONCELOS *et al.*, 2011). A vagem apresenta legume liso, achatado, seco e com mesocarpo polposo, contendo de uma a quatro sementes e chegando a pesar de 4,4 a 14,2 g, com 3,8 a 9,3 cm comprimento por 1,0 a 2,9 cm de largura (PICKLER, 2015). A classificação taxonômica da espécie *L. ferrea* pode ser descrita conforme o Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação Taxonômica de *L. ferrea* Mart

DIVISÃO	MAGNOLIOPHYTA (ANGIOSPERMAE)
CLASSE	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
SUBCLASSE	Rosidae
ORDEM	Febales
FAMÍLIA	Fabaceae
SUBFAMÍLIA	Caesalpiniaceae (Caesalpinioideae, Leguminosae)
ESPÉCIE	<i>Libidibia ferrea</i> Martius ex Tulasne var. <i>ferrea</i>

Fonte: LIMA, 2010.

L. ferrea é uma espécie nativa do Brasil e muito importante economicamente. A sua madeira é muito resistente e apresenta fibras reverssas, empregada na construção civil. Também é uma árvore utilizada no paisagismo e na recuperação de áreas degradadas (CORRÊA, 1984; SANTANA *et al.*, 2011).

2.5.1 *Libidibia ferrea*: atividades biológicas e composição fitoquímica

A utilização consistente de diferentes partes da *L. ferrea* na medicina popular para o tratamento de várias doenças e sintomas foi relevante para o Ministério da Saúde incluí-la na Lista Nacional de Plantas Medicinais importantes para o Sistema de Saúde (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

Silva *et al.* (2011) analisando três espécies vegetais quanto a capacidade antioxidante e de proteção ao DNA, comprovaram que os frutos da *L. ferrea* possuem a capacidade de eliminar o dano ao DNA produzido por radicais hidroxila e atividade antioxidante devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos.

Vasconcelos *et al.* (2011) investigaram a atividade anti-hiperglicemiante da casca do caule da *L. ferrea* em ratos diabéticos. Os resultados indicaram atividade do extrato com possível mecanismo de ação relacionado à regulação da absorção de glicose no fígado e músculos através da ativação da proteína quinase.

Freitas *et al.* (2012) comprovaram a atividade anti-inflamatória do extrato bruto das vagens no ensaio de peritonite induzida por carragenina; o extrato reduziu o número de leucócitos e o nível de nitrito em exsudatos inflamatórios.

Guerra *et al.* (2017) associaram a atividade da *L. ferrea* contra linhagens de células do câncer colorretal ao aumento dos níveis de glutathione (GSH) e redução da peroxidação lipídica no tecido.

Compostos isolados dos frutos da *L. ferrea*, ácido gálico e metil-galato, reduziram significativamente o número de papilomas de pele induzidos por 12-O-tetra-decanoilforbol-13-acetato (TPA) em camundongos (NAKAMURA *et al.*, 2002).

Araújo *et al.* (2014) identificaram na casca do caule da *L. ferrea* taninos condensados (catequinas) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico) nos extratos brutos utilizando água e acetona como solventes extratores. Estes compostos também foram identificados por Schmidt *et al.* (2011); Vasconcelos *et al.* (2011) e Chang *et al.* (2013).

De acordo com o estudo de Ueda; Kawanishi; Moriyasu (2004), nos frutos de *L. ferrea* há presença de ácido gálico e ácido elágico que são monômeros de taninos hidrolisáveis. Port's

et al. (2013) avaliaram os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de nove infusões de folhas de espécies vegetais da região amazônica (*Chrysobalanus icaco*, *Luehea speciosa*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *Annona muricata* L, *Bauhinia unguolata*, *Fridericia chica*, *Croton spp*, *L. ferrea*.) Entre as espécies estudadas, o extrato metanólico de *Libidibia ferrea* foi o que apresentou maior teor de polifenóis totais (68,13 mg/g equivalentes de ácido gálico). Os principais compostos encontrados foram a quercetina (0,13 mg/g) e o ácido gálico (0,59 mg/g). Os resultados também indicaram uma alta capacidade antioxidante em relação às demais espécies estudadas.

Em um estudo de revisão sobre as atividades biológicas e composição fitoquímica da *L. ferrea*, Ferreira e Soares (2015) relataram que as atividades biológicas da espécie podem ser atribuídas a presença de compostos como flavonoides, chalconas, taninos e terpenos obtidos de extratos das folhas, frutos e casca do caule de *L. ferrea*.

A partir deste levantamento foi possível verificar que esta espécie apresenta compostos com promissora atividade antioxidante e potencial biológico comprovado no tratamento de diversas doenças. Uma vez que estudos etnofarmacológicos apontam o uso de *L. ferrea* no tratamento de problemas gástricos, se faz necessário um estudo farmacológico com as vagens, parte renovável do vegetal, que pode ser importante como ferramenta terapêutica para o manejo desta doença.

2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SUBSTÂNCIAS GASTROPROTETORAS

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para a ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados nas membranas celulares. A abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal, como o processo respiratório leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (JORDÃO JÚNIOR *et al.*, 1998; SIKORA *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo caracteriza-se por um distúrbio no estado de equilíbrio entre o sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas. Quando existe maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema pende para o lado pró-oxidativo, resultando no dano oxidativo em lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, alterando substâncias envolvidas na expressão gênica e respostas inflamatórias (JORDÃO JÚNIOR *et al.*, 1998; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Ao correlacionar a atividade antioxidante com o efeito gastroprotetor, estudos mostram que as defesas antioxidantes exercem um papel complementar na proteção da mucosa gástrica ao impedir o estresse oxidativo provocado pelo aumento nos níveis intracelulares de EROs (MÁTES, 2000). Um mecanismo proposto que relaciona etanol, radicais livres e lesão gástrica sugere o envolvimento de canais receptores de potencial transiente vaniloides do tipo 1 (TRPV-1), que, ao serem ativados por etanol, resultam na liberação de substância P que estimula receptores de neurocinina-1 a gerar espécies reativas de oxigênio (GAZZIERI, 2007).

2.6.1 Atividade antioxidante *in vitro*

Uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração, comparada ao seu extrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (JORDÃO JÚNIOR *et al.*, 1998).

Compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas ligadas a anéis aromáticos, que os conferem o poder antioxidante. Dentre os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural, destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (SOARES, 2002; ÂNGELO; JORGE, 2007). Formados a partir do metabolismo secundário das plantas, os compostos fenólicos são importantes para a proteção dos vegetais em condições adversas como injúrias e radiação ultravioleta, estes favorecem o crescimento e a perpetuação da espécie (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004). Estudos científicos comprovaram a atividade antiulcerogênica de compostos fenólicos e flavonoides (DE JESUS; FALCÃO; GOMES, 2012; SAKUNPAK; PANICHAYUPAKARANANT, 2012). Suas propriedades antioxidantes e a capacidade de reduzir a peroxidação lipídica melhora a vascularização da região afetada, prevenindo ou retardando o processo de necrose celular (SAKUNPAK; PANICHAYUPAKARANANT, 2012).

O método de Folin-Ciocalteu (LI *et al.*, 2008) determina o conteúdo de compostos fenólicos presentes em espécies vegetais. A execução deste teste envolve a redução do reagente (ácidos fosfotúngstico e fosmomolibdico) pelos compostos fenólicos da amostra formando um complexo azul (óxido de tungstênio e molibdênio). A intensidade da coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SOUSA *et al.*, 2007).

A partir da década de 60, o cloreto de alumínio passou a ser empregado como um reagente de desvios (“shift reagent”) em espectrometria no UV-visível para a determinação estrutural de flavonoides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; MARKHAM, 1982).

O cátion alumínio forma complexos estáveis com flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais. O complexo flavonoide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonoide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos como $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (DO RIO, 1996; WOISKY; SALATINO, 1998).

Após a quantificação de compostos antioxidantes, outros métodos podem ser executados a fim de avaliar a atividade antioxidante destes compostos (SANCHEZ-MORENO, 2002). Estas análises auxiliam na seleção de espécies vegetais para a realização de estudos farmacológicos (ALVES *et al.*, 2010).

Na investigação do potencial antioxidante de produtos naturais, como extratos de plantas medicinais e vegetais comestíveis, o ensaio de redução do radical livre DPPH tem sido considerado do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, reprodutível e preciso (MENSOR *et al.*, 2001). O radical DPPH é formado diretamente em solução, apresenta coloração violeta e na presença de substâncias antioxidantes (doadores elétrons ou átomos de hidrogênio para o DPPH), este radical se reduz, tornando-se amarelo, por consequência ocorre decréscimo na absorbância durante a reação (PÉREZ *et al.*, 2007).

Outro método que também avalia o potencial antioxidante, o ABTS, foi preconizado por Re *et al.* (1999). Neste, o radical é gerado por persulfato de potássio, o $ABTS^{+}$ pré-formado forma um cromóforo verde azulado de cor intensa. A oxidação do ABTS começa imediatamente após a adição do persulfato de potássio. Depois de formado, o $ABTS^{\bullet}$ pode ser reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio perdendo sua coloração. Através da redução do $ABTS^{\bullet}$ será determinada a porcentagem de inibição em função da concentração do antioxidante e o cálculo da atividade anti-radical livre será relativo à reatividade do padrão Trolox, sob as mesmas condições. O resultado é expresso pela Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) (MOURA, 2011).

2.6.2 Atividade antioxidante *in vivo*

A exposição do organismo aos radicais livres levou ao desenvolvimento de defesas antioxidantes enzimáticas em grande número e espalhadas por todo o corpo. A peroxidação lipídica prossegue através de um mecanismo em cadeia de radicais livres resultando em muitos produtos finais, os aldeídos são mais proeminentes, entre eles, o mais estudado é o malondialdeído (MDA) (FERNANDEZ; PEREZ-ALVAREZ; FERNANDEZ-LOPEZ, 1997), um marcador de dano oxidativo em sistemas fisiológicos (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). A produção de MDA pode ser estimada por um método colorimétrico, mensurando as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; MARNETT, 1999).

Atualmente, há muito interesse em reduzir o estado de oxidação de tecidos humanos para prevenir ou tratar doenças (TOALDO *et al.*, 2015). A peroxidação lipídica é um produto da oxidação que pode ser mensurado em estudos com animais, onde a morfologia do órgão pode ser monitorada. A avaliação da atividade antioxidante através de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (GSH-Px) fornece uma abrangente imagem do efeito de intervenções dietéticas ou o uso de extrato de plantas medicinais sobre o estado oxidativo no organismo (GHANI; BANIL; BEDGOOD JR, 2017).

Antioxidantes enzimáticos são a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio que induzem danos oxidativos em organismos vivos (SELLAMUTHU *et al.*, 2013). A enzima glutathione peroxidase (GSH-Px) desempenha o importante papel de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SARAVANAN; PONMURUGAN, 2013). Esta espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical $OH^\cdot$ (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004), o radical livre mais propício na produção de danos oxidativos. Além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica (WELCH *et al.*, 2002).

O Sistema de defesa antioxidante é de substancial importância para a proteção contra agressões gástricas, uma vez que EROs estão associadas com a etiologia e a fisiopatologia das UP (REPETTO; LLESUY, 2002).

2.7 ESTUDOS DA SEGURANÇA DE USO DE PLANTAS MEDICINAIS

A toxicidade de uma substância pode ser definida como a capacidade de causar dano grave ou morte a um dado organismo (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944). Toda substância química pode ser um agente tóxico em potencial, dependendo da dose administrada, do tempo de exposição, frequência ou via de administração (CASTRO, 1993).

A ampla utilização das plantas em diversos tratamentos, tem apontado dados de que as plantas medicinais não são tão seguras como frequentemente são tidas pela população. Várias substâncias provenientes do reino vegetal apresentam elevada toxicidade. Os produtos da biotransformação de qualquer medicamento fitoterápico devem ser considerados potencialmente tóxicos, até que estudos toxicológicos sejam realizados (LAPA *et al.*, 2000).

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos de plantas medicinais têm por objetivo avaliar a toxicidade das plantas visando seu uso de forma segura para o organismo. A obtenção de dados toxicológicos em humanos é bastante limitada devido às questões éticas, morais e legais. Portanto, a maior parte dos estudos toxicológicos são realizados por meio de testes pré-clínicos que utilizam animais de laboratório em condições padronizadas (BOELSTERLI, 2003).

O Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos foi elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) tendo como referência documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos como a Food and Drug Administration (FDA) e de instituições de interesse na área como a Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional.

2.7.1 Toxicidade aguda

O ensaio da toxicidade aguda é a primeira análise toxicológica a ser realizada. Este ensaio avalia a toxicidade produzida por uma substância quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (OECD 425, 2001). Recomenda-se o uso da via de administração correspondente ao uso em humanos, sendo a via oral a mais utilizada (KLAASSEN; AMDUR; DOULL, 1996).

2.7.2 Toxicidade de doses repetidas

O estudo toxicológico de doses repetidas avalia a toxicidade de uma substância a partir da administração de doses diárias e tem como principal objetivo estabelecer os níveis nos quais não mais se observam efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os órgãos afetados, bem como o grau de comprometimento dos mesmos (TAHRAOUI; ISRAILI; LYOUSSI, 2010).

Assim como no ensaio da toxicidade aguda, a administração da substância por via oral também é a mais usada na avaliação da toxicidade de doses repetidas. É importante ressaltar, que neste estudo, a exposição do organismo à determinada substância por um intervalo de tempo, provoca o acúmulo do composto e permite a avaliação dos efeitos tóxicos cumulativos (OECD 407, 2008).

A toxidade pode ser identificada através da redução da massa corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração (CUNHA *et al.*, 2009), além de sinais comportamentais como prostração, apatia e a presença de piloereção. Segundo Lapa *et al.* (2007), a toxicidade sistêmica também pode ser identificada por meio das alterações relacionadas a massa relativa dos órgãos.

Ao final do período de administração da substância avaliada, os animais devem ser eutanasiados para a coleta de sangue e análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os órgãos são removidos para as análises macro e microscópicas (BARNES; DOURSON, 1988).

2.7.3 Toxicologia do desenvolvimento

A toxicologia do desenvolvimento envolve o estudo da toxicologia da reprodução e teratologia. A toxicologia da reprodução estuda os possíveis efeitos adversos que substâncias em estudo podem causar aos sistemas reprodutores masculino e feminino, enquanto a teratologia estuda as alterações induzidas durante a fase de desenvolvimento embrionário e fetal (BARROS; DAVINO, 1996).

Em 1941, ocorreram as primeiras publicações a respeito das graves perturbações ao desenvolvimento embrionário causadas pelo vírus da rubéola. Em 1957, a talidomida foi lançada no mercado e em pouco tempo estava presente em todos os continentes, sendo comercializada em 46 países como sedativo, usado no início da gestação, para reduzir o enjôo matinal. Mais adiante, esta droga foi associada a milhares de casos de focomelia, uma síndrome

caracterizada pela aproximação ou encurtamento dos membros junto ao tronco do feto (MOORE; PERSAUD, 2008).

O período gestacional requer preocupação quanto ao uso de medicamentos e substâncias no geral, visto que a exposição materna a agentes químicos, em determinadas fases deste período pode resultar em alterações no desenvolvimento do conceito (BERNARDI, 2006; NAVA; ROMAN, 2010). Muitos compostos químicos têm a capacidade de atravessar a barreira placentária e expor o feto a efeitos terapêuticos ou teratogênicos (NAKAMURA; KULAY JR; PASQUALE, 2008).

O transporte placentário é mediado por uma rede complexa de transportadores membranares que se distribuem de uma forma polarizada no sinciotrofoblasto, que é a unidade funcional da placenta (KEATING, 2007). Muitos compostos, incluindo plantas consideradas medicinais, podem chegar ao feto através da placenta e uma única exposição da gestante a um agente teratogênico pode afetar as estruturas que se encontram em rápido desenvolvimento (BROLIO *et al.*, 2010).

O emprego de ratas como modelo experimental para estudos que envolvem reprodução humana justifica-se pela existência de similaridades no comportamento reprodutivo das duas espécies. Dentre essas, podem ser ressaltadas: o intervalo temporal entre o coito e a implantação do blastocisto no útero, de 4 a 6 dias, correspondente ao período de pré-implantação, e a deciduação, que é a formação do componente maternal da placenta, caracterizada por uma íntima relação entre as circulações materna e fetal (GRAY; OTSBI; KELCE, 2004). O fato das fêmeas de roedores e humanos compartilharem também o tipo de placenta, denominada hemocorial, caracterizada por uma maior invasão tissular da mucosa uterina pelos vilos coriônicos e íntimo contato entre placenta e tecido uterino, favorece a passagem de substâncias químicas lipossolúveis e de baixo peso molecular da circulação materna para a fetal (FLORIO; SOUSA, 2006).

Em ratas, o ciclo estral é constituído de quatro fases: proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II), e tem duração em média de 4 a 5 dias. A ovulação ocorre durante a fase estro caracterizada por aumento significativo no grau de cornificação do epitélio, resultante dos altos níveis de estrogênio. As células apresentam-se cornificadas e não se observa presença de células nucleadas ou de leucócitos. As fases não férteis do ciclo correspondem ao metaestro e o diestro, caracterizadas pela presença predominante de leucócitos e muco. Nessas fases o

estradiol, progesterona, FSH e LH encontram-se diminuídos (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Segundo Bernardi (1999), a sensibilidade aos agentes teratogênicos e embriofetotóxicos divide a gestação das ratas em três fases: pré-implantação (0 – 5º dia de prenhez), organogênese (6º - 15º dia de prenhez) e fetal (16º - 21º dia de prenhez). Os agentes capazes de promover má-formações congênitas são chamados teratogênicos, enquanto os agentes que produzem retardo no desenvolvimento, variações na ossificação ou morte do conceito, mas não promovem má-formações, são conhecidos como embriofetotóxicos (WEBSTER; FREEMAN, 2001).

Aliverti *et al.* (1979), preconiza que em estudos com avaliação teratogênica se deve aguardar todo o período gestacional das ratas para a avaliação dos fetos, uma vez que a ossificação estará suficientemente avançada, homogênea e uniforme para permitir observações significativas. Estes pesquisadores reforçam que ao se especificar o 21º dia para a eutanásia, deve-se assumir como dia 0, o dia no qual os espermatozoides são encontrados nos esfregaços vaginais.

Com relação a performance reprodutiva materna, de acordo com Almeida e Lemônica (2000), a taxa de perda pré-implantação é a correlação entre o número de óvulos liberados e aqueles que, depois de fecundados, conseguiram ser implantados no útero. Já a perda pós-implantação refere-se à relação entre o número de blastocistos implantados e aqueles que não conseguiram se desenvolver. Ao blastocisto implantado, que não conseguiu se desenvolver dá-se o nome de “reabsorção” e isso indica falha no desenvolvimento do embrião.

Podem existir dois tipos de reabsorções: prévias e tardias. Foi considerada uma reabsorção prévia, quando observado um sítio de implantação na ausência de feto/placenta. A reabsorção tardia foi caracterizada pela presença da placenta e ausência de feto ou feto morto com alterações degenerativas externas.

Vasconcelos *et al.* (2011); Freitas *et al.* (2012); Hassan *et al.* (2015) e Kobayashi *et al.* (2015) realizaram estudos sobre a toxicidade aguda da *L. ferrea*. Peters *et al.* (2008) verificaram a toxicidade do extrato aquoso dos frutos de *L. ferrea* administrado a ratas Wistar durante o período de implantação do blastocisto. Lucinda *et al.* (2010) avaliaram se a administração crônica do extrato de frutos da *L. ferrea* interfere na produção de espermatozoides e órgãos reprodutivos de ratos Wistar. Pickler *et al.* (2019) investigaram a fetotoxicidade e toxicidade materna de extratos hidroalcoólicos da casca e semente de *L. ferrea* durante prenhes de ratas Wistar.

A investigação da segurança de uso de *L. ferrea* é de suma importância, uma vez que esta espécie é muito utilizada na medicina tradicional e os estudos já realizados não avaliaram a possível toxicidade subcrônica da *L. ferrea*, e a toxicidade enfatizando os dois períodos gestacionais, pré-implantação e organogênese.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antioxidante e antiulcerogênica, e investigar a segurança de uso do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea* (Fabaceae).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os principais constituintes químicos do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*;
- Avaliar a atividade gastroprotetora do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*;
- Realizar a análise histológica e determinar as concentrações de parâmetros antioxidantes no tecido gástrico de ratos Wistar;
- Explorar a atividade antissecretória ácida gástrica do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*;
- Determinar a influência dos grupamentos sulfidrílicos e óxido nítrico no efeito gastroprotetor do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea* e propor o seu provável mecanismo de ação;
- Avaliar a atividade cicatrizante do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*;
- Avaliar a atividade anti - *Helicobacter pylori* do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*;
- Avaliar a toxicidade do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea* após doses repetidas (30 dias) sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e morfológicos de ratos Wistar;

- Avaliar a toxicidade reprodutiva do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea* sobre os parâmetros reprodutivos de ratas Wistar nos períodos de pré-implantação (0 ao 5º dia de prenhez) e organogênese (6º ao 15º dia de prenhez);
- Analisar o potencial embriofetotóxico e teratogênico do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos utilizados na avaliação da atividade antiulcerogênica do ESvLf foram realizados conforme o fluxograma experimental apresentado na Figura 6.

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Vagens de *Libidibia ferrea* foram coletadas no município de Barbalha, Ceará, Brasil (S 7°18'40", W 39°18'15"), no início de setembro de 2015. Uma amostra representativa da espécie foi depositada no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) sob o número de registro 90603. As vagens foram secas à temperatura ambiente por 72 h, posteriormente, foram trituradas em moinho de facas (Wyllie Macro - TE 650). O material vegetal (100 g) foi submetido a maceração fria com solvente hidroalcoólico a 40%, por 3 dias. Após este procedimento, o extrato foi filtrado e o solvente completamente removido com o auxílio de um Spray Dryer (MSD 0.5, Labmaq do Brasil, Ltda). Os parâmetros utilizados foram: vazão do ar de secagem, 4,5 m³/min; temperatura de saída, 95°C; vazão de ar comprimido de 40 L/min, e bomba peristáltica de 0,5 L/h. O extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea* (ESvLf) obtido, apresentou um rendimento de 18,85%, w/w. Para os experimentos *in vivo*, o extrato foi dissolvido em água destilada no momento do uso.

4.2 PERFIL FITOQUÍMICO

4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foi realizada a identificação das seguintes classes de metabólitos secundários, presentes no ESvLf: flavonoides, derivados cinâmicos, fenilpropanoides, triterpenos, esteroides, mono, sesquiterpenos, cumarinase quinonas, alcaloides, proantocianidinas, e taninos hidrolisáveis, empregando padrões e reveladores químicos específicos (Tabela 1).

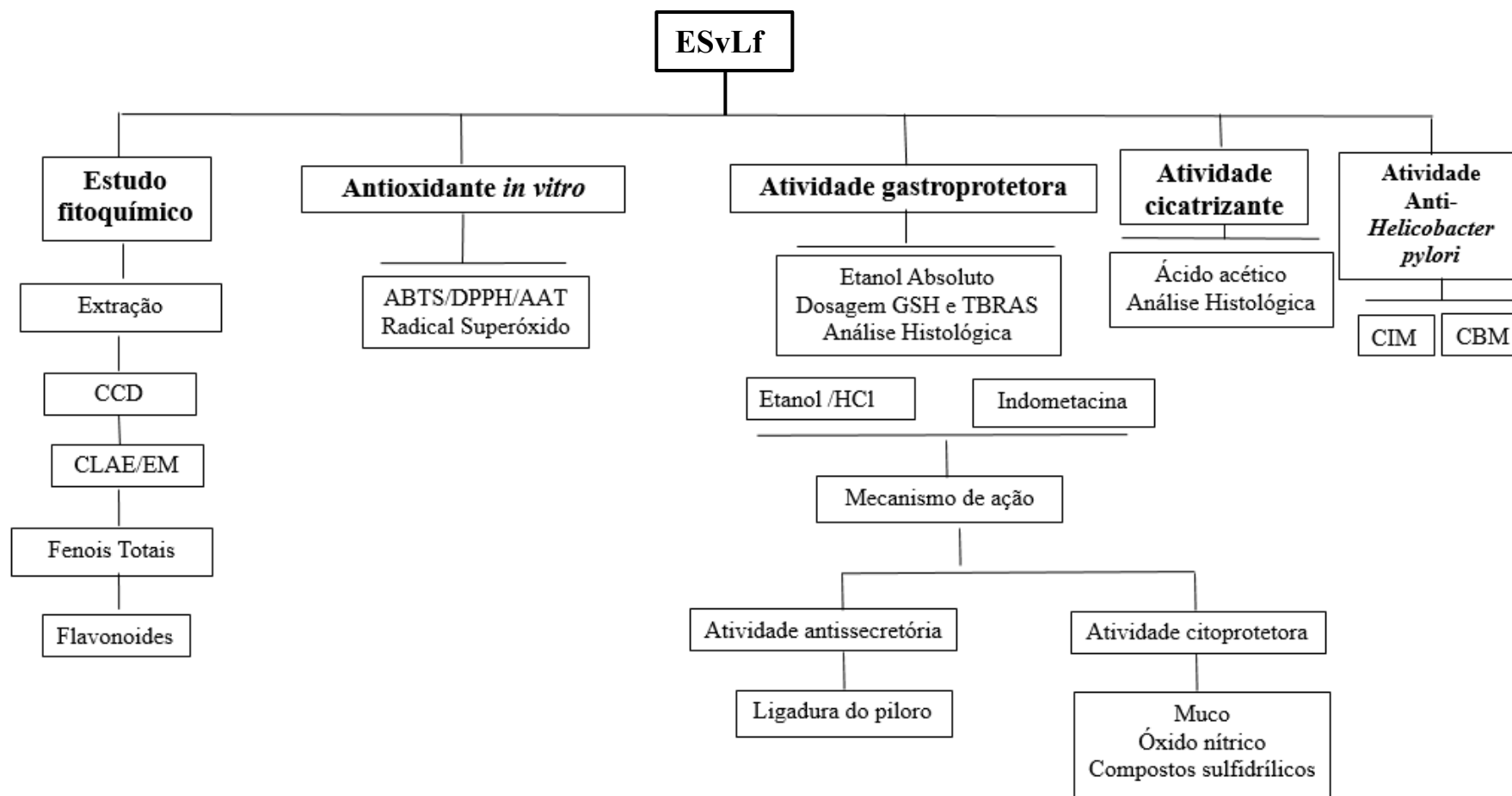
Tabela 1 - Metabólitos secundários investigados, padrões e reveladores utilizados na caracterização fitoquímica do extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*.

Metabólitos secundários	Padrões	Reveladores	Referências
flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoides	quercetina, rutina e ácido clorogênico	Acetato de etila (NEU)	Wagner & Bladt, 1996; Brasseur & Angenot, 1986
triterpenos e esteroides	β -sitosterol	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
mono e sesquiterpenos	timol	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
cumarinas e quinonas	cumarina e lapachol	Hidróxido de potássio (KOH)	Wagner & Bladt, 1996
alcaloides	pilocarpina	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
proantocianidinas	catequina	Vanilina clorídrica	Roberts et al. 1957
taninos hidrolisáveis	ácido gálico	Alúmen de ferro 1%	Harborne, 1998

4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-EM)

O ESvLf foi submetido a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM), usando uma coluna octadecilsilano de (250 x 4,6 mm, 5 μ m, Luna C18, Phenomenex). A fase estacionária e a fase móvel foram compostas por 2 solventes: A - 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura e B - 0,1% de ácido fórmico em metanol (grau HPLC) com taxa de fluxo de 1,0 mL/min, nas seguintes condições de gradiente: 95% a 5% A (0 - 60 min), 5% a 0% A (60 - 70 min), 0% a 95% A (70 - 90 min). A fase estacionária foi mantida a 30°C e o volume injetado foi de 20 μ L para a amostra (1 mg/mL) monitoradas de 190 a 400 nm e de 50 a 1000 m/z. As análises utilizaram um LC-20 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU-20A, detector PDA modelo SPD-20AVP, forno modelo CTO-20ASVP, injetor automático modelo SIL-20ADVP e controlador modelo SCL-20AVP acoplado a um espectrômetro de massas ESI-IT (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray operando no modo de analisador e por captura de íons positivos. 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; pressão de 60 PSI, usando nitrogênio como gás de secagem e nebulização.

Figura 6 - Fluxograma dos métodos utilizados na avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato seco das vagens de *L. ferrea*.



4.3 QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO ESvLf

4.3.1 Determinação do Conteúdo de Fenois Totais

O conteúdo de fenóis totais (CFT) do ESvLf foi determinado usando o reagente Folin–Ciocalteu (FC), como descrito por Li et al. (2008). O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação das absorbâncias das amostras em uma curva analítica construída com soluções padrão de ácido gálico (31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A Equação de regressão linear obtida foi ($y = 0,0027x + 0,6099$) e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9938$. Todas as análises foram realizadas em triplicata e em ambiente escuro.

4.3.2 Determinação do Conteúdo de Flavonoides

O conteúdo de flavonoides do ESvLf foi determinando a partir da metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998) a 0,5 mL de amostras diluídas, foi adicionado 0,5 mL de solução a 2% de AlCl_3 (p/v) preparada em metanol. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, protegida da luz, a absorbância a 420 nm foi mensurada. Para determinar o teor de flavonoides construiu-se uma curva analítica com soluções padrão de quercetina (31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo as absorbâncias das amostras interpoladas nela. O teor de flavonoides totais foi expresso como mg de EQ (equivalente de quercetina) por g de extrato. A Equação de regressão linear obtida foi ($y = 0,014x - 0,1974$), e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9935$. As análises foram realizadas em triplicata e em ambiente escuro.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO ESvLf

4.4.1 Atividade sequestradora do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS)

A atividade de eliminação do radical ABTS foi realizada de acordo com Uchôa *et al.* (2015), usando Trolox como padrão. Todas as experiências foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada considerando a Equação 1, onde (Ac) é a absorbância do controle e (As) a absorbância na presença do extrato. Foi calculada a concentração necessária para inibir 50% dos radicais ABTS (CI_{50}).

$$I\% = \left[\frac{(Ac-As)}{Ac} \right] \times 100 \quad (1)$$

4.4.2 Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH)

A atividade de eliminação de radicais livres foi medida por meio de doação de hidrogênio usando o radical estável DPPH, com o Trolox como padrão (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Todas as experiências foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada considerando a Equação 2, onde (Ac) é a absorbância do controle e (As) a absorbância na presença do extrato. Foi calculada a concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres de DPPH (CI₅₀).

$$I\% = \left[\frac{(Ac-As)}{Ac} \right] \times 100 \quad (2)$$

4.4.3 Atividade Antioxidante Total (AAT)

A atividade antioxidante total (AAT) foi realizada de acordo com a metodologia de Prieto; Pineda e Aguilar (1999), com base na redução de molibdênio (VI) para molibdênio (V), na presença de antioxidantes no pH ácido. Todas as experiências foram realizadas em triplicata. A AAT das amostras foi expressa em relação ao ácido ascórbico (AA, 0-1000 µg/mL) utilizado como padrão, cuja atividade antioxidante de referência foi considerada igual a 100%, utilizando a Equação 3, onde (As) é a absorbância da amostra, (Ac) é a absorbância do controle (branco: sem extrato) e (Aaa) é a absorbância do ácido ascórbico. A concentração necessária para redução de 50% de molibdênio (CI₅₀) foi calculada.

$$\% AAT = \frac{(As - Ac) \times 100}{(Aaa - Ac)} \quad (3)$$

4.4.4 Atividade sequestradora do radical superóxido (O₂⁻)

Este teste foi realizado de acordo com Dasgupta e De (2004), com modificações. Os radicais superóxido foram gerados usando o sistema cloreto de nitrotetrazólio azul/nicotinamida adenina dinucleotídeo (NBT/NADH). Todas as experiências foram realizadas em triplicata. A capacidade de inibição (%) da redução fotoquímica de NBT foi calculada usando a Equação 4, onde Ac é a absorbância do controle e As é a

absorbância da amostra. A concentração necessária para inibir 50% do radical superóxido (CI₅₀) foi calculada.

$$\% I = \left[\frac{(Ac-As)}{Ac} \right] \times 100 \quad (4)$$

4.5 ESTUDOS *IN VIVO*

4.5.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, com três meses de idade (*Rattus norvegicus* var. *albinus*), e massa corporal entre 200 e 350 g para os experimentos de atividade antiulcerogênica e ensaios de toxicidade. Os ratos foram fornecidos pelo Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas com piso de malha aberta para evitar coprofagia e mantidos sob iluminação controlada (ciclo de 12 horas claro/escuro), temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (55 - 65%), recebendo dieta (Presence, Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. O número de animais foi distribuído de maneira não homogênea para formar os diferentes grupos, considerando que durante os procedimentos experimentais podem ocorrer intercorrências que resultam na morte do animal ou sua exclusão do grupo. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco sob os números de registro 0016/2016 (Anexo A) e 0032/2016 (Anexo B).

4.5.2 Avaliação da Atividade Gastroprotetora

4.5.2.1 Úlcera Induzida por Etanol

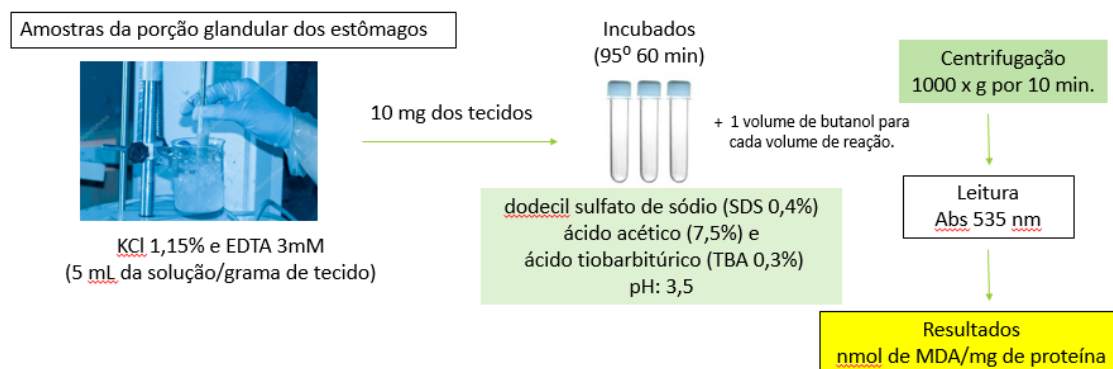
Após 16 h de jejum, os animais receberam, por via oral, solução de NaCl a 0,9% (10 mL/kg, controle negativo, n = 6), pantoprazol (40 mg/kg, n = 7) ou ESvLf (50, 100, 200 e 400 mg/kg, n = 6). Após 1 h, todos os grupos receberam o agente ulcerogênico, etanol absoluto da Merck (≥ 99,9%, 1 mL, por via oral), de acordo com o método descrito por Robert *et al.* (1979), com pequenas modificações. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ 1 h após a indução das lesões. Os estômagos foram removidos, fotografados e a área da lesão gástrica foi determinada usando o software *ImageJ* versão 1.4 (Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos como área de lesão ulcerativa (mm²). A dose efetiva (DE₅₀) que inibiu 50% da área da lesão ulcerativa foi calculada. A

porção glandular dos estômagos foi utilizada para a determinação da peroxidação lipídica, compostos sulfidrílicos não protéicos e análise histológica.

4.5.2.1.1 Determinação da Peroxidação Lipídica e dos Níveis de Compostos Sulfidrílicos Não-Protéicos

O índice de peroxidação lipídica foi determinado por meio da medida dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando o método descrito por Ohkawa; Ohishi e Yagi (1979) modificado. Os tecidos foram homogeneizados em uma solução de cloreto de potássio (KCl 1,15%) e EDTA 3 mM (5 mL da solução/grama de tecido) e mantidos em banho de gelo. Em seguida, 10 mg dos tecidos foram adicionados a um meio de reação contendo dodecil sulfato de sódio (SDS 0,4%), ácido acético 7,5% e ácido tiobarbitúrico (TBA 0,3%) pH 3,5. Os tubos de reação foram selados e incubados à 95°C por 60 minutos. Após resfriamento em água corrente, foi adicionado 1 volume de butanol para cada volume de reação, e os tubos foram centrifugados a 1000× g por 10 minutos. A absorbância da fase orgânica foi mensurada em 535 nm. Os resultados foram corrigidos pela concentração de proteína do homogenato e expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína (Figura 7).

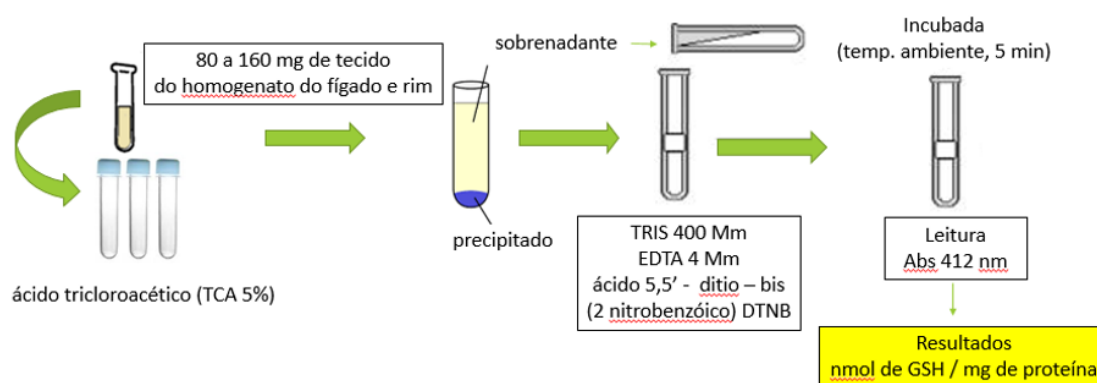
Figura 7 - Esquema representativo da mensuração da peroxidação lipídica na mucosa gástrica de ratos Wistar



Os níveis de compostos sulfidrílicos não-protéicos (-SH) no homogenato da mucosa gástrica foi determinado usando a metodologia de Sedlak e Lindsay (1968). A partir do homogenato obtido para avaliação da peroxidação lipídica, a amostra de tecido (concentração final de 50 mg/mL) foi precipitada em solução de ácido tricloroacético (TCA 5%). Em seguida, o sobrenadante (concentração final de 5 mg/mL) foi adicionado

a um meio de reação contendo TRIS 400 mM, EDTA 4 mM e ácido 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzóico) DTNB 400 μ M a um pH 8,9. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, e a absorbância foi mensurada em 412 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato e a concentração de compostos (-SH) foi expressa em nmol de GSH/mg de proteína (Figura 8).

Figura 8 - Esquema representativo da mensuração dos compostos sulfidrílicos não-protêicos na mucosa gástrica de ratos Wistar



4.5.2.1.2 Análise Histológica

Para essa análise, os estômagos foram seccionados e fixados em formalina tamponada a 10%. Depois de fixadas, as amostras foram lavadas com água, imersas em álcool etílico a 70% durante 3-4 dias, e embebidas em parafina. Secções de parafina com 5 μ m de espessura foram coradas e fixadas com hematoxilina/eosina (H & E). A análise histológica das secções gástricas foi realizada usando um sistema de microscopia automatizada MICRO DIP (Kacil Inc.).

4.5.2.2 Úlcera Induzida por Etanol Acidificado (Etanol/HCl)

Após 16 horas de jejum, os animais receberam, por via oral, solução de NaCl a 0,9% (10 mL/kg, controle negativo, n = 6), pantoprazol (40 mg/kg, n = 7) ou ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg, n = 6). Após 1 h, todos os grupos receberam o agente ulcerogênico, 1 mL de solução de HCl 0,3 M/etanol a 60%, por via oral, de acordo com o método descrito por Mizui e Douteuchi (1983). Os animais foram eutanasiados 1 h após a indução das lesões. Os estômagos foram removidos, fotografados e a área da lesão gástrica foi determinada usando o software *ImageJ* versão 1.4 (Bethesda, MD, EUA). Os resultados

foram expressos como área de lesão ulcerativa (mm²). A dose efetiva (ED₅₀) que inibiu 50% da área da lesão ulcerativa foi calculada.

4.5.2.3 Úlcera Induzida por Indometacina

Após 16 horas de jejum, os animais receberam, via oral, solução de NaCl a 0,9% (10 mL/kg, controle negativo, n = 6), pantoprazol (40 mg/kg, n = 6) ou ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg, n = 7). Após 30 minutos de pré-tratamento, as lesões gástricas foram induzidas com indometacina (30 mg/kg por via subcutânea) de acordo com o método descrito por Djahanguiri (1969), com modificações. Após 6 h de indução, os estômagos foram removidos e fotografados para a determinação de lesões gástricas, como descrito anteriormente.

4.5.3 Avaliação dos Fatores Protetores da Mucosa Gástrica

Ao contrário dos protocolos gastroprotetores anteriores, nos quais três doses foram usadas para mostrar uma relação dose-efeito do ESvLf, nos experimentos abaixo, o objetivo foi determinar o possível mecanismo de ação. Nesse sentido, avaliou-se a influência dos indicadores: concentração de muco, conteúdo gástrico, pH, acidez total e compostos NO e -SH no efeito do extrato. Apenas uma dose do ESvLf (200 mg/kg) representando a dose intermediária utilizada no estudo foi selecionada, pois supomos que, para investigar o modo de ação do extrato, não seja necessário o uso de doses diferentes, pois o mecanismo de ação farmacológico tende a ser semelhante com diferentes doses do extrato.

4.5.3.1 Determinação da Concentração de Muco na Mucosa Gástrica

O conteúdo de glicosaminoglicanos solúvel na mucosa gástrica foi investigado usando o corante *Alcian blue*, específico para mucinas ácidas (CORNE; MORRISSEY; WOODS, 1974). Este experimento foi realizado de acordo com Raffatullah *et al.* (1990). Após 16 horas de jejum, os animais (n = 6-8/grupo) receberam por via oral solução de NaCl a 0,9%, (10 mL/kg, controle negativo, n=7), carbenoxolona (200 mg/kg, n=6), ou ESvLf (200 mg/kg, n=8). Após 1 hora, sob anestesia (xilazina, 6 mg/kg associada à cetamina, 60 mg/kg, intraperitoneal), os animais foram submetidos a incisão longitudinal para a ligadura do piloro. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados e o esôfago foi pinçado para que o conteúdo estomacal não fosse perdido. Os estômagos foram

removidos, lavados com água destilada, secos e abertos ao longo da grande curvatura, o conteúdo gástrico foi recolhido e pesado. Em seguida, a porção glandular do estômago foi pesada e reservada em recipiente individual imersa em 10 mL de solução de 0,1% de *Alcian blue*. Após 2 horas de imersão, o excesso de corante foi removido da porção glandular do estômago realizando duas lavagens com 7 mL de 0,25 mol/L de sacarose, durante 15 e 45 minutos sucessivamente. Posteriormente, o corante complexado ao muco da parede do estômago foi removido transferindo cada estômago sequencialmente para 10 mL $MgCl_2$ (0,5 mol/L) e agitado em vórtex por 1 minuto em intervalos de 30 minutos, por 2 horas. Os estômagos foram removidos e os tubos Falcon com a solução foram armazenados na geladeira por aproximadamente 8 h. Após este intervalo, os tubos foram agitados por 1 minuto, em seguida, foi retirada uma alíquota de 4 mL e adicionada a 4 mL de éter etílico e agitada vigorosamente em vórtex, por 2 minutos. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 min a 1016.6x g/ 25 °C. Os tubos foram colocados em um banho de gelo, e a absorbância da camada aquosa foi obtida por leitura espectrofotométrica a 595nm. A quantidade de corante azul extraída por grama de tecido glandular foi então calculada. O resultado foi expresso em mg de *Alcian blue*/g de tecido.

4.5.3.2 Determinação da Secreção Ácida Gástrica

Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Shay *et al.* (1945), com modificações. Os animais foram divididos em 4 grupos (n = 5-7/grupo) e colocados em jejum por 16 horas com livre acesso a solução de água glicosada 5%. Para a ligação do piloro, os animais foram anestesiados (xilazina 6 mg/kg associado com cetamina 60 mg/kg, intraperitoneal), o abdome foi aberto para exposição do estômago e o piloro foi amarrado com uma sutura. Imediatamente após a ligadura, os animais receberam uma solução intraduodenal de NaCl a 0,9% (0,1 mL/100 g, controle negativo, n=6), ranitidina (60 mg/kg, n=7) ou ESvLf (200 mg/kg, n=6). A parede abdominal foi suturada e, quatro horas após a ligação do piloro, os animais foram eutanasiados. Neste experimento, um grupo controle não lesionado foi utilizado; animais deste grupo não receberam tratamento intraduodenal, mas foram submetidos a estresse cirúrgico. Um animal deste grupo morreu de complicações anestésicas. A secreção gástrica foi coletada e centrifugada em 176x g/30 min. O conteúdo gástrico (g), valores de pH e a acidez total (mEqiv. $[H^+]$ /mL/4 h) foram avaliados.

4.5.3.3 Envolvimento do Óxido Nítrico (NO) e dos Compostos Sulfidrílicos (-SH) na Gastroproteção

Para investigar a influência do óxido nítrico e dos compostos sulfidrílicos endógenos na gastroproteção, ratos machos foram distribuídos em 12 grupos e permaneceram 16 horas em jejum. Todos os grupos foram pré-tratados por via intraperitoneal, seis grupos receberam solução de NaCl a 0,9% (n=6), três grupos receberam N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 70 mg/kg, via intraperitoneal, n=8, um inibidor da enzima NO-sintase) e três grupos receberam N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg, via intraperitoneal, n=6, um bloqueador dos compostos SH responsáveis pela manutenção da integridade da barreira mucosa) (ARRIETA *et al.*, 2003; MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999). Decorridos 30 min do pré-tratamento, foi administrada solução de NaCl 0,9% (controle), carbenoxolona (100 mg/kg) ou ESvLf (200 mg/kg), por via oral. Após 1 h, todos os animais receberam etanol absoluto Merck ($\geq 99,9\%$, 1 mL, v.o) para a indução de úlceras gástricas. Após o intervalo de 1 h da administração do agente ulcerogênico, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram removidos, para determinação da área superficial da lesão gástrica, utilizando o programa Software *ImageJ*. Os resultados foram expressos em mm².

4.5.4 Avaliação das propriedades cicatrizantes do ESvLf

4.5.4.1 Úlcera Gástrica Induzida por Ácido Acético

A indução da úlcera crônica foi baseada no estudo de Takagi; Okabe e Sazik (1969), com algumas modificações. Os animais foram divididos em quatro grupos, e colocados em jejum por 16 horas. Após o jejum, os animais foram anestesiados com (xilazina, 6 mg/kg associado à cetamina, 60 mg/kg, via intraperitoneal) para a exposição cirúrgica do estômago, logo em seguida, 0,05 mL de ácido acético a 30% foi injetado na camada subserosa da parede externa do estômago. Um dia após a cirurgia, o tratamento diário começou e os animais foram tratados oralmente uma vez por dia durante 14 dias consecutivos com solução de NaCl 0,9% (controle negativo, n=6), ranitidina (60 mg/kg, n=6) ou ESvLf (200 mg/kg, n=8). Neste experimento, um grupo controle não lesionado (n=6) foi utilizado, neste os animais não receberam tratamento, mas foram submetidos a estresse cirúrgico, com incisão e sutura da parede abdominal. Durante o tratamento, os animais foram observados quanto a sinais de toxicidade, como piloereção, diarreia,

alterações na atividade locomotora ou mortalidade, e a massa corporal foi registrada. No 15º dia, os ratos foram eutanasiados, os estômagos foram removidos e fotografados, e as lesões foram mensuradas por *ImageJ* software (Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos como a área total de lesões ulcerativas (mm²). Secções dos estômagos ulcerados foram fixadas em formalina tamponada a 10%. A preparação das amostras seguiu da mesma forma que as amostras das úlceras induzidas por etanol, mas neste experimento as secções de parafina foram coradas e fixadas com hematoxilina/eosina (H & E) e Tricômico de Manson (TM).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

A atividade no crescimento bacteriano foi avaliada através da concentração inibitória mínima (CIM), pela da técnica de microdiluição em caldo e concentração bactericida mínima (CBM) de acordo com o padrão estabelecido por *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (M7-A10, 2015) com modificações (CLSI, 2015, 2017). Os ensaios foram realizados com *Helicobacter pylori* cepa ATCC 43504 (sensível à amoxicilina e resistente ao metronidazol), cultivada inicialmente em placas contendo Ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro com incubação por 72 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 10 % de CO₂. Posteriormente as colônias foram transferidas para caldo *Brain heart infusion* (BHI) (Merck Millipore cod. 110493, Darmstadt, Alemanha) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SIGMA cod. F2561; St. Louis, MO, USA), e incubadas sob as mesmas condições.

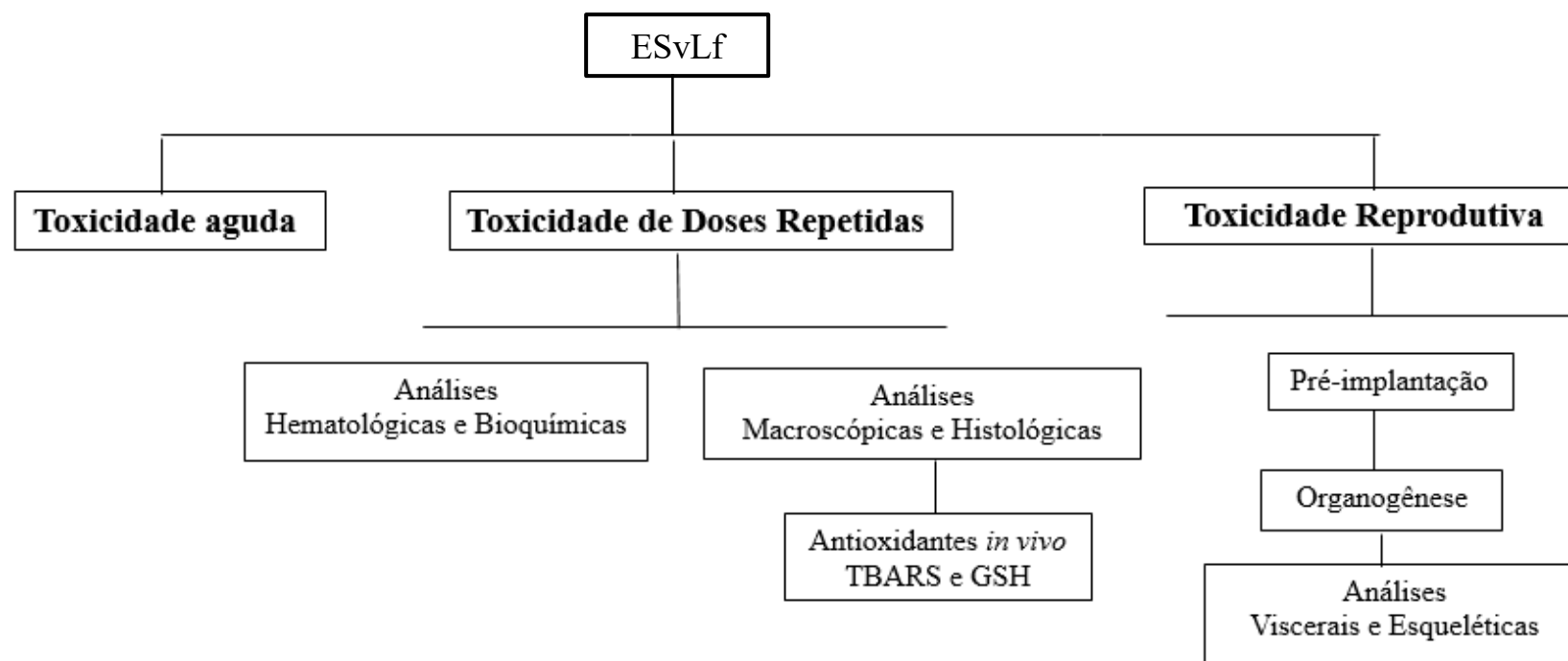
Para o ensaio da CIM, 100 µL de diferentes concentrações das amostras (32 a 1024 µg/mL) foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços e o mesmo volume de suspensão bacteriana (diluição 1:20 da escala de 0,5 McFarland) em BHI suplementado. Para controle do crescimento bacteriano, a suspensão bacteriana e o meio BHI foram adicionados; para o controle negativo, apenas amostras e meio BHI suplementado foram adicionados. A inibição do crescimento foi determinada pela diferença de absorbância a 620 nm obtida antes e após a incubação por 72 horas a 37°C/ 10% de CO₂. A CIM foi definida graficamente como a menor concentração de amostras que induziu um acentuado declínio na absorbância (90% de inibição).

A CBM foi determinada pela menor concentração de amostras capazes de inibir a formação de colônias em placas de Ágar Columbia contendo 5% de sangue de ovelha

(incubadas a 37°C/10% de CO₂ por 72 h) correspondentes aos poços de microplacas do ensaio CIM sem crescimento aparente. A amoxicilina (Sigma-Aldrich cod. A8523; St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como controle positivo para o controle anti-*H. pylori*.

Os métodos utilizados na avaliação da segurança de uso do ESvLf foram realizados conforme o fluxograma experimental apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma dos métodos utilizados na avaliação da segurança de uso do extrato seco das vagens de *L. ferrea*



4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

O estudo de toxicidade aguda foi realizado em ratas Wistar, conforme descrito pela OCDE 425 (2001), com pequenas modificações. As ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos ($n = 3/\text{grupo}$) e desprovidas de ração por 12 h com acesso livre à água. Posteriormente, o grupo controle recebeu o veículo (0,9% de solução NaCl, 10 mL/kg) e o grupo tratado recebeu dose única de ESvLf (2000 mg/kg), por via oral. 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 ração e variação da massa corporal.

4.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE DOSES REPETIDAS

A avaliação da toxicidade de doses repetidas seguiu as diretrizes da OECD 407 (2008), com pequenas modificações. Ratos Wistar, machos e fêmeas, saudáveis, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 10/\text{grupo}$, 5 machos e 5 fêmeas): grupo controle (grupo I) recebeu água, enquanto os grupos tratados (II, III e IV) receberam o ESvLf nas doses 100, 500 e 1000 mg/kg, respectivamente, por via oral (gavagem) uma vez ao dia durante 30 dias consecutivos. A dose de 100 mg/kg foi selecionada de acordo com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, uma vez que essa dose forneceu significativa proteção da mucosa gástrica nos testes antiulcerogênicos. As outras doses (500 e 1000 mg/kg) foram extrapoladas 5 e 10 vezes a dose efetiva.

Durante o tratamento, os consumos de água e ração dos animais foram registrados diariamente, enquanto a massa corporal foi verificada semanalmente. Os animais foram observados quanto aos possíveis sinais de toxicidade, como piloereção, diarreia, alterações de comportamento e da atividade locomotora. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 h, com água *ad libitum* e em seguida, anestesiados de acordo com as diretrizes de prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2015), com 2% de isoflurano (ar/O_2) por inalação. O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos de coleta com o anticoagulante ácido etileno diaminotetracético (EDTA) para as análises hematológicas, e tubos com gel separador para as determinações bioquímicas.

4.8.1 Análises Hematológica e Bioquímica

Imediatamente após a coleta, as análises hematológicas foram realizadas por meio do analisador hematológico automático (ABX Micros ESV60, Horiba Instruments Medical, São Paulo, Brasil). Foram determinados os seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos, plaquetas, volume plaquetário médio (VPM). A contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos) foi realizada com o corante May-Grunwald-Giemsa (Laborclin Produtos para Laboratórios, Pinhais, PR, Brasil), em cada caso, 100 células foram contadas.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos, o sangue coletado foi centrifugado a 1480 x g por 10 min para obtenção do soro, que foi armazenado a -20 °C. Foram determinados os seguintes parâmetros: glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, gama-glutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), lactato desidrogenase (LDH), proteínas totais, bilirrubina total, bilirrubina direta. As amostras foram analisadas usando o analisador bioquímico automático SX-140 (Sinnova, Nanjing, China) e os kits bioquímicos da Vida Biotecnologia (Belo Horizonte, MG, Brasil) (COSTA-SILVA *et al.*, 2008).

4.8.2 Atividade antioxidante *in vivo*

Para a avaliação do estresse oxidativo, foram mensuradas a peroxidação lipídica e os níveis de glutathione reduzida em amostras dos tecidos hepático e renal dos animais. Estas análises seguiram os métodos descritos anteriormente na avaliação do estresse oxidativo na mucosa gástrica (Figuras 7 e 8).

4.8.3 Análise Morfológica

Após a coleta de sangue, todos os animais foram eutanasiados por incisão cardíaca para a remoção e análise macroscópica do coração, pulmão, fígado, rins, adrenais, baço, estômago, duodeno, pâncreas e cérebro. Os órgãos reprodutores masculino (testículos e próstata) e feminino (útero e ovários) também foram avaliados. A massa dos órgãos foi expressa em termos de massa absoluta (g) e massa relativa (g/100 g de massa corporal) (CALDAS *et al.*, 2016).

Para proceder a análise histológica, o rim e o fígado dos animais, foram fixados em 10% de formalina tamponada por 48 horas à temperatura ambiente e, coradas com

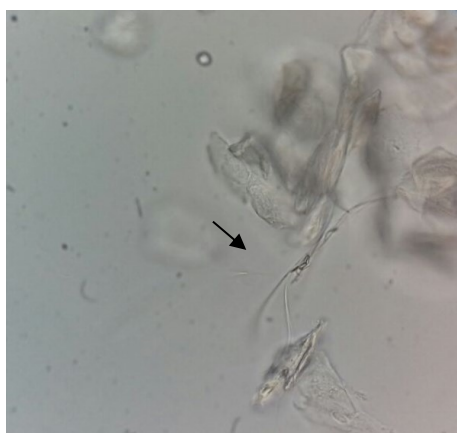
hematoxilina/eosina (H & E). O sistema de microscopia automatizada MICRODIP (Kacil Inc.) foi usado nas análises.

4.9 TOXICIDADE REPRODUTIVA

4.9.1 Período de acasalamento

Durante a fase escura do ciclo ambiental, fêmeas nulíparas foram colocadas em contato com machos adultos na proporção de 1:1. No dia seguinte, os machos foram retirados das gaiolas e nas fêmeas foi realizado um lavado vaginal com solução de NaCl 0,9%. A visualização de espermatozoides no lavado, associada à observação da fase estro do ciclo estral (Figura 10), identificou as ratas prenhes (COOPER; GOLDMAN; VANDERBERGH, 1993). Os acasalamentos foram mantidos até a obtenção do número suficiente de progenitoras.

Figura 10 - Fotomicroscopia da citologia vaginal de ratas na fase de estro. A seta indica a presença de espermatozoides, confirmando a cópula



Fonte: Arquivo pessoal.

4.9.2 Período de prenhez

Ratas prenhes foram divididas aleatoriamente em 8 grupos (n= 7-10/grupo). Quatro grupos receberam o tratamento durante o período de pré-implantação (0 - 5º dia de prenhez) e quatro grupos foram tratados durante o período de organogênese (6º-15º dia de prenhez) (BERNARDI, 1999). Nos dois períodos de prenhez o grupo controle (grupo I) recebeu água potável (10 mL/kg), enquanto os grupos tratados (grupos II, III e IV) receberam ESvLf nas doses de 100, 500 e 1000 mg/kg, respectivamente, por via oral (gavagem) uma vez ao dia.

Durante a prenhez, as ratas foram avaliadas quanto à sobrevivência, aparência alterada e sinais clínicos de toxicidade, como alteração no consumo de água e ração, piloereção, diarreia,

mudanças na atividade locomotora, sangramento vaginal. A massa corporal materna e o consumo de água e ração foram mensurados diariamente (OECD 421, 2015).

4.9.3 Avaliação da performance reprodutiva materna

No 21º dia de prenhez, as ratas avaliadas nos dois períodos (pré-implantação e organogênese) foram anestesiadas de acordo com as diretrizes de prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2015), com 2% de isoflurano (ar/O₂) por inalação, laparotomizadas e eutanizadas por incisão cardíaca.

Foi realizada a remoção de ovários, cornos uterinos, fetos e placentas. Procedeu-se a contagem de corpos lúteos nos ovários direito e esquerdo e foram avaliadas o número de implantações e reabsorções nos cornos uterinos e a presença de fetos vivos ou mortos. Fetos, placentas, órgãos reprodutivos e outros órgãos maternos (timo, coração, pulmões, fígado, pâncreas, baço, rins e adrenais) foram pesados e analisados quanto a presença de malformações macroscópicas. As massas dos órgãos foram expressas em termos absolutos e relativos (g e g/100 g de massa corporal, respectivamente) (OECD 421, 2015).

As taxas reprodutivas foram expressas em porcentagem (%) e calculadas as taxas de implantação (número de implantações/número de corpos lúteos x 100), a taxa de perda pré-implantação (número de corpos lúteos - número de implantações viáveis/número de corpos lúteos x 100) e a taxa de perda pós-implantação (número de implantações - número de fetos vivos/número de implantações x 100) e a taxa de reabsorção (número de reabsorções/número de implantações x 100), de acordo Costa-Silva *et al.* (2006).

4.9.4 Teratologia

4.9.4.1 Análise das anomalias e/ou malformações externas

Os fetos foram examinados externamente segundo os critérios determinados por Wilson (1965), com análise minuciosa dos olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana, membros anteriores, posteriores, perfuração anal e cauda (Figura 11).

Figura 11 - Análise das anomalias e/ou malformações externas (grupo controle)



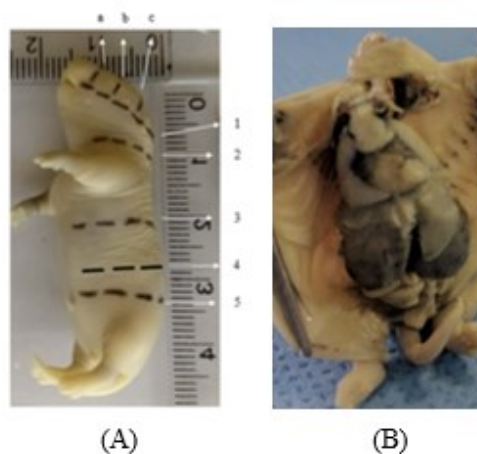
Fonte: Arquivo pessoal.

4.9.4.2 Análise das anomalias e/ou malformações internas

4.9.4.2.1 Análise visceral no período de organogênese

Logo após a análise externa, metade de cada ninhada foi fixada em solução de Boiun (50 ml de formaldeído, 50 ml de ácido acético, 752 ml de álcool etílico a 95% e 148 ml de água destilada) por uma semana para subsequente exame visceral pelo método da secção seriada de acordo com Wilson (1965). A análise visceral constituiu de uma análise detalhada das secções da cabeça, tórax e pelve (Figura 12 e Quadro 2).

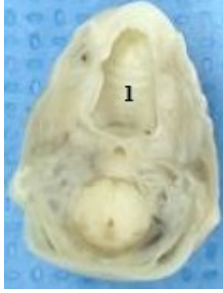
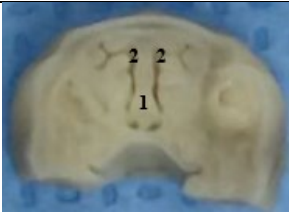
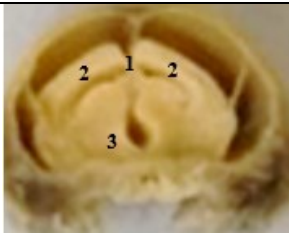
Figura 12 - Apresentação esquemática dos cortes realizados no estudo de malformações viscerais (A); Dissecção de feto (grupo controle) para visualização anatômica dos órgãos das regiões de terço médio torácico e abdominal inferior (B).



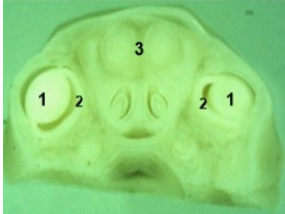
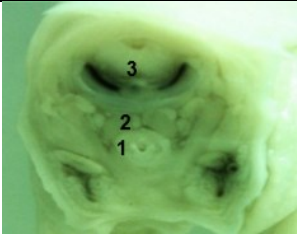
Fonte: Arquivo pessoal.

Posicionamento dos cortes frontais: a- região pré-glabeular; b- região orbital; c- região da vértex. Posicionamento dos cortes transversais: 1- altura da cavidade oral; 2- região do pescoço; 3- região do terço médio torácico; 4- região abdominal inferior; 5 - região pélvica.

Quadro 2 - Secções seriadas da região de cabeça e pescoço (Wilson, 1965).

Corte Transversal - altura da cavidade oral 1- Palato	
Corte Frontal: região pré-glâbular 1- Septo nasal 2- Coanas	
Corte Frontal: região da vértex 1- Seio venoso 2- Ventículos laterais 3- Terceiro ventrículo	

Fonte: Arquivo Pessoal.

Corte Frontal: região orbital 1- Cristalino 2- Retina 3- Bulbo Olfatório	
Corte Transversal - região do pescoço 1- Traqueia 2- Esôfago 3- Medula espinhal	

Fonte: Rodrigues, 2017.

4.9.4.2 Análise esquelética no período de organogênese

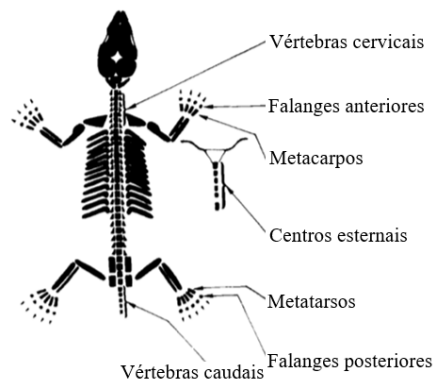
Para a investigação das alterações esqueléticas, após a análise externa, a outra metade de cada ninhada foi submetida ao processo de desidratação, diafanização e coloração com vermelho de alizarina (Figura 13), de acordo com a técnica de Staples e Schenell (1964). Os fetos foram imersos em acetona por 24h, solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 1% (p/v) por 24h e solução vermelha de alizarina (0,50 mg) em 200 ml de KOH a 1% (p/v) a cada 24h por quatro dias. A análise esquelética constitui na observação minuciosa dos pontos de ossificação (Figura 14), segundo método de Aliverti *et al.* (1979), que orienta a avaliação dos centros esternais, falanges anteriores e posteriores, metacarpos, metatarsos, vértebras cervicais e caudais.

Figura 13 - Representação de feto após as etapas de desidratação, diafanização e coloração com vermelho de alizarina, Staples e Schenell (1964).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 - Representação esquemática dos pontos de ossificação observados na análise esquelética.



Fonte: Aliverti *et al.* (1979), adaptado.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou mediana. As amostras foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para determinar ou não, a normalidade. Para testes paramétricos, as diferenças entre as médias foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. Para dados não paramétrico foram usados os testes de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. Para dados reprodutivos e malformações esqueléticas e viscerais foi utilizado o teste quiquadrado de Pearson. Nos protocolos de toxicidade aguda e na influência de compostos de óxido nítrico e sulfidrílicos na gastroproteção, o teste t de Student não pareado foi usado para testar as diferenças estatísticas entre os dois grupos. O nível de significância para rejeição da hipótese nula foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL FITOQUÍMICO

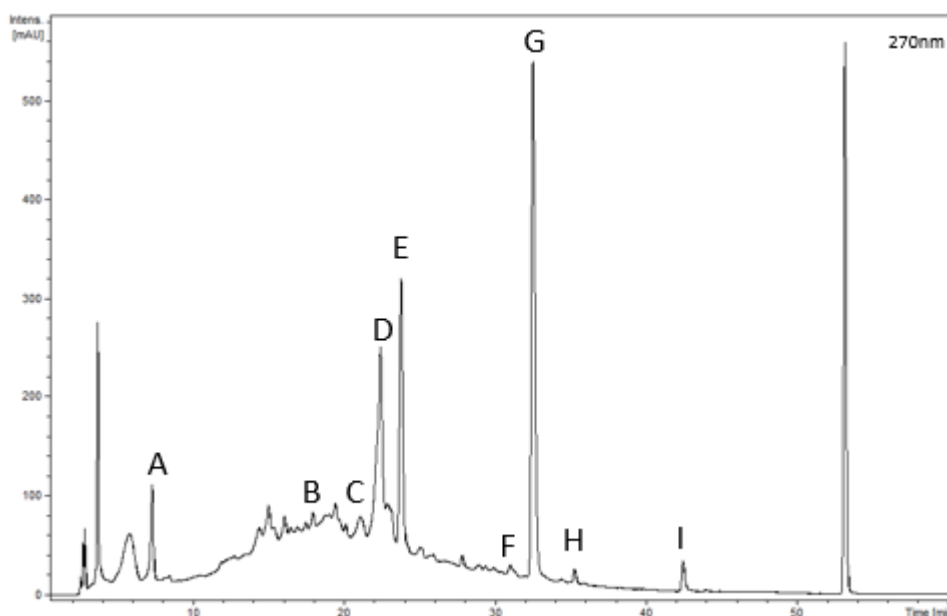
5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Por meio de prospecção fitoquímica, foi possível identificar altos níveis de flavonoides e taninos hidrolisáveis, os derivados cinâmicos foram expressos em menores quantidades. A presença de fenilpropanoides, triterpenos, esteroides, monotrpenos, sesquiterpenos, alcaloides, cumarinas, quinonas e proantocianidinas não foi observada.

5.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE- EM)

A análise cromatográfica do extrato seco das vagens de *L. ferrea* sugeriu a presença de nove compostos: (A) ácido galoil quínico (7,4 min), (B) galoil-HHDP-hex (19,8 min), (C) ácido carboxílico da brevifolina (20,2 min), (D) dilactona do ácido valoneico (22,0 min), (E) derivado de ácido gálico (23,9 min), (F) derivado de ácido elágico (ácido-hex elágico) (32,6 min), (G) ácido elágico (32,5 min), (H) derivado de ácido elágico (35,3 min) e (I) dihidroisovaltrato (42,3 min) (Figura 15).

Figura 15 - Cromatograma do extrato seco das vagens de *L. ferrea* a 270 nm



Os compostos foram identificados por similaridade entre espectros de absorção em ultravioleta (UV), razão massa/carga e perfil de fragmentação (MS^2) com os valores correspondentes na literatura (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados dos compostos detectados por HPLC-MS do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (modo negativo).

Pico (Composto)	Rt (min)	λ_{max} (nm)	LC-MS [M - H] ⁻ m/z	MS/MS ⁿ Íons	Identificação	Referência
	3,8	270	649,13	398,95/ 478,93/ 561,02 / 605,03	NI	-
A	7,4	214, 270	343,04	168,28 / 190,38	ácido galoil quínico	Wyrepkowski <i>et al.</i> , 2014
B	19,7	272	633,08	185,30 / 300,74 / 336	galoil- HHDP- hex	Fischer <i>et al.</i> , 2011
C	20,2	275	290,85	246,58	ácido carboxílico da brevifolina	Fischer <i>et al.</i> , 2011; Santos <i>et al.</i> , 2013
D	22,3	256, 364	468,98	300,79 / 424,95/ 284,65	dilactona do ácido valoneico	Wyrepkowski <i>et al.</i> , 2014
E	23,9	214, 270	196,41	168,25 / 290,80	derivado de ácido gálico	Sun <i>et al.</i> , 2007 Fischer <i>et al.</i> , 2011. Wyrepkowski <i>et al.</i> , 2014
F	31,2	-	463,09	300,83	Derivado de ácido elágico (ácido-hex elágico)	Fischer <i>et al.</i> , 2011
G	32,5	253, 367	300,82	256,63	ácido elágico	Mullen <i>et al.</i> , 2003 Wyrepkowski <i>et al.</i> , 2014
H	35,3	-	497,05	300,78 / 450,92	derivado de ácido elágico	Wyrepkowski <i>et al.</i> , 2014
I	42,3	270	423	270	dihidroisovaltrato	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
	53,2	282	445,12	297,88/ 369,99/ 265,74	NI	-

De acordo com o cromatograma UV a 270 nm, os principais constituintes do ESvLf são taninos hidrolisáveis e compostos fenólicos, uma vez que apresentam o mesmo perfil de fragmentação descrito por Mullen *et al.* (2003), Sun *et al.* (2007), Fischer *et al.* (2011), Santos *et al.* (2013), Wyrepkowski *et al.* (2014), Abu-Reidah *et al.* (2015).

Os taninos hidrolisáveis são facilmente hidrolisados *in vivo* pela ação de ácidos e/ou enzimas liberando unidades de ácido gálico e ácido elágico (CLIFFORD; SCALBERT, 2000; SOONG; BARLOW, 2006). O ácido gálico possui atividade anti-inflamatória e antioxidante e o ácido elágico tem demonstrado atividade antimutagênica e antioxidante (SOONG; BARLOW, 2006).

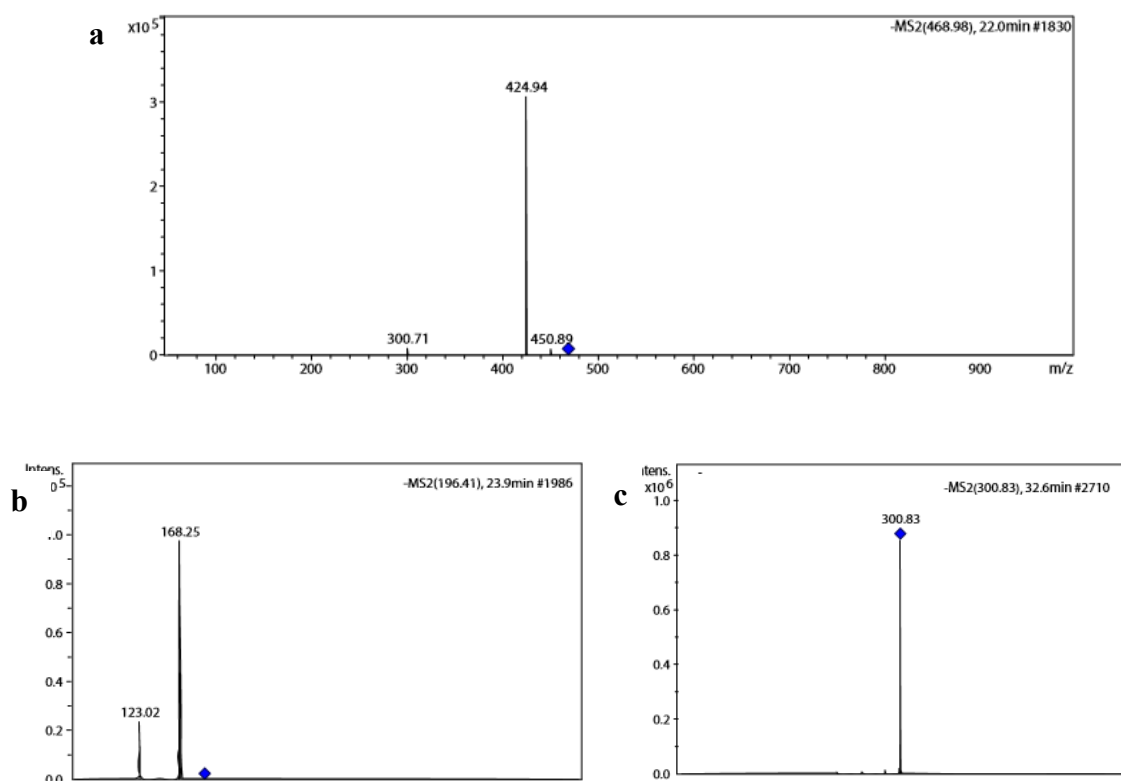
Vasconcelos *et al.* (2011), identificou taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico) como os principais compostos do extrato aquoso da casca do caule de *Caesalpinia ferrea*, e os correlacionou a redução do estresse oxidativo no tecido hepático de ratos diabéticos.

No ESvLf foi sugerida a presença do composto dilactona do ácido valoneico (DAV) (D), com m/z 468,98 e perfil de fragmentação, m/z 300,71; 424,94; e 450,89 (Figura 16a). Uma estrutura contendo o ácido elágico eterificado, por meio de acoplamento oxidativo, com o ácido gálico (SILVA *et al.*, 2007).

O íon da molécula desprotonada com m/z 196,41 (E) foi identificado no Rt de 23,9 minutos, com espectros de fragmentação m/z 168,25 e 123,02 (Figura 16b). Wyrepkowski *et al.* (2014), identificaram este composto como galato de etila, derivado do ácido gálico, na análise cromatográfica da casca do caule da *Caesalpinia ferrea*.

O composto (G), ácido elágico, observado com m/z 300,82 produziu um fragmento m/z 256,63 na fragmentação (Figura 16c), estrutura que corrobora com os resultados encontrados por Wyrepkowski *et al.* (2014) que, também detectaram o íon m/z 301, como ácido elágico, com o perfil de fragmentação m/z 257 $[M - H - CO_2]^-$, m/z 229 $[M - H - CO_2 - CO]^-$, e m/z 185 $[M - H - 2CO_2 - CO]^-$.

Figura 16 - Espectros de MS/MS obtidos dos cromatogramas, bem como a proposta dos compostos identificados.



(a) dilactona do ácido valoneico. (b) derivado de ácido gálico. (c) ácido elágico.

Brito *et al.* (2018) verificaram que o ácido gálico e o ácido elágico são protetores gástricos isolados, quando associados, estes compostos atuaram sinergicamente para proteger a mucosa em modelos pré-clínicos de lesões gástricas.

A análise fitoquímica do ESvLf permitiu a quantificação de compostos fenólicos totais e flavonóides e a avaliação da atividade antioxidante e antiulcerogênica do extrato.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO ESvLf

A quantificação dos compostos fenólicos totais no ESvLf foi de $951,39 \pm 0,01$ mg de EAG/g. O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado por um ensaio usando o Reagente Folin-Ciocalteu, onde a intensidade do complexo azul formado indica o conteúdo total de compostos fenólicos e está relacionada a um maior número de grupos de hidrogenação presentes (KAUR *et al.*, 2008).

Silva *et al.*, (2011) analisaram três espécies vegetais quanto à capacidade antioxidante e proteção ao DNA e observaram que os frutos de *L. ferrea* tinham a capacidade de eliminar os danos ao DNA produzidos pelos radicais hidroxila, e associaram essa atividade antioxidante ao alto teor de compostos fenólicos da espécie ($460,00 \pm 4,16$ mg EAG/g).

Port's *et al.*, (2013) avaliaram os compostos fenólicos de *C. icaco* (51.30 mg EAG/g), *L. speciosa* (47.54 mg EAG/g) e das folhas de *L. ferrea* (68,13 mg EAG/g) espécies vegetais da região amazônica. *L. ferrea* apresentou o maior conteúdo de polifenóis e a maior capacidade antioxidante entre as espécies estudadas.

Os compostos fenólicos exibem atividade antioxidante devido a capacidade de doar hidrogênio ou elétrons e formação de radicais intermediários estáveis que impedem a oxidação lipídica. (BRAN-WILLIAMS *et al.*, 1995; ALMEIDA *et al.*, 2017).

Os flavonoides representam um grande grupo de substâncias fenólicas de baixo peso molecular com estruturas químicas e características diversas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Eles são responsáveis por proteger as plantas da radiação ultravioleta (UV) e e fitopatógenos (FERREYRA *et al.*, 2012). Apresentam também importantes atividades biológicas, como atividade antioxidante, através da eliminação de radicais livres (FERREYRA *et al.*, 2012) e atividade gastroprotetora, com atividades anti-secretória e citoprotetora (MOTA *et al.*, 2009). O conteúdo total de flavonoides no ESvLf foi de 35,35 mg de EQ/g de extrato.

Os flavonoides são conhecidos por inibir a atividade enzimática da histidina descarboxilase (HAYES; FOREMAN, 1987) e, assim, reduzem a formação de histamina na mucosa gástrica, substância que estimula diretamente as células parietais e pepsinogênio responsável pela secreção de ácido clorídrico e pepsina, respectivamente (IZZO *et al.*, 1994).

Outra substância envolvida no dano gástrico é o fator ativador de plaquetas (FAP), um fosfolípido endógeno que causa ulceração gastrointestinal (ROSAM *et al.*, 1986) e predispõe o estômago a danos causados pelo etanol aplicado diretamente na mucosa gástrica (WALLACE; WHITTLE, 1986). A administração intraperitoneal de quercetina, rutina e kaempferol (25-100 mg/kg) inibiu o conteúdo gástrico do FAP (IZZO *et al.*, 1994).

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO ESvLf

Os antioxidantes protegem o organismo contra o dano oxidativo envolvido em várias doenças, que se acredita serem causadas ou relacionadas com o excesso de radicais livres no corpo, como o câncer, hipertensão, doenças cardíacas e diabetes (BARROS *et al.*, 2014 e SANTOS *et al.*, 2010). O estresse oxidativo tem participação na etiologia de doenças gastrointestinais. O aumento de agentes oxidantes, como o etanol, e a depuração de antioxidantes endógenos favorecem o processo de ulceração gástrica (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

Estudos indicam que não existe um método capaz de avaliar quantitativamente e com precisão as propriedades antioxidantes. Como as várias metodologias diferem em seus mecanismos de ação, elas são consideradas complementares no estudo do potencial antioxidante das plantas (REBAYA *et al.*, 2014; PRIOR *et al.*, 2005).

Neste estudo, diferentes tipos de ensaios foram utilizados para avaliar o potencial antioxidante do ESvLf. Os resultados da inibição do radical livre nos valores de IC₅₀ são apresentados na Tabela 3. A partir dos valores de IC₅₀ descritos na tabela, observa-se que tanto na redução do radical DPPH quanto na capacidade de eliminação do radical ABTS, o ESvLf apresentou maior poder antioxidante quando comparado ao padrão Trolox. Além disso, também apresentou atividade antioxidante total (AAT) e atividade antioxidante aos radicais superóxido (AARS).

Tabela 3 - Atividade antioxidante IC₅₀ *in vitro* (µg/mL) do extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) e padrões antioxidantes

Amostra	DPPH ⁺	ABTS ⁺	AAT	AARS
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
ESvLf	28,96	145,10	633,60	119,64
Trolox	53,20	199,27	NT	NT
Ácido ascórbico	NT	NT	500.00	NT

Radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo; Radical ABTS – 2'-2-azino-bis (3-etilbenztiazolina-6-sulfonato); AAT - Atividade antioxidante total; AARS - atividade antioxidante aos radicais superóxido; NT - não testado.

No estudo de Port's *et al.* (2013), as folhas de *L. ferrea* apresentaram capacidade de redução do radical DPPH, apresentando um valor de IC₅₀ de 46,70 µg/mL. Hassan *et al.* (2015) encontraram uma atividade de eliminação notável do radical DPPH pelo extrato etanólico de *C. ferrea*, em comparação com o ácido ascórbico. A capacidade antioxidante do extrato (IC₅₀) foi determinada em (12,45 ± 2,86 µg/mL).

5.3.1 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total (% AAT) do ESvLf em diferentes concentrações (31,25 - 1000 µg/mL) foi de 0,18 ± 0,04 - 76,10 ± 1,63%. Da mesma forma, Silva *et al.* (2011) encontraram que a atividade antioxidante total (% AAT) do extrato hidroalcoólico de frutos de *L. ferrea* foi de 38,06 ± 2,04% em relação à atividade do ácido ascórbico padrão.

5.3.2 Atividade de eliminação de radicais superóxido (O₂⁻)

O extrato de *L. ferrea* foi capaz de eliminar o radical superóxido formado, apresentando IC₅₀ = 119,64 µg/mL. Essa atividade é importante para evitar os danos gerados pelo estresse oxidativo. Silva *et al.* (2011) mostraram uma correlação significativa e linear entre o conteúdo fenólico de frutos de *L. ferrea* e os ensaios de atividade de eliminação de P-Mo e O₂, com IC₅₀ = 16,66 ± 2,91 µg/mL pelo método de Shukla *et al.* (2009) indicando assim que os compostos fenólicos são os principais contribuintes para a atividade antioxidante das espécies.

Os dados obtidos indicam que o ESvLf apresenta potencial medicinal e pode ser utilizado na prevenção de diversas doenças associadas ao estresse oxidativo, por meio de sua atividade antioxidante.

5.4 ESTUDOS *IN VIVO*

5.4.1 Avaliação da Atividade Gastroprotetora

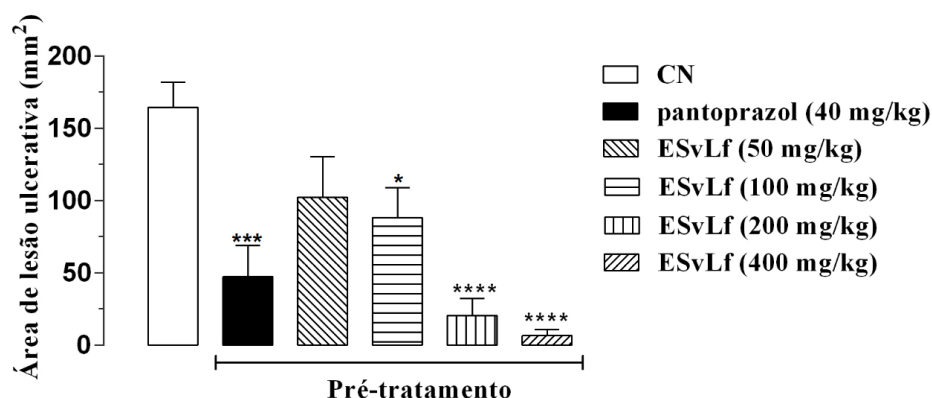
A atividade gastroprotetora do ESvLf foi avaliada por meio de modelos experimentais de úlceras induzidas por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina (AINE). Esses modelos são bem descritos na literatura (ALMASAUDI *et al.*, 2016) e as lesões ocorrem predominantemente na porção glandular do estômago (RUJJANAWATE *et al.*, 2005). As espécies reativas de oxigênio contribuem para a patogênese dessas lesões, principalmente

quando causadas pelo etanol (REPETTO; LLESUY, 2002; KWIECIEŃ; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002).

5.4.1.1 Úlcera induzida por etanol

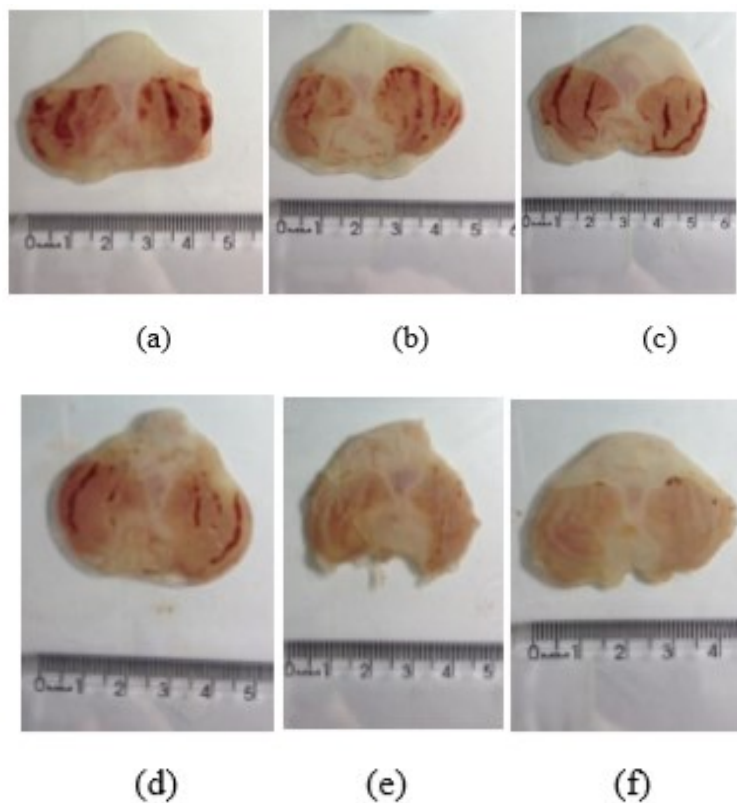
A administração do ESvLf inibiu significativamente a formação de lesões induzidas por etanol absoluto (Figuras 17 e 18) em 46,36; 87,56 e 95,99% em animais pré-tratados com o extrato nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente, quando comparados com o grupo controle negativo (CN, $164,50 \pm 17,38 \text{ mm}^2$). O valor da ED_{50} foi de 113,7 mg/kg. Os ratos tratados com pantoprazol apresentaram gastroproteção de 71,20% da área lesada.

Figura 17 - Efeito gastroprotetor do extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar.



Os animais receberam, por via oral, solução de NaCl a 0,9% (controle negativo, CN), pantoprazol (40 mg/kg) ou ESvLf (50, 100, 200 e 400 mg/kg). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. (5-7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle negativo, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Figura 18 - Fotografias típicas do efeito gastroprotetor do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar. Painel superior: (a) controle negativo, (b) pantoprazol (40 mg/kg), (c) ESvLf (50 mg/kg) e painel inferior: ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente, d, e, f).



A administração oral de etanol causa lesões hemorrágicas na mucosa gástrica, edema submucoso extenso, infiltração de células inflamatórias e perda de células epiteliais (FRANKE; TEYSSEN; SINGER, 2005). O dano à mucosa gástrica causado pelo etanol prejudica a microcirculação, danificando o endotélio dos vasos capilares e causando estase microvascular com redução do oxigênio tecidual (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2013). Esse agente ulcerogênico ainda inibe a produção de prostaglandinas, diminui a produção de muco (LACERDA NETO *et al.*, 2017) e induz a formação de radicais livres, aumentando a peroxidação lipídica na mucosa (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001).

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na patogênese da úlcera gástrica, quando essas lesões são causadas pelo etanol, há um aumento de ânions superóxido, radicais hidroxila e peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzindo estresse oxidativo intracelular

(REPETTO; LLESUY, 2002; KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002; BAGCHI *et al.*, 1998).

O pré-tratamento com ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg por via oral) e pantoprazol (40 mg/kg) diminuiu os níveis de peroxidação lipídica em 44,19; 36,05; 44,19 e 43,03%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo (CN, $0,86 \pm 0,12$) (Tabela 3). A análise cromatográfica do ESvLf sugere a presença de compostos com atividade antioxidante, promissores no tratamento de úlceras gástricas.

O malondialdeído (MDA) é um marcador de dano oxidativo em sistemas fisiológicos (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005) resultante da oxidação lipídica que ocorre através de um mecanismo em cadeia de radicais livres (FERNÁNDEZ; PÉREZ-ÁLVAREZ; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 1997). Caldas *et al.* (2011) e Brito *et al.* (2018) mostraram que, comparados aos níveis observados em animais não lesionados, os animais submetidos a danos induzidos por etanol exibiram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), bem como uma redução nos níveis de compostos sulfidrílicos não protéico (-SH).

As concentrações de GSH são fisiologicamente elevadas no tecido gástrico, talvez conferindo alguma proteção adicional contra os efeitos do ácido gástrico (MATTHEWS; BUTLER, 2005). A administração oral do ESvLf nas doses de 100 e 200 mg/kg aumentou significativamente a reserva antioxidante endógena (glutathiona reduzida, GSH) em $754,90 \pm 72,48$ (60,62%) e $766,60 \pm 69,39$ (63,11%) nmol de proteína GSH/mg, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($470,00 \pm 23,75$) (Tabela 4).

Rozza *et al.* (2015) observaram que o grupo pré-tratado com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Bauhinia holophylla* aumentou os níveis de GSH em 65,5% no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. Análises como esta são importantes no entendimento da fisiopatologia das úlceras gástricas, uma vez que os fatores etiológicos desta doença estão intimamente associados ao estresse oxidativo e à depleção dos níveis de glutathiona na mucosa gástrica (JOZEFCZAK *et al.*, 2012). Em nosso estudo, a administração do ESvLf antes do agente ulcerogênico, etanol, também aumentou a concentração de compostos sulfidrílicos na mucosa e sugere uma atividade antioxidante da *L. ferrea* que evita os efeitos oxidativos do etanol e contribui para sua atividade gastroprotetora.

Tabela 4 - Efeito do pré-tratamento oral com extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre indicadores do estresse oxidativo nas lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar

Pré-tratamento	LPO (nmol de MDA/mg proteína)	Grupos SH (nmol/mg proteína)
Controle Negativo (CN)	0,86 ± 0,12	470,00 ± 23,75
Pantoprazol (40mg/kg)	0,49 ± 0,06*	861,70 ± 44,80****
ESvLf (100 mg/kg)	0,48 ± 0,07**	754,91 ± 72,48**
ESvLf (200 mg/kg)	0,55 ± 0,04*	766,60 ± 69,39**
ESvLf (400 mg/kg)	0,48 ± 0,08*	409,70 ± 23,04

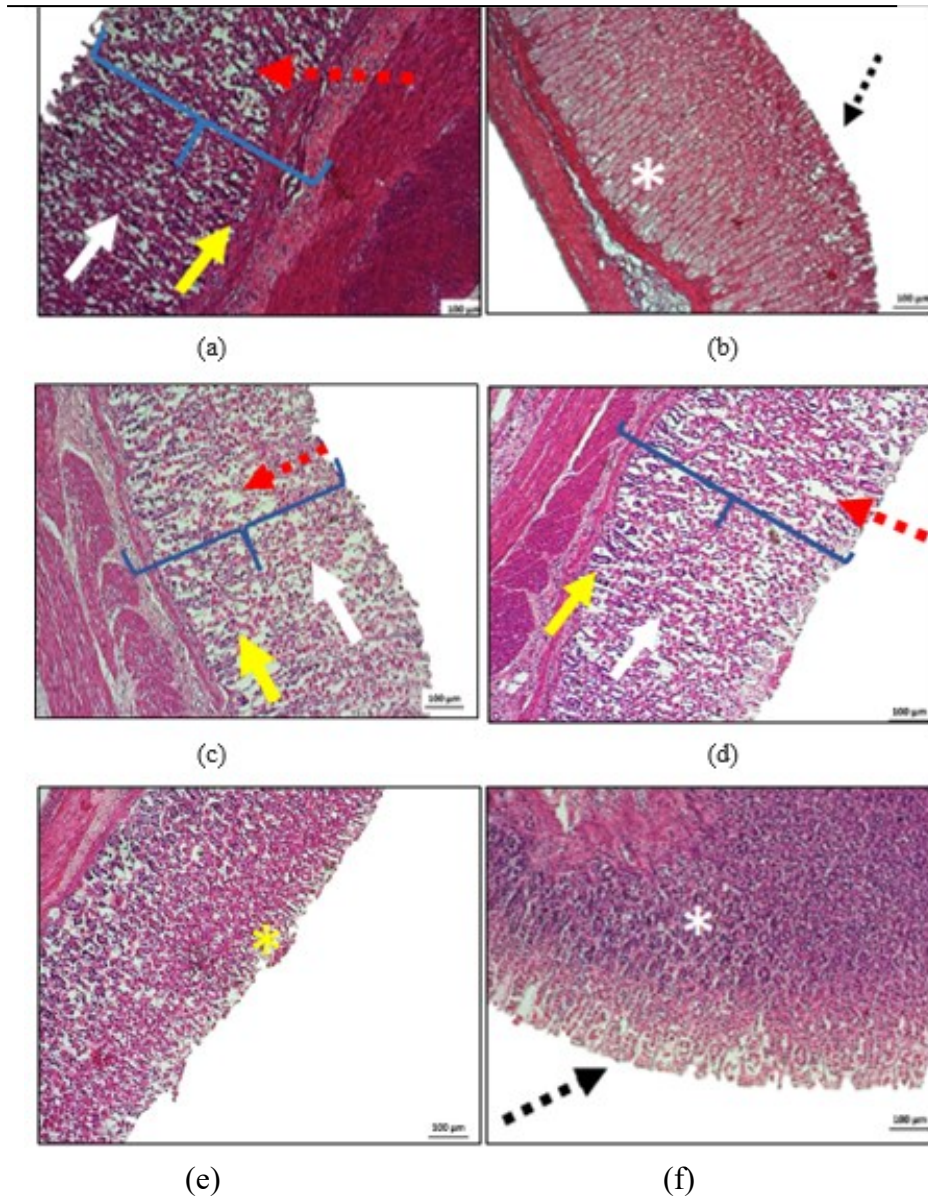
LPO: peroxidação lipídica; Grupos SH: grupos sulfidril não proteicos. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6-7/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle negativo, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

5.4.1.2 Análise Histológica

Na análise histopatológica dos estômagos do grupo controle negativo, foi possível observar uma desorganização do epitélio colunar simples, congestão capilar sanguínea, edema e necrose da mucosa gástrica (Figura 19a). O grupo pantoprazol apresentou mucosa e glândulas gástricas preservadas (Figura 19b).

No grupo ESvLf (50 e 100 mg/kg), foi possível verificar uma desorganização do epitélio colunar simples, congestão capilar sanguínea, edema e necrose da mucosa gástrica (Figuras 19c e 19d). O grupo ESvLf (200 mg/kg) apresentou mucosa gástrica não preservada, esfoliação do epitélio colunar simples e edema. Não foram observados congestão de capilares sanguíneos e necrose (Figura 19e). ESvLf (400 mg/kg) manteve o muco e as glândulas gástricas preservadas (Figura 19f).

Figura 19 - Histopatologia da mucosa gástrica de ratos dos grupos experimentais pré-tratados com NaCl 0,9% (controle negativo, a), pantoprazol (40 mg/kg, b) e extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf 50, 100, 200 e 400 mg/kg, c, d, e, f, respectivamente) no modelo de úlcera induzida por etanol.

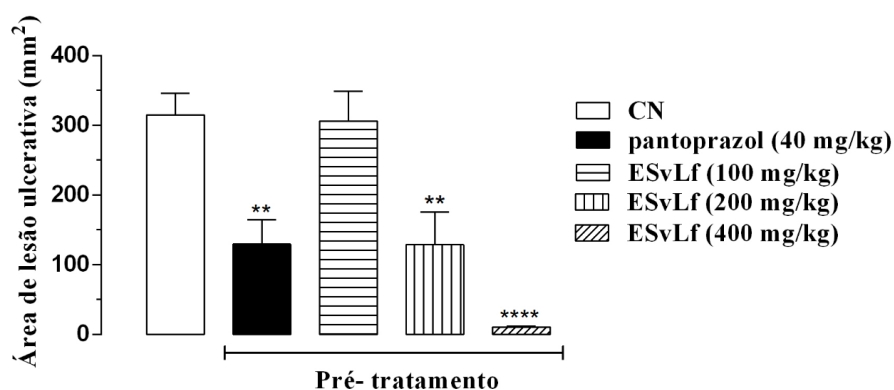


Setas brancas indicam desorganização do epitélio colunar simples nas cavidades gástricas. As setas amarelas indicam congestão de capilares sanguíneos. ({} indicam necrose da mucosa gástrica. Asteriscos brancos (*) indicam glândulas gástricas bem preservadas. O asterisco amarelo (*) indica mucosa gástrica não preservada com esfoliação do epitélio colunar simples. Setas pretas pontilhadas indicam mucosa gástrica preservada e setas vermelhas pontilhadas indicam edema.

5.4.1.3 Úlcera induzida por etanol acidificado (Etanol/HCl)

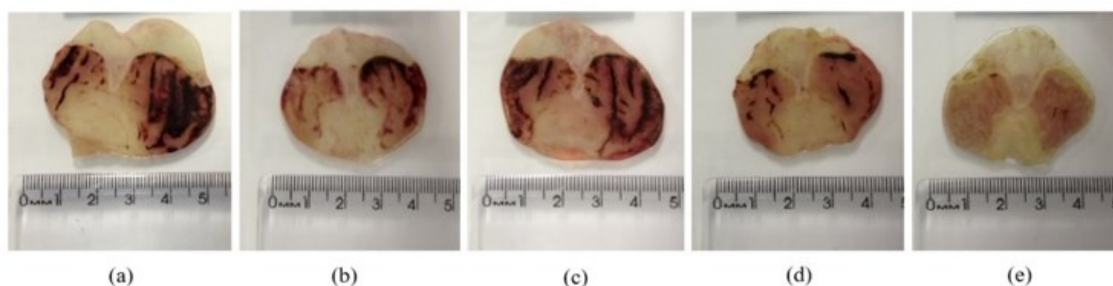
O extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) promoveu proteção significativa (200 e 400 mg/kg) contra úlcera induzida por etanol acidificado (Etanol/HCl) (Figuras 20 e 21). Os resultados mostraram que os animais pré-tratados nas doses mencionadas apresentaram inibição das lesões de 59,12 e 96,61%, respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo (CN, $314,80 \pm 31,23 \text{ mm}^2$). O valor da ED₅₀ foi de 185,7 mg/kg. Da mesma forma, os animais tratados com pantoprazol tiveram uma redução de 58,93% na área lesada.

Figura 20 - Efeito gastroprotetor do extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por etanol/HCl em ratos Wistar



Os animais receberam, por via oral, NaCl 0,9% (controle negativo, CN), pantoprazol (40 mg/kg) ou ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (6-7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle negativo, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

Figura 21 - Fotografias típicas do efeito gastroprotetor do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por etanol/HCl em ratos Wistar. (a) controle negativo, (b) pantoprazol (40 mg/kg), (c, d, e), ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente)



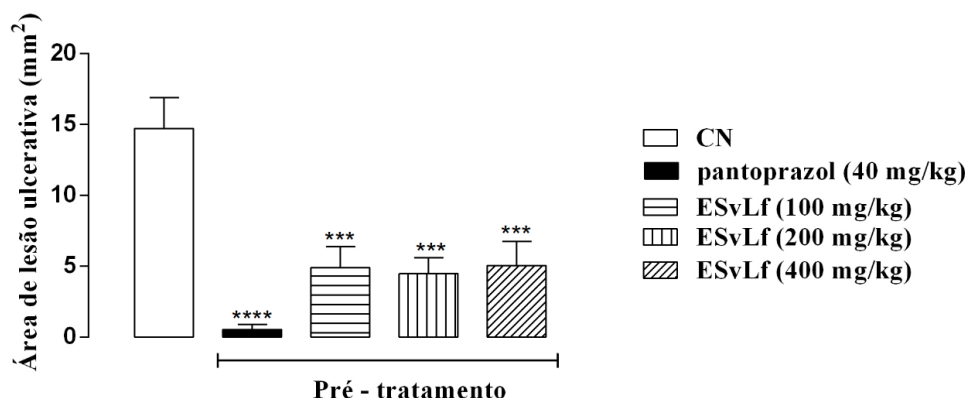
O ácido clorídrico (HCl) causa estase no fluxo sanguíneo e deprime os mecanismos de defesa da mucosa gástrica, aumentando a ação do etanol (ANDREO *et al.*, 2006). Considerado

um dos agentes mais intensos na indução de lesões gástricas, o etanol promove sérios distúrbios à mucosa gástrica devido sua ação direta (SZABO *et al.*, 1985; HIRUMA-LIMA *et al.* 2009). A administração oral do ESvLf (200 e 400 mg/kg) reduziu as lesões gástricas induzidas por etanol/HCl, indicando que *L. ferrea* possui ação gastroprotetora.

5.4.1.4 Úlcera induzida por indometacina

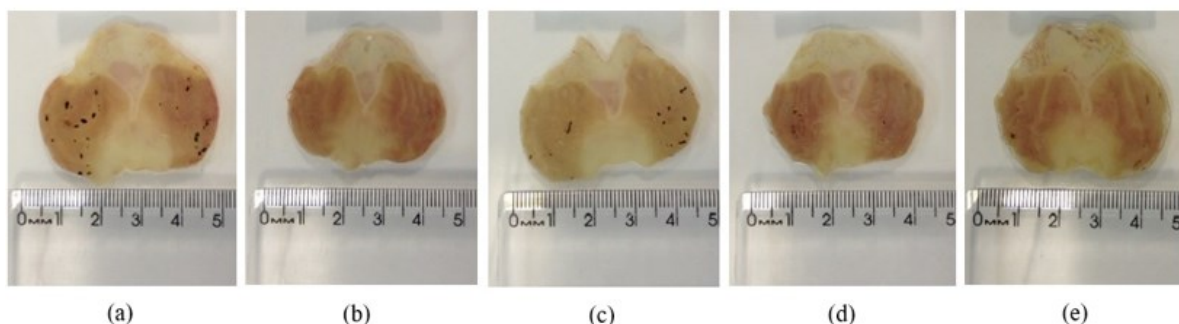
As lesões gástricas induzidas por indometacina (30 mg/kg), um anti-inflamatório não esteróide (AINE), foram significativamente inibidas pelo ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg) em 66,72; 69,64 e 65,77%, respectivamente, em comparação com as lesões gástricas $14,72 \pm 2,18$ mm² de animais do grupo controle negativo. Os animais que receberam pantoprazol apresentaram inibição da área lesionada de 96,40% (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Efeito gastroprotetor do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre lesões gástricas induzidas por indometacina (30 mg/kg, s.c.) em ratos Wistar



Os animais receberam, por via oral, NaCl 0,9% (controle negativo, CN), pantoprazol (40 mg/kg) ou ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. (6-7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle negativo, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Figura 23 - Fotografias típicas do efeito gastroprotetor do extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) em lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos Wistar. (a) controle negativo, (b) pantoprazol (40 mg / kg), (c, d, e) ESvLf (100, 200 e 400 mg / kg, respectivamente)



Os danos gástricos induzidos por AINEs dependem em parte de sua capacidade de reduzir a produção de prostaglandinas por inibição da cicloxigenase (COX) e também por mecanismos independentes da COX (WALLACE, 2008). Os efeitos combinados desses dois mecanismos levam a danos oxidativos acentuados no tecido, o que contribui significativamente para as lesões da mucosa gástrica (HIRAISHI; SHIMADA; TERANO, 2000).

No estômago, as prostaglandinas desempenham um papel citoprotetor importante porque estimulam a secreção de bicarbonato e muco, e mantêm o fluxo sanguíneo para a mucosa (WALLACE, 2008). Taninos hidrolisáveis e derivados, como o ácido gálico, presentes no ESvLf, têm atividade anti-inflamatória, inibindo preferencialmente a COX-2 (LEE, S-J.; LEE, I-S.; MAR, 2003).

O pré-tratamento oral com ESvLf (100, 200 e 400 mg/kg) reduziu as lesões gástricas causadas pela indometacina, sugerindo possível envolvimento de prostaglandinas e/ou muco na atividade antiulcerogênica do extrato.

No entanto, outros mecanismos podem contribuir para o efeito gastroprotetor do ESvLf. Pereira *et al.* (2012) relataram atividade anti-inflamatória significativa de frações de polissacarídeos das vagens de *L. ferrea* no edema induzido por carragenina via modulação da histamina, serotonina, bradicinina e PGE₂.

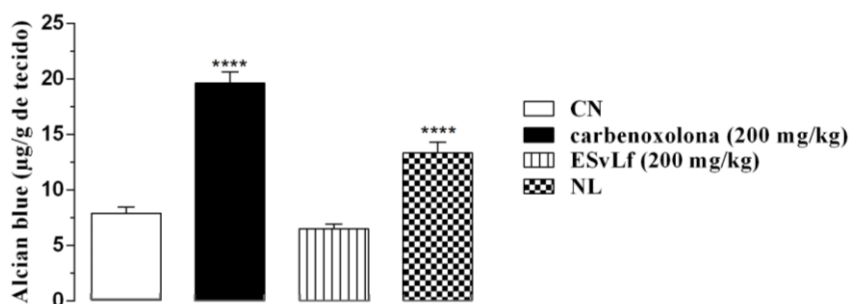
5.4.2 Fatores de Proteção da Mucosa Gástrica

Nossos resultados mostraram que os valores de ED₅₀ foram 113 e 185,7 mg/kg, respectivamente, nos experimentos de gastroproteção (úlceras induzidas por etanol e etanol/HCl). No entanto, na análise histológica do teste de úlcera induzida por etanol, descobrimos que os parâmetros histológicos da dose de 100 mg/kg (desorganização do epitélio colunar simples nas cavidades gástricas, congestão dos capilares sanguíneos, necrose da mucosa e edema) foram semelhantes ao controle negativo, o que nos levou a selecionar a dose intermediária de 200 mg/kg para avaliar o possível mecanismo de ação. De fato, Adinortey *et al.* (2013) relataram que o modelo de úlcera induzida por etanol não é apropriado para a avaliação da utilidade de medicamentos antissecretores devido à ausência de secreção gástrica nesse modelo.

5.4.2.1 Efeito do ESvLf na produção de muco gástrico

A ligadura do piloro em ratos do grupo controle negativo resultou em redução significativa dos níveis de muco gástrico (CN, $7,88 \pm 0,55$ µg de Alcian blue/g de tecido) em comparação com o grupo não lesionado (NL, $13,35 \pm 0,95$ µg de Alcian blue/g de tecido). Os ratos tratados com ESvLf (200 mg/kg) não apresentaram aumento nos níveis de muco ($6,52 \pm 0,38$ g de Alcian blue/g de tecido) em comparação ao grupo controle negativo. No entanto, a carbenoxolona (200 mg/kg) promoveu aumento significativo nos níveis de muco de 148,92% em relação ao grupo controle negativo (Figura 24).

Figura 24 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) na quantificação de muco. O grupo controle negativo (CN) recebeu NaCl 0,9%; o grupo controle positivo recebeu carbenoxolona (200 mg/kg) e o grupo ESvLf (200 mg/kg). O grupo não lesionado (NL) não recebeu tratamento



Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. (6-8 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle negativo, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; **** $p < 0,0001$.

A carbenoxolona mantém o conteúdo de prostaglandina da mucosa gástrica em altos níveis devido à sua ação inibitória frente as enzimas catabólicas, 15-hidroxi-prostaglandina desidrogenase e D13-prostaglandina-redutase, além de aumentar os níveis de AMP por inibição de fosfodiesterases da mucosa. A carbenoxolona é um agente citoprotetor porque altos níveis de prostaglandinas promovem a defesa da mucosa contra a ulceração (LEWIS; HANSON, 1991). Neste estudo, a carbenoxolona aumentou a concentração de Alcian blue; no entanto, esse efeito não foi observado no ESvLf. Assim, o efeito gastroprotetor do extrato parece ser independente da participação do muco.

Beserra *et al.* (2011) verificaram que o ácido elágico (AE) isoladamente não teve efeito significativo na produção de muco nos estômagos de animais submetidos à ulceração. Esses dados sugerem que a produção de muco não está envolvida na atividade gastroprotetora do AE. As propriedades gastroprotetoras do AE foram parcialmente atribuídas à ação inibitória na bomba de prótons (H^+ , K^+ -ATPase) (MURAKAMI *et al.*, 1991) e às propriedades antioxidantes *in vivo* (IINO *et al.*, 2002). A análise cromatográfica do ESvLf mostrou a presença de ácido elágico e seus derivados em sua composição. Isso pode explicar o não envolvimento do ESvLf na produção de muco.

5.4.2.2 Efeito do ESvLf na secreção ácida gástrica

Após 4 h de ligadura do piloro, observou-se que a administração intraduodenal do ESvLf (200 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) reduziu a secreção gástrica em 52,71 e 45,95%, respectivamente, e a acidez total em 29,85 e 54,96%, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 -Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) nos parâmetros de secreção gástrica em ratos Wistar submetidos à ligadura do piloro.

Tratamento	pH	$[H^+]$ (mEq/mL/4 h)	Conteúdo gástrico (g)
Não-lesionado	4,38 ± 0,51*	10,78 ± 1,04**	0,21 ± 0,02****
Controle Negativo	3,24 ± 0,10	18,63 ± 1,65	0,74 ± 0,08
Ranitidina (60 mg/kg)	3,83 ± 0,14	8,39 ± 0,89****	0,40 ± 0,07**
ESvLf (200 mg/kg)	3,39 ± 0,09	13,07 ± 0,80*	0,35 ± 0,05**

Os valores representam a média ± E.P.M. (5-7 animais/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle negativo, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

A ligadura do piloro promove reflexos vagovagais, aumentando a secreção gástrica através da estimulação de mecanorreceptores presentes na mucosa gástrica (MUTHURAMAN; SOOD, 2010). O extrato de *L. ferrea* diminuiu a secreção ácida e a concentração de H^+ no conteúdo gástrico. A formação e liberação endógenas de histamina pelos mastócitos está relacionada à patogênese das úlceras gástricas produzidas pela ligadura do piloro, sugerindo que os fármacos anti-histamínicos (H_2) podem ser úteis na prevenção de lesões (PARMAR; GHOSH, 1981).

Os resultados sugeriram que um dos mecanismos do ESvLf se relaciona à atividade antissecretora e confirmou o efeito sistêmico do extrato no tratamento de úlceras gástricas, tendo em vista a efetividade do tratamento quando o extrato foi administrado por via intraduodenal.

5.4.2.3 Envolvimento do óxido nítrico (NO) e compostos sulfidrílicos (-SH) na gastroproteção

N^o-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e a N-etilmaleimida (NEM) exacerbaram as lesões gástricas induzidas pelo etanol em 44,02 e 92,73%, respectivamente, em relação aos efeitos nos grupos pré-tratados com solução de NaCl. O ESvLf (200 mg/kg) apresentou efeito gastroprotetor na presença de L-NAME (70 mg/kg, i.p.), reduzindo as lesões em 95,58% em comparação ao grupo controle bloqueado ($196,30 \pm 28,11 \text{ mm}^2$). Esse resultado sugeriu que o efeito gastroprotetor do ESvLf não depende da presença de óxido nítrico (NO). No entanto, na presença de NEM (10 mg/kg, i.p.), o efeito gastroprotetor do ESvLf não foi evidente ($399,80 \pm 50,35 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo controle negativo (CN, $389,90 \pm 38,15 \text{ mm}^2$). A depleção de compostos sulfidrílicos pelo pré-tratamento com NEM foi capaz de eliminar o efeito gastroprotetor do ESvLf contra agentes ulcerogênicos. Isso indica que o efeito gastroprotetor do ESvLf depende inteiramente da presença de compostos sulfidrílicos (-SH) (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito da administração oral do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) nas lesões gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar pré-tratados com N^o-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 70 mg/kg) ou N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg)

	Tratamento	Dose	Área da lesão	Inibição
Pré-tratamento	(v.o.)	(mg/kg)	(mm ²)	(%)
	CN	-	136,30 ± 16,74	-
NaCl 0,9% (i.p.)	carbenoxolona	100	39,39 ± 8,64*	71,11
	ESvLf	200	15,49 ± 6,69**	88,64
	CN	-	196,30 ± 28,11	-
L-NAME (i.p.)	carbenoxolona	100	116,30 ± 25,24	40,76
	ESvLf	200	8,66 ± 3,33****	95,59
	CN	-	202,30 ± 32,37	-
NaCl 0,9% (i.p.)	carbenoxolona	100	29,56 ± 5,88***	85,39
	ESvLf	200	8,04 ± 4,84***	96,03
	CN	-	389,90 ± 38,15	-
NEM (i.p.)	carbenoxolona	100	32,26 ± 10,17****	91,73
	ESvLf	200	399,80 ± 50,35	-

Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6-8 animais/grupo). CN: grupo controle negativo. Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle negativo, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Neste estudo, os dados demonstraram que a exposição gástrica ao etanol associada à depleção de compostos sulfidrílicos promovidos pelo NEM inibidor dos compostos sulfidrílicos (-SH) e a inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) pelo L-NAME reduziram a gastroproteção.

O óxido nítrico é considerado um dos mais importantes agentes de defesa da mucosa gástrica devido ao aumento do fluxo sanguíneo tecidual (ALMEIDA *et al.*, 2017). O ESvLf apresentou compostos envolvidos na gastroproteção, atuando independentemente da presença de óxido nítrico, mas dependendo da presença de grupamentos sulfidrílicos responsáveis pelo aumento da produção de muco, manutenção da integridade gástrica e redução da produção de radicais livres (CHANDRANATH; BASTAKI; SINGH, 2002).

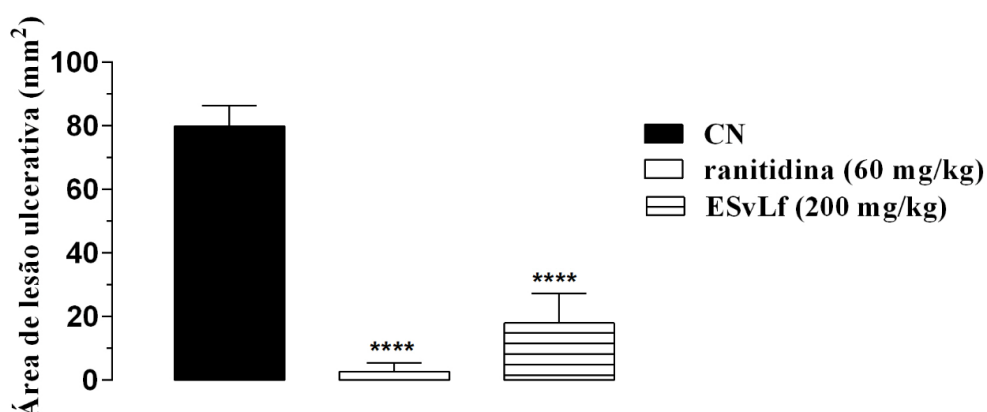
5.4.3 Avaliação das propriedades cicatrizantes do ESvLf

5.4.3.1 Úlcera gástrica induzida por ácido acético

Nossos resultados mostraram que o tratamento com o ESvLf (200 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) por 14 dias consecutivos reduziu a área de úlceras crônicas em 77,44 e 96,59% em comparação ao grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (controle), na qual a área lesada

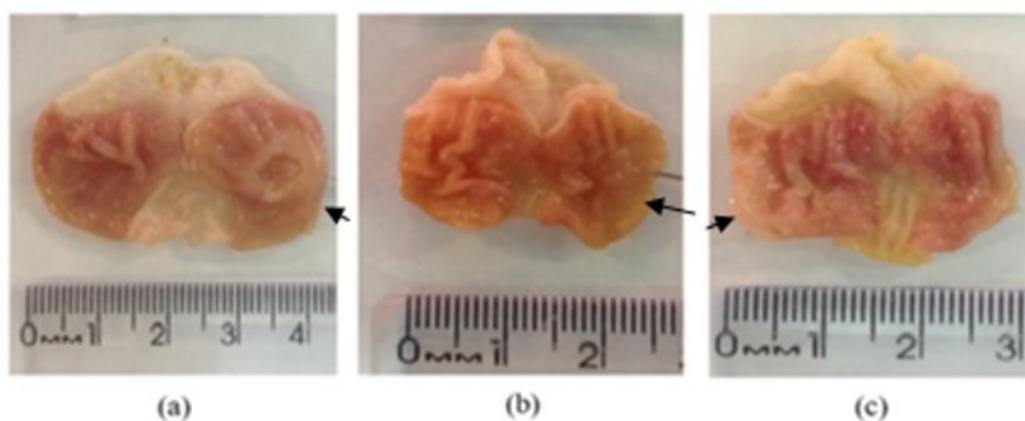
correspondeu a $79,92 \pm 6,53 \text{ mm}^2$ (Figuras 25 e 26). Foi possível observar que o ESvLf apresentou atividade cicatrizante das úlceras gástricas induzidas pelo ácido acético. O grupo operado falso, constituído por animais nos quais a úlcera não foi induzida, não apresentou lesão, como esperado.

Figura 25 - Efeito do extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) na cicatrização da mucosa gástrica em ratos Wistar. Os animais receberam, por via oral, NaCl 0,9% (controle negativo, CN), ranitidina (60 mg/kg) ou ESvLf (200 mg/kg)



Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n = 6-8/\text{grupo}$). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle negativo, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; **** $p < 0,0001$.

Figura 26 - Fotografias típicas do efeito cicatrizante do extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) na úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos Wistar. (a) grupo controle negativo, (b) ranitidina (60 mg/kg), (c) ESvLf (200 mg/kg)



A administração do ESvLf (200 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) por 14 dias consecutivos não causou sinais visíveis de toxicidade (diarreia, piloereção ou alterações na atividade

locomotora). Foi observada uma redução de 6,89 e 7,17% na ingestão de ração nos animais tratados com ESvLf e ranitidina durante os 14 dias (Tabela 7).

Mangan *et al.* (1988) relataram o caráter adstringente dos taninos quando adicionados aos alimentos e bebidas. No entanto, estudos indicam que o principal efeito dos taninos não está associado com a inibição no consumo de alimentos, mas, com a diminuição da conversão intestinal e absorção de nutrientes (CHUNG *et al.*, 1998).

A administração oral de anti-histamínicos (H_2) como a ranitidina atrasa o esvaziamento gástrico e causa sintomas dispépticos como saciedade precoce, náusea e edema abdominal (PARKMAN, 1998). Esse fato pode explicar a redução do consumo de ração dos animais tratados com ranitidina (60 mg/kg) por 14 dias consecutivos neste estudo.

Os animais tratados com ESvLf também tiveram um consumo de água reduzido em 11,16% em comparação com o grupo controle (Tabela 7). A massa corporal dos animais tratados com ESvLf ou ranitidina foi semelhante à massa dos animais controle.

Tabela 7 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) na ingestão de ração e água, e na massa corporal de ratos Wistar após 14 dias de tratamento no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Parâmetros	Controle (NaCl 0,9%)	Ranitidina (60 mg/kg)	ESvLf (200 mg/kg)
Consumo de ração (g)	287,60 ± 1,27	267,00 ± 4,75**	267,80 ± 3,35**
Consumo de água (mL)	512,60 ± 10,07	480,90 ± 16,48	455,40 ± 3,70**
Massa corporal inicial (g)	280,00 ± 4,53	275,70 ± 14,21	312,50 ± 9,69
Massa corporal final (g)	312,70 ± 3,78	302,00 ± 16,69	329,50 ± 10,03

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 6-8/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; ** $p < 0,01$.

A administração do ESvLf (200 mg/kg) por 14 dias consecutivos resultou em redução de 5,08% ($16,44 \pm 0,24$) de hemoglobina corpuscular média (HCM) em comparação com o grupo controle ($17,32 \pm 0,18$). De fato, um estudo realizado em nosso laboratório com administração prolongada por 30 dias consecutivos do ESvLf (100 e 500 mg/kg) mostrou uma redução de 7,68 e 7,30%, respectivamente, nos níveis de HCM dos ratos, em comparação ao grupo controle (dados não publicados). Alterações hematológicas podem sugerir estresse químico resultante de reações metabólicas causadas por substâncias tóxicas (SINGH; BHAT; SHARMA, 2011) Os demais parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados não foram afetados pelo ESvLf (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito do extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos Wistar após 14 dias de tratamento no modelo de úlcera induzida por ácido acético

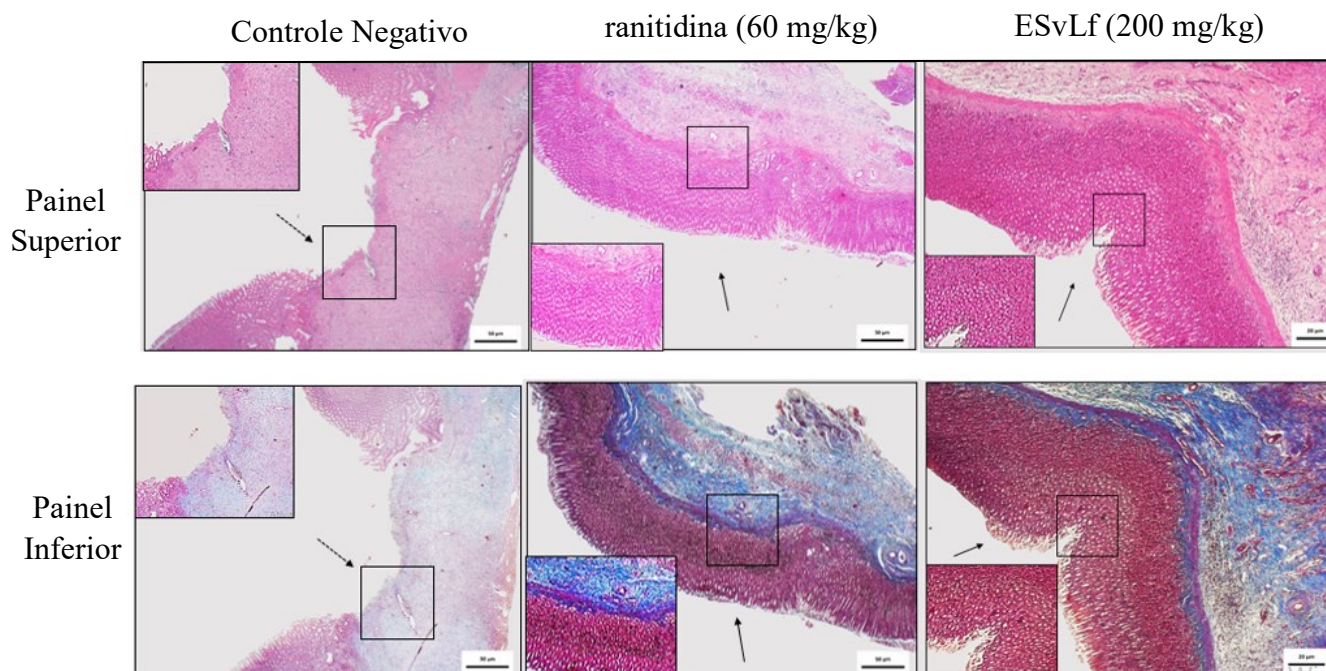
Parâmetros	Controle (NaCl 0,9%)	Ranitidina (60 mg/kg)	ESvLf (200 mg/kg)
<i>Parâmetros Hematológicos</i>			
Hemácias (Millions/mm ³)	7,81 ± 0,14	7,28 ± 0,48	7,41 ± 0,29
Hb (g/dL)	12,75 ± 0,11	11,70 ± 0,68	12,09 ± 0,54
Ht (%)	43,13 ± 2,39	40,37 ± 2,73	40,64 ± 1,59
VCM (micra ³)	54,50 ± 0,50	52,53 ± 2,28	54,88 ± 0,29
HCM (pg)	17,32 ± 0,18	17,12 ± 0,07	16,44 ± 0,24*
CMHC (%)	34,50 ± 0,42	34,40 ± 0,37	32,48 ± 1,35
RDW (%)	13,58 ± 0,16	14,00 ± 0,29	13,40 ± 0,36
Plaquetas (mm ³)	952,20 ± 39,24	1020,00 ± 45,51	924,60 ± 17,58
<i>Parâmetros Bioquímicos</i>			
Creatinina (mg/dL)	0,78 ± 0,03	0,66 ± 0,04	0,81 ± 0,02
Ureia (mg/dL)	42,67 ± 2,97	45,67 ± 1,47	43,13 ± 1,48
FA (U/L)	230,50 ± 69,72	168,70 ± 25,20	144,60 ± 11,57
AST (U/L)	129,00 ± 14,06	168,00 ± 10,00	129,40 ± 5,78
ALT (U/L)	51,00 ± 5,93	51,00 ± 3,05	43,88 ± 2,83

Hemácias; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: amplitude de distribuição de glóbulos vermelhos; FA: fosfatase alcalina; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 6-8/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; * $p < 0,05$.

5.4.3.1.1 Análise Histológica

Na análise histológica do estômago, os cortes fixados e corados com H&E e Tricômico de Masson (TM) revelaram úlceras bem definidas com destruição da camada mucosa e submucosa causada pelo ácido acético nos animais do grupo controle. Os estômagos de ratos tratados com ESvLf (200 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) apresentaram regeneração tecidual semelhante ao grupo controle negativo (Figura 27).

Figura 27 - Fotomicrografias da mucosa gástrica corada com Hematoxilina/Eosina (painel superior) e Tricômico de Masson (painel inferior) de ratos submetidos à indução de úlcera crônica por ácido acético 30%. Os animais foram tratados por via oral com solução de NaCl 0,9% (controle negativo, CN), ranitidina (60 mg/kg) ou ESvLf (200 mg/kg) por 14 dias



A seta cheia indica ausência de úlcera e/ou epitélio simples colunar preservado ou reepitelização, e a seta pontilhada indica presença de úlcera, infiltrado linfoplasmocítico e destruição da mucosa.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foi avaliada e, por definição, representa a concentração em que pelo menos 90% de inibição do crescimento bacteriano foi obtida. ESvLf mostrou atividade anti-*H. pylori* com CIM de 512 µg/mL. A amoxicilina teve uma CIM de 0,3125 µg/mL. Por sua vez, a concentração bactericida mínima (CBM) corresponde à concentração em que não foram observadas colônias bacterianas. Neste ensaio, o ESvLf apresentou CBM de 512 µg/mL.

O extrato etanólico de *Spondias mombin*, rico em ácido gálico e ácido elágico, apresentou atividade anti-*H. pylori* com CIM de 256 µg/mL (BRITO *et al.*, 2018). Outros estudos demonstraram atividade antibacteriana de extratos de casca de *L. ferrea* contra outras cepas bacterianas, como *Staphylococcus aureus* (ARAÚJO *et al.*, 2014; MANGAN, 1988).

Baydar; Ozkan; Sagdic (2004) e Tomás-Menor; Morales-Soto; Barraón-Catalán (2013) mostraram que a atividade antibacteriana de espécies vegetais é proporcional à quantidade de compostos fenólicos na planta.

A infecção por *Helicobacter pylori* induz inflamação, causando danos parcialmente atribuíveis à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A infecção supera a capacidade das células da mucosa e da glutathione local de impedir danos mediados por EROs. A regulação terapêutica da disponibilidade de glutathione evita os danos causados pelo *H. pylori* (MATTHEWS; BUTLER, 2005). O ESvLf aumentou os níveis de GSH na mucosa gástrica em lesões induzidas por etanol, apresentando potencial para reduzir o dano por *H. pylori* na produção de lesões.

5.6 TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade aguda (DL₅₀) é um teste que avalia o potencial tóxico de uma substância. Embora esse teste possa ser usado para extratos vegetais, existem peculiaridades (por exemplo, local de coleta do material vegetal, temperatura, altitude, solo, etc.) que devem ser levadas em consideração, pois podem influenciar o resultado. Portanto, repetimos o teste, mesmo conhecendo estudos anteriores.

A administração do ESvLf (2000 mg/kg, via oral) não causou morte nem alterações comportamentais durante os 14 dias de observação em ratos Wistar fêmeas. Assim, a DL₅₀ foi superior a 2000 mg/kg. O extrato não causou alterações no consumo de alimentos e ganho de peso corporal dos animais, mas levou a um maior consumo de água (17,8%) em comparação ao grupo controle (Tabela 9).

Freitas *et al.* (2012) avaliaram em camundongos a toxicidade aguda do extrato bruto e da fração purificada de vagens de *L. ferrea* nas doses de 300 e 2000 mg/kg e não encontraram óbitos ou alterações nos parâmetros avaliados.

Em nosso estudo, observamos um aumento no consumo de água no grupo ESvLf (2000 mg/kg). Apesar dessa informação, não se pode descartar que a presença de muitos metabólitos secundários presentes no extrato (2000 mg/kg) possa interferir nos mecanismos fisiológicos a nível metabólico ou no sistema nervoso central indutor da polidipsia. Nesse sentido, são necessários mais estudos para esclarecer o mecanismo envolvido no aumento do consumo de água.

Tabela 9 - Efeito do extrato seco de vagens de *L. ferrea* (ESvLf) no consumo de água, ração e na massa corporal de ratas Wistar durante 14 dias.

Parâmetro	Controle (NaCl 0,9%)	ESvLf (2000 mg/kg)
Consumo de ração (g)	16,75 ± 1,86	17,98 ± 0,71
Consumo de água (mL)	31,96 ± 1,05	37,64 ± 1,19*
Massa corporal inicial (g)	216,70 ± 10,09	212,70 ± 18,70
Massa corporal final (g)	222,00 ± 4,61	222,70 ± 17,24

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 3/grupo). Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle, teste t de Student para amostras não pareadas; * $p < 0,02$.

Kobayashi *et al.* (2015) avaliaram em ratos a toxicidade aguda do extrato etanólico de vagens de *L. ferrea* (5000 mg/kg) e os resultados não mostraram morte ou sinais de toxicidade nos animais.

5.7 TOXICIDADE DE DOSES REPETIDAS

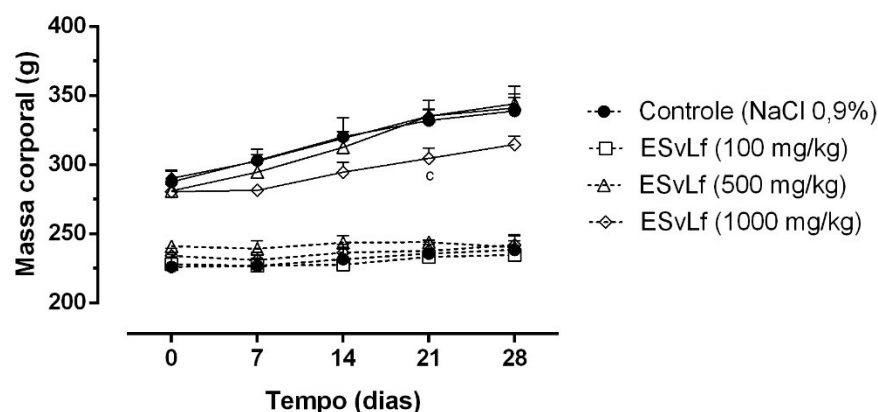
Os testes pré-clínicos são fundamentais para avaliar a segurança do uso de medicamentos e produtos pelo ser humano, estes são realizados a fim de prever a toxicidade e fornecer orientações para a seleção de uma dose segura (RHIOUANI *et al.*, 2008). Uma boa correlação tem sido reportada em estudos toxicológicos entre ratos e humanos. A maior concordância de testes de toxicidade em animais com os seres humanos é com relação às análises hematológicas, gastrointestinais e cardiovasculares (OLSON *et al.*, 2000).

O estudo toxicológico de doses repetidas avalia e caracteriza os efeitos provocados por determinada substância a partir da administração de doses diárias, previamente estabelecidas. Assim como, identifica e caracteriza os órgãos afetados, bem como o grau de comprometimento dos mesmos (TAHRAOUI; ISRAILI; LYOUSSE, 2010). A toxicidade pode ser identificada através da redução da massa corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração (CUNHA *et al.*, 2009), estes parâmetros são indicadores sensíveis do estado de saúde geral do animal (BORZELLECA, 1996). Além de sinais comportamentais como prostração, apatia e a presença de piloereção.

A administração de doses repetidas do ESvLf (100, 500 e 1000 mg/kg/dia) durante 30 dias consecutivos em ratos, de ambos os sexos, não causou óbito ou sinais clínicos de toxicidade como, piloereção, sangramentos ou alteração na atividade locomotora. Os animais que receberam 500 e 1000 mg/kg do extrato apresentaram diarreia nos primeiros dias de tratamento.

Com relação a massa corporal, as fêmeas nas três doses de tratamento apresentaram ganho de massa similar ao controle. Os machos tratados com a maior dose (1000 mg/kg) do extrato apresentaram redução pontual da massa corporal apenas no 21º dia de tratamento (Figura 28). Pereira *et al.* (2012) observaram que a administração de 1 mg/kg da fração polissacarídica das vagens de *Libidibia ferrea*, por 7 dias consecutivos, não alterou a massa corporal dos ratos avaliados.

Figura 28 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) na massa corporal (g) de ratos Wistar machos (linhas sólidas) e fêmeas (linhas pontilhadas) tratados por via oral durante 30 dias consecutivos



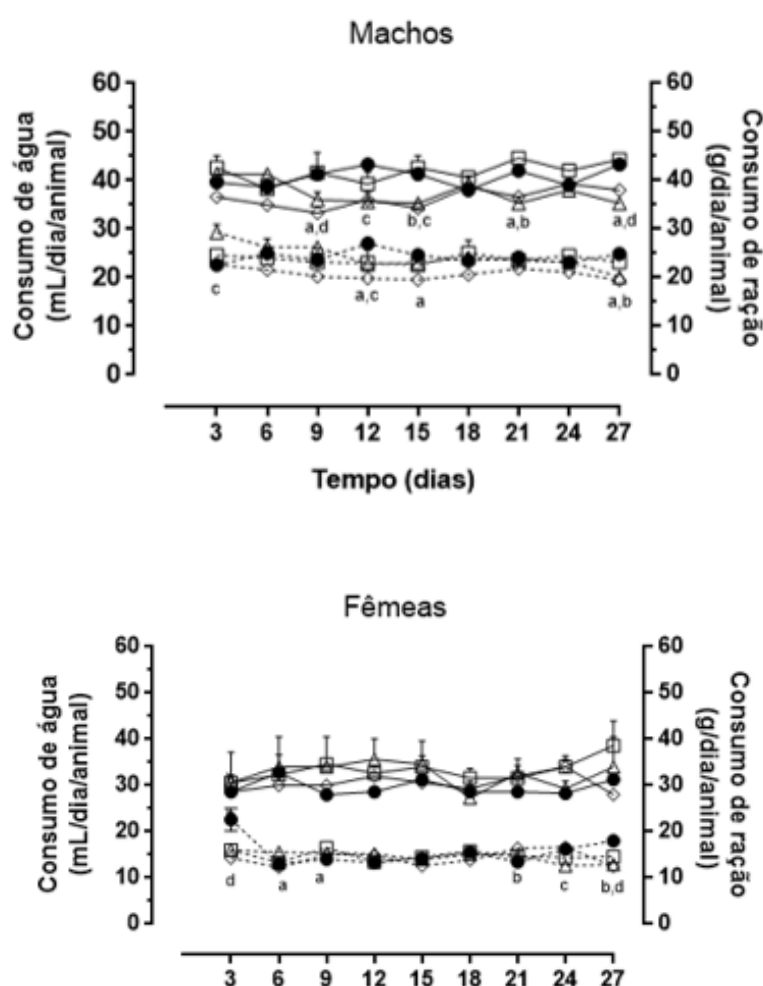
Os resultados estão apresentados em média $\pm$ E.P.M. ($n = 10/\text{grupo}$) e a letra c representa a diferença em relação ao grupo controle (c: ESvLf 1000 mg/kg) no mesmo dia, $p < 0,05$.

Os machos tratados ESvLf (500 e 1000 mg/kg) apresentaram menor consumo de água e ração. As fêmeas apresentaram menor consumo de ração nas três doses ESvLf (100, 500 e 1000 mg/kg), mas não houve diferença significativa no consumo de água (Figura 29). Vasconcelos *et al.*, (2011) relataram que catequinas presentes na casca do caule da *L. ferrea* podem estar relacionadas com a inibição de enzimas digestivas, o que sugere menor esvaziamento gástrico e consequentemente, menor consumo de ração.

McRae; Kennedy (2011) demonstraram que os taninos têm a capacidade de interagir com as proteínas salivares e produzir adstringência, que reflete na diminuição do consumo de alimentos e na digestibilidade dos mesmos. Smith; Ncube; Dube, 1995, observaram que a presença de taninos condensados na dieta reduziu a ingestão de alimentos por bovinos. Entretanto, estudos apontam que os maiores efeitos dos taninos não estão relacionados à inibição no consumo, mas à eficiência diminuída na conversão dos nutrientes digeridos

(CHUNG *et al.*, 1998; AKANDE *et al.*, 2010). Segundo Carmona *et al.* (1996), os taninos condensados presentes no feijão preto inibem a absorção de glicose intestinal. Estas evidências apontam para a interferência dos taninos na fisiologia gastrointestinal, e pode ter relação com o menor consumo de ração dos animais.

Figura 29 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) no consumo de água (linhas sólidas) e ração (linhas pontilhadas) de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral durante 30 dias consecutivos. Os grupos são representados por símbolos: ■ (Controle), □ (ESvLf 100 mg/kg), △ (ESvLf 500 mg/kg) e ◇ (ESvLf 1000 mg/kg)



Os resultados estão apresentados em média $\pm$ E.P.M. ($n = 10/\text{grupo}$) e as letras representam as diferenças em relação ao grupo controle no mesmo dia (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's; $a = *p < 0,05$; $b = **p < 0,01$; $c = ***p < 0,001$, $d = ****p < 0,0001$).

O ESvLf causou alterações significativas em alguns parâmetros hematológicos (Tabela 10) e bioquímicos (Tabela 11). Para ratos machos, houve decréscimo significativo de 9,06% na Hb e de 8,32% na CHCM na dose do ESvLf (1000 mg/kg), a HCM apresentou redução de 7,68 e 7,30% em relação ao controle, no ESvLf (100 e 500 mg/kg, respectivamente). Observou-se

também um aumento significativo de 14,72% de RBC, 45,65% de PLT, 64,68% de WBC nos machos tratados com o ESvLf (100 mg/kg), além do aumento de 4,39% de RBC e 77,52% de WBC nos animais que receberam 500 mg/kg do ESvLf, quando comparados ao grupo controle.

Nas fêmeas, ocorreu decréscimo de 7,68% no VCM e aumento significativo de 6,93% na CHCM na dose do ESvLf (500 mg/kg). Nos demais parâmetros examinados, não foram encontrados achados clínicos estatisticamente significantes (Tabela 10).

Durante o envelhecimento, a morte dos eritrócitos é um processo fisiológico e programado. Porém, esse fenômeno também pode ocorrer devido à estresses mecânicos e químicos sofridos pela célula na circulação sanguínea. Sob condições fisiológicas, pouco menos de 1% das hemácias são destruídas diariamente e substituídas por um número quase idêntico de células novas (PRICE, 2008).

Conforme envelhece, o eritrócito perde água, e sua área de superfície diminui. A proporção entre a área de superfície da hemácia e seu volume também diminui, aumentando a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), e a redução no volume corpuscular médio (VCM), o que interfere na capacidade de deformação celular da hemácia à medida que se comprime pelos capilares estreitos da rede vascular (PRICE, 2008). Portanto, as alterações hematológicas verificadas nos machos tratados com ESvLf (100, 500 e 1000 mg/kg), como a redução de hemoglobina (Hb), redução da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) e nas fêmeas tratadas com ESvLf (500 mg/kg), com redução no volume corpuscular médio (VCM) e aumento da CHCM, mostram que algum metabólito encontrado no ESvLf causou estresse químico e comprometeu a integridade das hemácias.

Ao estudar a toxicidade crônica do extrato aquoso da casca do caule de *L. ferrea* (300 e 1500 mg/kg), Vasconcelos *et al.* (2011) verificaram alterações nos parâmetros hematológicos, entre eles o VCM e CHCM, assim como o aumento dos leucócitos.

A estimativa das enzimas séricas, aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT) assim como da lactato desidrogenase (LDH) é fundamental para verificar a extensão e o tipo de dano hepatocelular. Nos machos tratados com ESvLf (100, 500 e 1000 mg/kg), ocorreu aumento nos níveis de AST de 27,74; 27,48 e 62,04%, respectivamente. O aumento nos níveis séricos dessas enzimas, reflete os danos na integridade estrutural do fígado, pois quanto maior o dano tecidual causado pelo extrato, mais enzimas são liberadas na circulação após destruição

autolítica ou necrose celular dos hepatócitos (ASSI; NASSER, 1999; KHAN; AHMED, 2009) (Figura 30).

Entretanto, ocorreu redução de 30,54% nos níveis séricos de ALT, nos machos tratados com (ESvLf 1000 mg/kg), e não houve alteração na lactato desidrogenase (LDH). No grupo das fêmeas, não foram encontradas alterações clínicas estatisticamente significantes para qualquer um dos parâmetros examinados. Uma abordagem para a detecção de lesões hepáticas envolve a medição dos peróxidos lipídicos, tais como o malondialdeído (MDA) (KHAN; AHMED, 2009), um dos principais aldeídos reativos que aparece durante a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados da membrana biológica (NAIK; PANDA, 2007).

Ratos machos diabéticos tiveram um efeito hipoglicêmico após terem sido tratados com extrato de casca de *L. ferrea* (300 e 450 mg/kg) (VASCONCELOS *et al.*, 2011). No entanto, neste trabalho observamos um efeito hiperglicêmico em fêmeas tratadas com (500 mg/kg) do ESvLf, em comparação ao grupo controle. Pickler *et al.* (2019) verificaram que (1,0 g/kg/dia) de extratos da casca do caule e de sementes da *L. ferrea*, aumentaram a disponibilidade de glicose para o feto, devido à elevação deste parâmetro, no líquido amniótico.

Nos machos, tratados com ESvLf (100 e 1000 mg/kg) ocorreu aumento significativo nos níveis de ureia, de 35,63 e 40,80%, respectivamente. O aumento da ureia plasmática pode ocorrer pela redução da filtração glomerular, por perfusão renal reduzida ou pelo aumento na ingestão de proteínas (COLES, 1984; WILLARD; TVEDTEN; TURNWALD, 1994). Pereira *et al.* (2012) trataram animais experimentais com a fração isolada de polissacarídeos de vagens de *L. ferrea*, incluindo as sementes, esses animais exibiram rins disfuncionais, associado aos altos níveis de ureia no sangue.

Os machos tratados com ESvLf (100 mg/kg) apresentaram decréscimo de 52,94% nos níveis de creatinina. Esta redução pode refletir, indiretamente, a quantidade de massa muscular e o grau de nutrição do animal. Apesar desta alteração ter sido pontual e na menor dose do tratamento, ela pode ter ocorrido devido à presença de taninos no ESvLf, uma vez que os taninos comprometem a absorção de macronutrientes (VASCONCELOS *et al.*, 2011). Em concordância com os resultados do presente estudo, Pickler *et al.* (2019) verificaram que o extrato de sementes de *L. ferrea*, aumentou os níveis de creatinina do soro materno, em um estudo de toxicidade reprodutiva da espécie.

Tabela 10 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre os parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral durante 30 dias consecutivos

Parâmetros	Machos				Fêmeas			
	Controle	ESvLf	ESvLf	ESvLf	Controle	ESvLf	ESvLf	ESvLf
	(NaCl 0,9%)	(100 mg/kg)	(500 mg/kg)	(1000 mg/kg)	(NaCl 0,9%)	(100 mg/kg)	(500 mg/kg)	(1000 mg/kg)
Hemácia ($10^6/\mu\text{L}$)	7,74 $\pm$ 0,24	8,88 $\pm$ 0,24**	8,08 $\pm$ 0,11	7,72 $\pm$ 0,23	7,26 $\pm$ 0,19	7,60 $\pm$ 0,12	7,82 $\pm$ 0,27	7,54 $\pm$ 0,35
Hb (g/dL)	16,34 $\pm$ 0,34	17,00 $\pm$ 0,16	16,56 $\pm$ 0,32	14,86 $\pm$ 0,38*	15,56 $\pm$ 0,38	15,72 $\pm$ 0,25	16,44 $\pm$ 0,45	15,56 $\pm$ 0,60
Ht (%)	49,20 $\pm$ 1,98	54,00 $\pm$ 0,63	51,80 $\pm$ 1,06	48,60 $\pm$ 1,36	48,60 $\pm$ 1,56	49,20 $\pm$ 0,86	48,20 $\pm$ 1,65	50,20 $\pm$ 1,28
VCM (fL)	63,80 $\pm$ 2,87	61,00 $\pm$ 1,35	64,16 $\pm$ 0,80	63,02 $\pm$ 0,62	66,88 $\pm$ 0,54	64,84 $\pm$ 1,15	61,74 $\pm$ 1,22*	66,88 $\pm$ 1,69
HCM (pg)	20,82 $\pm$ 0,35	19,22 $\pm$ 0,37**	20,52 $\pm$ 0,25	19,30 $\pm$ 0,14**	21,32 $\pm$ 0,13	20,74 $\pm$ 0,27	21,10 $\pm$ 0,29	20,70 $\pm$ 0,18
CHCM (g/dL)	33,42 $\pm$ 1,14	31,54 $\pm$ 0,19	32,02 $\pm$ 0,13	30,64 $\pm$ 0,35*	32,00 $\pm$ 0,36	31,98 $\pm$ 0,24	34,22 $\pm$ 0,59*	31,00 $\pm$ 0,67
Leuc. ($10^3/\mu\text{L}$)	4,36 $\pm$ 0,57	7,18 $\pm$ 0,49**	7,74 $\pm$ 0,66***	4,94 $\pm$ 0,26	4,06 $\pm$ 0,18	6,80 $\pm$ 1,11	5,52 $\pm$ 0,76	5,92 $\pm$ 0,80
Plaqueta ($10^3/\mu\text{L}$)	613,7 $\pm$ 33,13	893,9 $\pm$ 76,80**	742,5 $\pm$ 39,88	736,6 $\pm$ 31,32	866,4 $\pm$ 85,80	870,2 $\pm$ 44,73	759,6 $\pm$ 29,84	754,8 $\pm$ 24,19
VPM (fL)	7,72 $\pm$ 0,09	8,64 $\pm$ 0,57	8,00 $\pm$ 0,29	7,88 $\pm$ 0,19	7,50 $\pm$ 0,25	7,42 $\pm$ 0,10	7,60 $\pm$ 0,10	7,60 $\pm$ 0,10
Linfócito (%)	57,60 $\pm$ 3,41	58,80 $\pm$ 2,67	52,20 $\pm$ 4,29	55,00 $\pm$ 1,41	71,40 $\pm$ 7,30	66,80 $\pm$ 5,54	56,00 $\pm$ 3,01	57,60 $\pm$ 6,03
Monócito (%)	2,80 $\pm$ 0,58	2,00 $\pm$ 0,70	2,40 $\pm$ 0,50	1,20 $\pm$ 0,37	1,80 $\pm$ 0,58	1,60 $\pm$ 0,50	2,40 $\pm$ 0,60	1,80 $\pm$ 0,37
Eosinófilo (%)	2,2 $\pm$ 1,02	3,60 $\pm$ 1,43	2,80 $\pm$ 0,86	3,20 $\pm$ 1,71	1,00 $\pm$ 0,31	2,20 $\pm$ 0,66	3,00 $\pm$ 1,18	1,40 $\pm$ 0,50
Neutrófilo (%)	37,40 $\pm$ 3,40	35,60 $\pm$ 3,07	42,40 $\pm$ 4,04	40,20 $\pm$ 1,39	31,80 $\pm$ 11,64	29,40 $\pm$ 5,10	38,60 $\pm$ 1,99	39,20 $\pm$ 5,68

Hb: hemoglobina, Ht: hematócrito, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, Leuc.: Leucócitos, VPM: volume plaquetário médio. Os valores representam a média $\pm$ E. P. M (n = 10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett; * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$, e *** $p < 0,001$).

Tabela 11 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral durante 30 dias consecutivos

Parâmetros	Machos				Fêmeas			
	Controle	ESvLf	ESvLf	ESvLf	Controle	ESvLf	ESvLf	ESvLf
	(NaCl 0,9%)	(100 mg/kg)	(500 mg/kg)	(1000 mg/kg)	(NaCl 0,9%)	(100 mg/kg)	(500 mg/kg)	(1000 mg/kg)
Glicose (mg/dL)	86,60 ± 9,00	111,20 ± 13,36	138,8 ± 13,89*	59,00 ± 8,53	88,40 ± 6,52	98,20 ± 11,28	103,20 ± 12,35	95,40 ± 14,01
Ureia (mg/dL)	34,80 ± 3,15	47,20 ± 1,11*	43,20 ± 2,74	49,00 ± 3,19**	46,00 ± 3,05	48,00 ± 3,80	42,80 ± 2,69	44,60 ± 1,56
Creatinina (mg/dL)	0,34 ± 0,05	0,16 ± 0,02*	0,30 ± 0,07	0,38 ± 0,03	0,30 ± 0,07	0,44 ± 0,12	0,26 ± 0,04	0,30 ± 0,00
Ácido úrico (mg/dL)	0,80 ± 0,37	2,00 ± 0,44	1,80 ± 0,58	0,82 ± 0,18	1,80 ± 0,58	1,60 ± 0,24	1,20 ± 0,20	1,00 ± 0,00
Albumina (g/dL)	4,20 ± 0,10	4,22 ± 0,24	4,62 ± 0,10	3,96 ± 0,08	4,62 ± 0,10	4,70 ± 0,17	4,54 ± 0,12	4,52 ± 0,07
AST (U/L)	131,20 ± 7,32	167,60 ± 4,14*	167,00 ± 5,41*	212,60 ± 12,62****	159,20 ± 11,41	140,60 ± 4,52	166,00 ± 11,44	128,00 ± 7,62
ALT (U/L)	47,80 ± 2,31	46,80 ± 2,67	51,40 ± 2,13	33,20 ± 1,11***	49,40 ± 11,95	38,40 ± 3,04	35,20 ± 5,09	32,40 ± 3,23
Colest. total (mg/dL)	41,00 ± 4,11	52,60 ± 4,25	49,40 ± 3,35	40,20 ± 1,65	49,40 ± 3,35	67,60 ± 11,32	42,00 ± 5,18	39,80 ± 2,51
Triglic. (mg/dL)	42,20 ± 6,23	59,20 ± 10,48	30,20 ± 3,29	36,60 ± 4,30	45,80 ± 4,71	44,00 ± 7,96	32,60 ± 6,01	39,80 ± 3,13
GGT (U/L)	2,60 ± 0,50	1,20 ± 0,20	3,00 ± 0,63	3,40 ± 0,67	3,00 ± 0,63	1,20 ± 0,20	3,00 ± 0,70	1,60 ± 0,40
FA (U/L)	236,60 ± 20,46	294,60 ± 15,37*	462,4 ± 98,52*	213,60 ± 21,00	132,00 ± 20,19	129,80 ± 19,63	228,80 ± 120,20	182,20 ± 56,40
LDH (U/L)	1967,0 ± 196,9	1937,0 ± 76,1	940,60 ± 94,1	1759,0 ± 218,5	940,6 ± 94,1	926,1 ± 210,4	844,3 ± 153,8	1096,0 ± 171,1
Prot. totais (g/dL)	5,88 ± 0,31	5,76 ± 0,24	5,72 ± 0,49	5,40 ± 0,33	6,78 ± 0,12	6,24 ± 0,22	6,16 ± 0,44	6,58 ± 0,34
Bil. total (mg/dL)	0,20 ± 0,04	0,15 ± 0,07	0,16 ± 0,03	0,32 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,25 ± 0,11	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01
Bil. direta (mg/dL)	0,10 ± 0,00	0,06 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,06	0,10 ± 0,00	0,13 ± 0,00

AST: Aspartato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase, Colest.: Colesterol, Triglic.: Triglicerídeos, GGT: Gama-Glutamil Transpeptidase, FA: Fosfatase alcalina, LDH: Lactato desidrogenase, Prot.: Proteínas, Bil.: Bilirrubina. Os valores representam a média ± E. P. M (n = 10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett; * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

5.7.1 Atividade antioxidante *in vivo*

5.7.1.1 Níveis de peroxidação lipídica nos tecidos hepático e renal

O ESvLf na dose de 1000 mg/kg reduziu significativamente a quantidade de malondialdeído que reagiu com o ácido tiobarbitúrico nos tecidos hepáticos em $0,23 \pm 0,03$ nmol MDA/mg de proteína (38,86%) nas fêmeas e $0,15 \pm 0,05$ nmol MDA/mg de proteína (64,81%) nos machos, respectivamente, quando comparado ao grupo controle.

O pré-tratamento com o ESvLf preveniu o aumento dos níveis dessas enzimas, indicando que o mesmo protege o hepatócito ao evitar a perda da sua integridade funcional. Assim, a injúria hepática induzida por algum metabólito do ESvLf é reduzida, provavelmente devido ao seu efeito antioxidante. Silva *et al.* (2011) relataram que o extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea*, exibiu forte atividade antioxidante *in vitro* e demonstrou uma significativa e linear correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante pelo método fosfomolibidênio, assim como pela atividade sequestradora do radical superóxido.

No rim, o ESvLf nas diferentes doses, não influenciou a formação de TBARS nos machos e fêmeas, quando comparado ao grupo controle.

5.7.1.2 Níveis de glutathiona reduzida (GSH) nos tecidos hepático e renal

A administração oral do ESvLf aumentou significativamente em $32,06 \pm 2,38$ nmol de GSH/mg de proteína (163,90%) e $38,03 \pm 9,06$ nmol de GSH/mg de proteína (205,23%) os níveis basais da atividade antioxidante da enzima GSH-Px, nos machos e nas fêmeas, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, respectivamente.

Os níveis dos grupamentos sulfidrílicos (GSH) no tecido renal das fêmeas aumentou nas doses de 500 e 1000 mg/kg, em 222,98 e 216,31% ($44,82 \pm 4,86$ e $43,48 \pm 7,59$ nmol de GSH/mg de proteína), respectivamente. Nos machos, a dose de 1000 mg/kg foi a que apresentou um aumento significativo do GSH, em 301,39% ($43,28 \pm 12,44$ nmol de GSH/mg de proteína).

A análise macroscópica dos órgãos, dos animais tratados com o ESvLf não mostrou alterações significativas na cor ou textura dos mesmos, quando comparados com o grupo controle. O exato mecanismo pelo qual os constituintes da *L. ferrea* poderiam danificar os órgãos, não pode ser derivada da presente investigação, mas o prejuízo para determinados órgãos e tecidos possivelmente pode ser avaliado pela análise das enzimas séricas, mensuração das massas absolutas e relativas dos órgãos, assim como, as análises histopatológicas dos tecidos hepático e renal.

Ratos machos, tratados com as diferentes doses do ESvLf (100, 500 e 1000 mg/kg) apresentaram redução na massa absoluta do coração, rim esquerdo, baço, adrenais e pâncreas. Nas fêmeas, o ESvLf (100 mg/kg) causou aumento de 19,83 e 22,64% nas massas absoluta e relativa do estômago, respectivamente. Nos demais órgãos, não foram observadas alterações significativas em comparação ao grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf), sobre as massas absoluta (g) e relativa dos órgãos (g/100 g de massa corporal de animal) de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral, durante 30 dias consecutivos

Órgãos	Machos				Fêmeas			
	Controle	ESvLf	ESvLf	ESvLf	Controle	ESvLf	ESvLf	ESvLf
	(NaCl 0,9%)	(100 mg/kg)	(500 mg/kg)	(1000 mg/kg)	(NaCl 0,9%)	(100 mg/kg)	(500 mg/kg)	(1000 mg/kg)
Coração (g)	1,25 ± 0,03	1,08 ± 0,06*	1,01 ± 0,03**	0,92 ± 0,02***	0,78 ± 0,03	0,75 ± 0,03	0,74 ± 0,02	0,77 ± 0,01
(g/100 g)	0,35 ± 0,01	0,33 ± 0,00	0,32 ± 0,00*	0,30 ± 0,01**	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,33 ± 0,01
Pulmão (g)	1,65 ± 0,06	1,45 ± 0,16	1,45 ± 0,16	1,65 ± 0,12	1,36 ± 0,11	1,25 ± 0,04	1,61 ± 0,12	1,39 ± 0,14
(g/100 g)	0,47 ± 0,01	0,44 ± 0,03	0,46 ± 0,01	0,54 ± 0,04	0,60 ± 0,06	0,56 ± 0,01	0,70 ± 0,06	0,59 ± 0,05
Fígado (g)	10,06 ± 0,39	9,79 ± 0,68	9,02 ± 0,47	8,29 ± 0,35	6,43 ± 0,23	6,62 ± 0,38	6,24 ± 0,08	6,62 ± 0,28
(g/100 g)	2,86 ± 0,05	3,00 ± 0,14	2,84 ± 0,06	2,72 ± 0,07	2,81 ± 0,03	2,96 ± 0,13	2,72 ± 0,07	2,86 ± 0,13
Rim D (g)	1,10 ± 0,19	0,91 ± 0,05	0,79 ± 0,05	0,48 ± 0,04	0,83 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,87 ± 0,02	0,86 ± 0,02
(g/100 g)	0,35 ± 0,00	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,34 ± 0,00	0,36 ± 0,00	0,36 ± 0,01	0,38 ± 0,00	0,37 ± 0,00
Rim E (g)	1,23 ± 0,05	1,16 ± 0,05	1,10 ± 0,05	1,02 ± 0,02*	0,82 ± 0,04	0,78 ± 0,03	0,81 ± 0,01	0,83 ± 0,03
(g/100 g)	0,34 ± 0,00	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,33 ± 0,00	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,00	0,36 ± 0,00
Adrenais (g)	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00*	0,04 ± 0,00*	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
(g/100 g)	0,05 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Baço (g)	1,10 ± 0,19	0,91 ± 0,05	0,79 ± 0,05	0,48 ± 0,04**	0,52 ± 0,05	0,75 ± 0,05	0,48 ± 0,02	0,70 ± 0,26
(g/100 g)	0,31 ± 0,04	0,30 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,15 ± 0,01**	0,22 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,11
Estômago (g)	1,64 ± 0,03	1,68 ± 0,09	1,55 ± 0,05	1,45 ± 0,06	1,21 ± 0,04	1,45 ± 0,01*	1,27 ± 0,08	1,24 ± 0,06

Os valores representam a média ± E. P. M (n = 10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett; * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$).

Continuação da Tabela 12 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf), sobre as massas absoluta (g) e relativa dos órgãos (g/100 g de massa corporal de animal) de ratos Wistar machos e fêmeas tratados por via oral, durante 30 dias consecutivos.

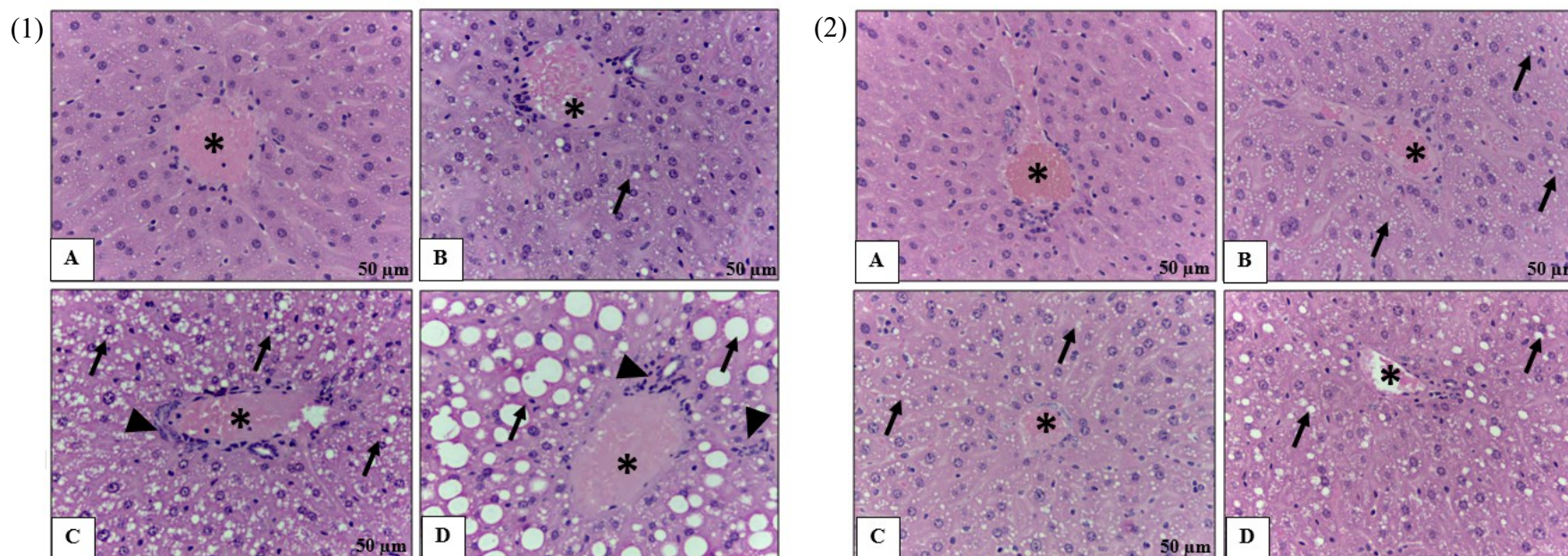
Órgãos	Machos				Fêmeas			
	Controle	ESvLf	ESvLf	ESvLf	Controle	ESvLf	ESvLf	ESvLf
	(NaCl 0,9%)	(100 mg/kg)	(500 mg/kg)	(1000 mg/kg)	(NaCl 0,9%)	(100 mg/kg)	(500 mg/kg)	(1000 mg/kg)
(g/100 g)	0,46 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,65 ± 0,01*	0,55 ± 0,03	0,54 ± 0,03
Duodeno (g)	0,40 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,30 ± 0,05	0,29 ± 0,00	0,30 ± 0,04	0,27 ± 0,01	0,38 ± 0,03
(g/100 g)	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,16 ± 0,01
Pâncreas (g)	1,03 ± 0,02	0,81 ± 0,11	0,74 ± 0,06*	0,62 ± 0,03**	0,72 ± 0,03	0,62 ± 0,10	0,64 ± 0,06	0,62 ± 0,11
(g/100 g)	0,29 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,20 ± 0,01*	0,32 ± 0,02	0,28 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,26 ± 0,04
Encéfalo (g)	1,92 ± 0,03	1,90 ± 0,01	1,86 ± 0,01	1,81 ± 0,01**	1,78 ± 0,02	1,87 ± 0,03	1,83 ± 0,02	1,85 ± 0,03
(g/100 g)	0,54 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,59 ± 0,00	0,78 ± 0,03	0,83 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,79 ± 0,01
Testículos (g)	1,54 ± 0,21	1,69 ± 0,06	1,70 ± 0,06	1,67 ± 0,05	—	—	—	—
(g/100 g)	0,44 ± 0,06	0,52 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,54 ± 0,02	—	—	—	—
Próstata (g)	0,35 ± 0,03	0,31 ± 0,204	0,33 ± 0,02	0,30 ± 0,02	—	—	—	—
(g/100 g)	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,00	—	—	—	—
Útero (g)	—	—	—	—	0,51 ± 0,06	0,52 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,42 ± 0,05
(g/100 g)	—	—	—	—	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Ovários (g)	—	—	—	—	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00
(g/100 g)	—	—	—	—	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00

Os valores representam a média ± E. P. M (n = 10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett; * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$).

Nos machos e nas fêmeas, o exame microscópico do fígado, mostrou hepatócitos com esteatose microvesicular discreta e difusa (ESvLf, 100 e 500 mg/kg) e a presença de hepatócitos com esteatose macrovesicular (ESvLf, 1000 mg/kg). De acordo com Pacifico *et al.* (2007) a concentração de transaminases está positivamente correlacionada a um aumento na fração de gordura hepática. O ESvL (100, 500 e 1000 mg/kg) causou aumento na concentração de aspartato amino transferase (AST) nos machos, o que pode estar associado ao quadro de esteatose hepática encontrado nestes animais. Fishbein *et al.* (2003) mostraram que o aumento nos níveis das transaminases foi significativamente maior em pacientes com grave aumento na gordura hepática (Figura 30).

A análise microscópica dos rins de machos e fêmeas tratados com (ESvLf 100, 500 mg/kg) mostrou degeneração do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos com e sem a presença de espaço capsular do glomérulo e, hiperplasia discreta nos animais tratados com ESvLf (500 mg/kg). Na dose do ESvLf (1000 mg/kg) o rim mostrou degeneração moderada do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos, e hiperplasia glomerular indicando a possibilidade de glomerulonefrite, que pode estar associada com o aumento dos níveis de ureia nos machos (Figura 31).

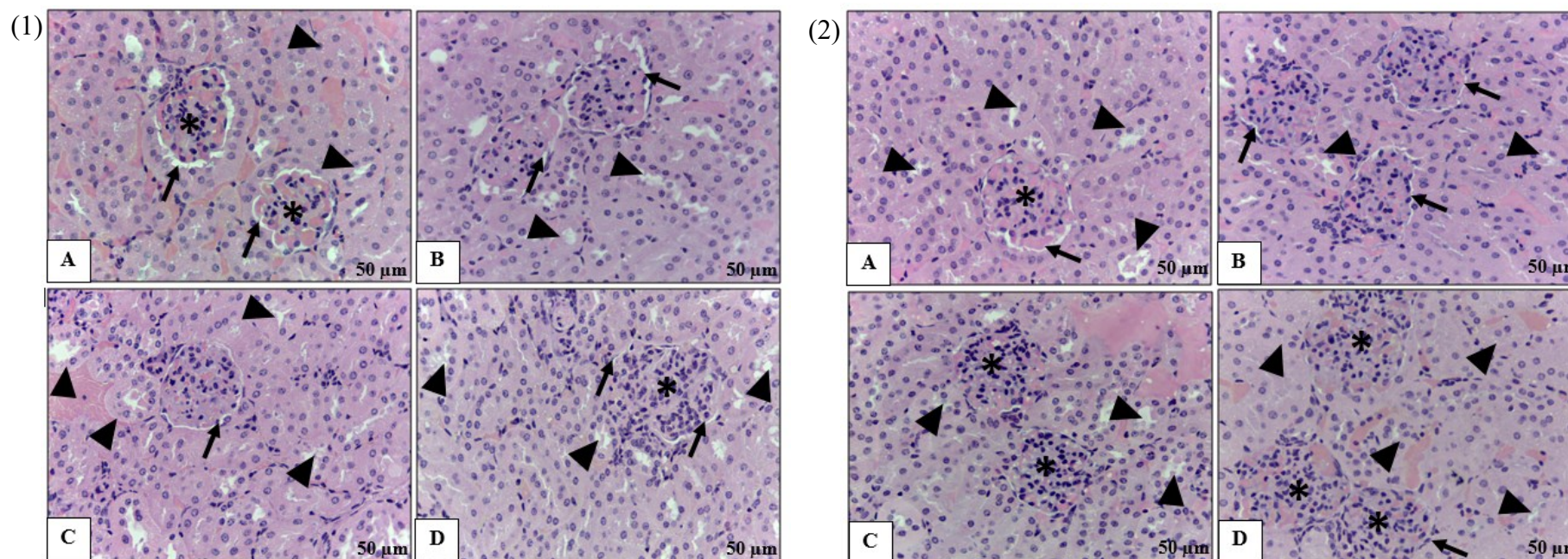
Figura 30 - Fotomicrografias do tecido hepático de ratos Wistar, machos (1) e fêmeas (2), submetidos ao tratamento com o extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) durante 30 dias consecutivos. Os animais foram tratados por via oral, (A) controle (NaCl 0,9%), (B) ESvLf (100 mg/kg), (C) ESvLf (500 mg/kg), (D) ESvLf (1000 mg/kg)



(A) Parênquima hepático bem preservados com veia centro lobular (asterisco); (B) Notar hepatócitos exibindo esteatose microvesicular discreta; (C) Notar hepatócitos exibindo esteatose microvesicular difusa (setas) e reação inflamatório discreta (cabeça de seta); (D) Notar hepatócitos exibindo esteatose macrovesicular difusa (setas) e reação inflamatório focal discreta (cabeça de seta).

(A) Parênquima hepático bem preservados com veia centro lobular (asterisco); (B) e (C) Notar hepatócitos exibindo esteatose microvesicular discreta (setas); (D) Notar hepatócitos exibindo esteatose macrovesicular discreta (setas).

Figura 31 - Fotomicrografias do tecido renal de ratos Wistar, machos (1) e fêmeas (2), submetidos ao tratamento com o extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf), durante 30 dias consecutivos. Os animais foram tratados por via oral, (A) controle (NaCl 0,9%), (B) ESvLf (100 mg/kg), (C) ESvLf (500 mg/kg), (D) ESvLf (1000 mg/kg)



(A) Evidenciar epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeças de seta) e do espaço capsular (setas) bem preservados; (B) Notar degeneração leve do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeça de seta) e presença do espaço capsular (setas); (C) Notar degeneração moderada do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeça de seta) e espaço capsular reduzido (setas); (D) Notar degeneração moderada do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeças de seta), além da redução do espaço capsular (setas) e hiperplasia glomerular indicando possivelmente glomerulonefrite (asterisco).

(A) Evidenciar epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeças de seta) e do espaço capsular (setas) e glomérulo bem preservados; (B) Notar degeneração leve do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeça de seta) e presença do espaço capsular (setas); (C) Notar degeneração moderada do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeça de seta), sem espaço capsular do glomérulo (asteriscos) e hiperplasia discreta; (D) Notar degeneração moderada do epitélio simples colunar dos túbulos contorcidos (cabeças de seta), sem espaço capsular (setas) e hiperplasia moderada indicando possivelmente glomerulonefrite (asterisco).

5.8 TOXICIDADE REPRODUTIVA

5.8.1 Avaliação da performance reprodutiva materna

O ESvLf nas doses de 100, 500 e 1000 mg/kg não causou óbito ou sinais clínicos de toxicidade nas progenitoras tratadas durante os períodos de pré-implantação e organogênese. Parâmetros maternos, como massa corporal, consumo de água e ração, e sinais clínicos de toxicidade foram determinados e não apresentaram diferença entre os grupos tratados e o grupo controle nos períodos avaliados (Figura 32).

Na análise morfológica dos órgãos das progenitoras tratadas no período de pré-implantação, observou-se redução significativa, de 15,79% na massa absoluta do coração nas ratas tratadas com ESvLf (1000 mg/kg) e redução de 17,52 e 15,82% na massa absoluta do fígado, ESvLf (500 e 1000 mg/kg), respectivamente. No entanto, nenhuma alteração na cor ou textura destes órgãos foi observada. Durante o período de organogênese, o ESvLf não causou alterações nas massas absoluta e relativa dos órgãos.

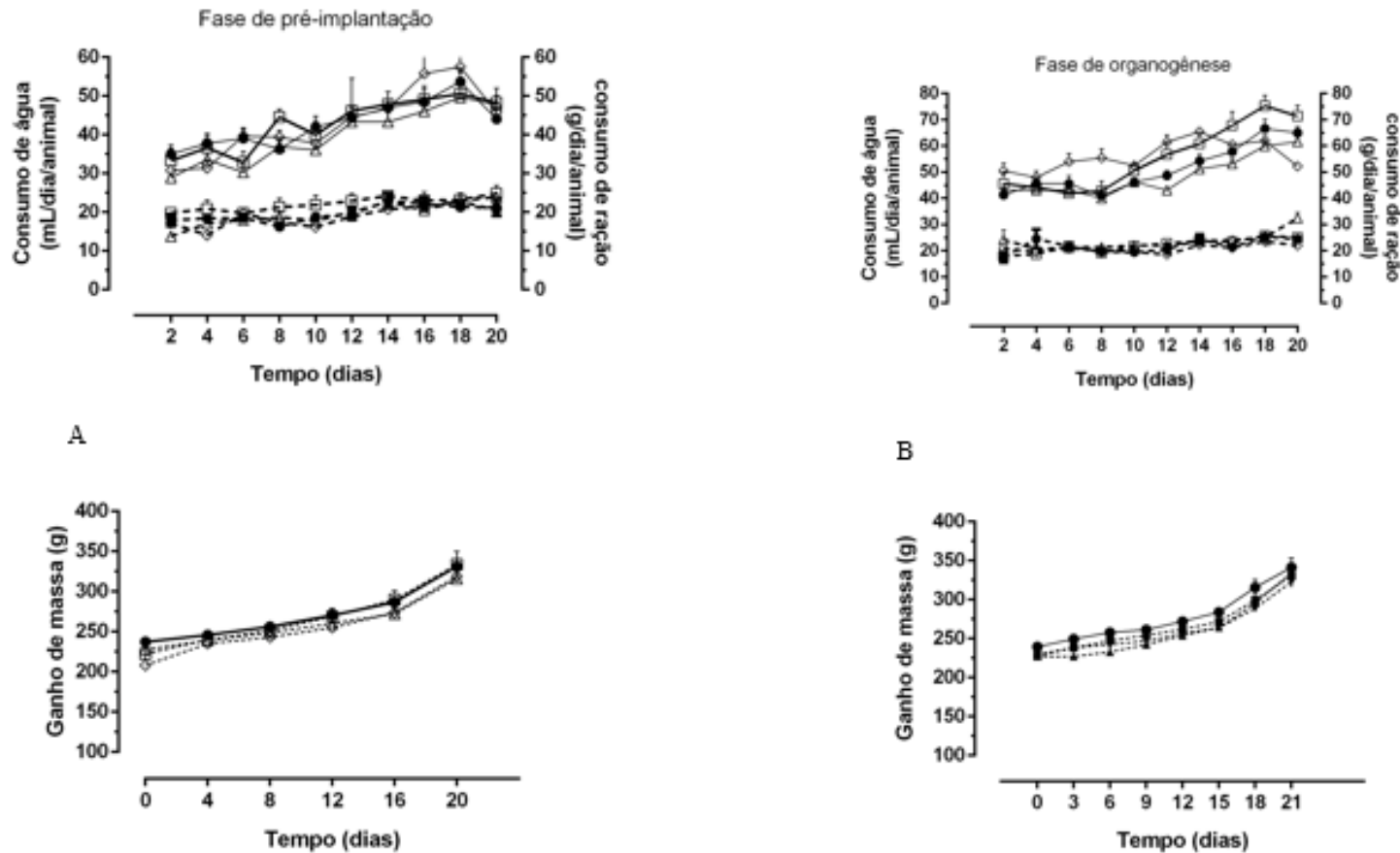
Nos períodos de pré-implantação e organogênese foram avaliados os seguintes parâmetros reprodutivos: massa dos ovários, massa das placentas, índices de implantação e reabsorção, taxas de perda pré e pós implantação. Estes, não apresentaram diferença estatística entre os grupos tratados e o controle (Tabelas 13e 14).

A taxa de perda de pré-implantação é um parâmetro usado para estabelecer uma correlação entre o número de ovócitos liberados, que após a fertilização, conseguem se implantar no útero (ALMEIDA; MELO; XAVIER, 2000).

Uma falha na implantação do embrião pode estar relacionada à exposição materna a agentes químicos que podem interferir neste evento por diferentes mecanismos, como, modificação dos níveis hormonais; alteração das condições uterinas necessárias para a nidação e distúrbios no transporte tubário interferindo na chegada do blastocisto no útero (CUMMINGS, 1990).

O extrato seco das vagens de *L. ferrea* administrado às ratas durante a fase de pré-implantação, sugere uma capacidade normal para reprodução e implantação dos blastocistos. Estes dados corroboram com os resultados de Peters *et al.* (2008), neste, foi avaliada o extrato aquoso das vagens da *Caesalpineia ferrea*, na dose de 300 mg/kg.

Figura 32 - Efeito do extrato seco das vagens de *L. ferrea* (ESvLf) sobre os consumos de água (linha sólida) e ração (linha pontilhada), assim como o ganho de massa corporal em ratas Wistar prenhes tratadas por via oral durante as fases de pré-implantação (A) e organogênese (B). Os grupos estão representados por símbolos: ■ (Controle), □ (ESvLf 100 mg/kg), △ (ESvLf 500 mg/kg) e ◇ (ESvLf 1000 mg/kg)



Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (n = 7-10/grupo).

Tabela 13 - Parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas por via oral com o extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea* (ESvLf), durante o período de pré-implantação (0º ao 5º dia de prenhez)

Parâmetros Reprodutivos	Controle (NaCl 0,9%)	ESvLf (100 mg/kg)	ESvLf (500 mg/kg)	ESvLf (1000 mg/kg)
Ratas Prenhes	9	7	9	9
Ganho de massa no período de pré-implantação (g) ^a	12,33 ± 1,89	22,57 ± 3,92	12,67 ± 2,83	5,66 ± 2,92
Ganho de massa no período de prenhez (g) ^a	93,89 ± 5,15	110,9 ± 12,46	88,11 ± 8,80	88,44 ± 4,10
Número de fetos vivos	92	67	86	86
Número de fetos mortos	0	0	0	0
Relação fetos/rata ^a	10,22 ± 0,64	9,57 ± 0,89	9,55 ± 1,35	9,55 ± 0,60
Massa dos fetos (g) ^a	3,41 ± 0,03	3,49 ± 0,06	3,47 ± 0,02	3,41 ± 0,02
Massa total das placentas (g) ^a	5,75 ± 0,27	6,17 ± 0,56	5,37 ± 0,71	5,75 ± 0,43
Massa dos ovários (mg/100 g) ^a	21,77 ± 1,26	22,28 ± 1,59	22,44 ± 1,88	23,74 ± 1,18
Número de sítios de implantação	95	72	97	96
Número de sítios de reabsorção	3	5	11	10
Números de corpos lúteos ^a	10,56 ± 0,53	10,71 ± 0,52	10,78 ± 0,72	8,55 ± 1,75
Índice de implantação (%) ^b	100	100	100	100
Índice de reabsorção (%) ^b	0	0	0	7,692
Perda pré-implantação (%) ^b	0	0	0	0
Perda pós-implantação (%) ^b	0	0	0	7,692

Índice de implantação (nº total de sítios de implantação/nº total de corpos lúteos x 100), índice de reabsorção (nº total de sítios de reabsorção/nº total de sítios de implantações x 100), taxa de perda pré-implantação (nº de corpos lúteos - nº de implantações viáveis/nº de corpos lúteos x 100) taxa de perda pós-implantação (nº de implantações - nº de fetos vivos/nº de implantações x 100). Os valores são expressos como média ± E.P.M.^a ou mediana^b, (n = 7-9/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett, $p < 0,05$).

Tabela 14 - Parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas por via oral com extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea* (ESvLf), durante o período de organogênese (6º ao 15º dia de prenhez)

Parâmetros Reprodutivos	Controle (NaCl 0,9%)	ESvLf (100 mg/kg)	ESvLf (500 mg/kg)	ESvLf (1000 mg/kg)
Ratas Prenhes	9	9	8	10
Ganho de massa corporal no período de pré-implantação (g) ^a	26,33 ± 2,68	24,56 ± 2,51	31,50 ± 0,98	20,10 ± 3,13
Ganho de massa corporal no período de prenhez (g) ^a	102,00 ± 7,88	117,30 ± 19,47	121,10 ± 3,02	93,90 ± 11,41
Número de fetos vivos	84	85	88	89
Número de fetos mortos	0	0	0	5
Relação fetos/rata ^a	9,33 ± 0,81	9,44 ± 0,64	11,00 ± 0,62	9,40 ± 1,04
Massa dos fetos (g) ^a	4,87 ± 0,05	4,87 ± 0,10	5,27 ± 0,05	4,85 ± 0,07
Massa total das placentas (g) ^a	5,71 ± 0,43	6,14 ± 0,40	6,36 ± 0,31	5,19 ± 0,52
Massa dos ovários (mg/100 g) ^a	21,71 ± 0,99	25,98 ± 1,08	19,85 ± 1,08	21,39 ± 1,42
Número de sítios de implantação	87	96	94	96
Número de sítios de reabsorção	3	10	2	2
Números de corpos lúteos ^a	10,67 ± 0,23	11,11 ± 0,48	12,13 ± 0,51	11,40 ± 0,94
Índice de implantação (%) ^b	100	100	100	95,83
Índice de reabsorção (%) ^b	0	10	0	0
Perda pré-implantação (%) ^b	0	0	0	4,165
Perda pós-implantação (%) ^b	0	10	0	0

Índice de implantação (nº total de sítios de implantação/nº total de corpos lúteos x 100), índice de reabsorção (nº total de sítios de reabsorção/nº total de sítios de implantações x 100), taxa de perda pré-implantação (nº de corpos lúteos - nº de implantações viáveis/nº de corpos lúteos x 100) taxa de perda pós-implantação (nº de implantações - nº de fetos vivos/nº de implantações x 100). Os valores são expressos como média ± E.P.M.^a ou mediana^b, (n = 8-10/grupo).

A progesterona, principal hormônio na manutenção da gravidez, é produzida no corpo lúteo, o elemento mais notável do ovário (KATO; MORISHIGE; ROTCHILD, 1979). O volume do corpo lúteo aumenta à medida que a gravidez avança, devido a maior produção de progesterona (WAYNFORTH, 1971). A massa dos ovários e o número de corpos lúteos não foram alteradas com a administração do ESvLf nos períodos de pré-implantação e organogênese.

O crescimento e o desenvolvimento de fetos normais dependem de uma interação complexa entre fatores genéticos, endócrinos, imunológicos, nutricionais e vasculares. A glicose necessária para o metabolismo fetal atinge o feto através da placenta, sendo extremamente dependente da glicose materna, uma vez que as enzimas necessárias para a gliconeogênese estão presentes no feto em baixas concentrações (CAMPBELL, 1976).

A placenta tem apenas 2-3% de glicogênio, tornando-a dependente do fornecimento de nutrientes, como aminoácidos e carboidratos para seu desenvolvimento e manutenção (CATALANO; DRAGO; AMINI, 1995). A análise da massa dos ovários, número de corpos lúteos e massa das placentas nos dois períodos gestacionais avaliados, permite inferir uma relação de equilíbrio entre progenitora x fetos dos grupos controle e tratados com ESvLf (100, 500 e 1000 mg/kg).

5.8.2 Teratologia

5.8.2.1 Análise das anomalias e/ou malformações externas

Assim como as progenitoras foram avaliadas quanto à possíveis sinais de toxicidade materna nos dois períodos de prenhez, os fetos foram examinados externamente segundo os critérios determinados por Wilson (1965), com análise minuciosa dos olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e cauda.

Foram avaliados 682 fetos no total, 331 fetos correspondente as progenitoras que receberam o ESvLf no período de pré-implantação e 351 fetos correspondente as progenitoras que receberam o ESvLf no período da organogênese. No período de pré-implantação, os fetos não apresentaram má-formações externas. No entanto, o ESvLf (1000 mg/kg) comprometeu o crescimento fetal e causou má-formações externas devido à agenesia e micrognatia de mandíbula (Figura 33).

Figura 33 - Fotografias apresentam o comprometimento fetal com a presença de micrognatia e falha no desenvolvimento e crescimento dos fetos de progenitoras que receberam ESvLf (1000 mg/kg) no período da organogênese, em comparação aos fetos do grupo controle (C)



5.8.2.2 Análise das anomalias e/ou malformações internas

Segundo Brent *et al.* (1993), a organogênese corresponde ao período de maior susceptibilidade as malformações.

5.8.2.2.1 Análise visceral no período de organogênese

Foram realizados cortes e dissecação em 42 fetos do grupo controle, 43 fetos das progenitoras que receberam ESvLf (100 mg/kg), 44 fetos das progenitoras que receberam ESvLf (500 mg/kg) e 44 fetos das progenitoras que receberam ESvLf (1000 mg/kg). Os resultados mostraram que a exposição ao ESvLf nas doses avaliadas durante o período de organogênese não provocou alterações viscerais quando comparados ao grupo controle.

5.8.2.2.2 Análise esquelética no período de organogênese

Na análise diferencial das anomalias e má-formações esqueléticas, os fetos foram analisados quanto ao número e a morfologia dos ossos. A análise quantitativa dos pontos de ossificação fetal, está associada a taxa de crescimento do feto (CARNEY; KIMMEL, 2007). A toxicidade materna pode interferir diretamente no peso fetal, entretanto esse parâmetro não é o mais indicado em estudos de desenvolvimento fetal, uma vez que ele pode variar dependendo do tamanho da ninhada. Os valores referentes aos pontos de ossificação dos fetos das ratas tratadas com o ESvLf (100, 500 e 1000 mg/kg) não foram diferentes dos fetos do grupo controle e encontravam-se dentro dos valores de referência para a espécie. (Tabela 15). Entretanto a presença de manúbrio dividido e agenesia do último centro esternal nos fetos das progenitoras que receberam ESvLf (1000 mg/kg) foi significativa estatisticamente.

Tabela 15 - Avaliação dos pontos de ossificação da prole de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia), por via oral, com o extrato seco das vagens de *L. ferrea*, ESvLf (100, 500 e 1000 mg/kg)

Malformações esqueléticas	Controle (NaCl 0,9%)	ESvLf (100 mg/kg)	ESvLf (500 mg/kg)	ESvLf (1000 mg/kg)
Manúbrio repartido	0/84 (0%)	4/81 (4,9%)	0/88 (0%)	12/82 (14,6%)*
2º e 3º centros esternais com ossificação incompleta	0/84 (0%)	1/84 (1,2%)	0/88 (0%)	0/94 (0%)
3º e 4º centros esternais com ossificação incompleta	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	1/93 (1,1%)
Agenesia do último centro esternal	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	3/91 (3,3%)*
Manúbrio, centros esternais e processo xifóide com ossificações incompletas	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	1/93 (1,1%)
Afundamento do crânio	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	2/92 (2,2%)
Agenesia de mandíbula	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	1/93 (1,1%)
Mandíbula micrognática	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	1/93 (1,1%)
Agenesia de falanges distais e proximais em patas anteriores	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	2/92 (2,2%)
Agenesia de falanges distais e proximais em patas posteriores	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	2/92 (2,2%)
Ossificação incompleta da 6ª vértebra lombar e das vértebras sacrais	0/84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	2/92 (2,2%)
Presença de apenas dois ossos caudais	0,84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	1/93 (1,1%)
Agenesia de ossos caudais	0,84 (0%)	0/85 (0%)	0/88 (0%)	2/92 (2,2%)

Os valores representam uma amostra de 84 a 94 fetos. Estatisticamente diferente do grupo controle (qui- quadrado; * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0005$).

6 CONCLUSÕES

O extrato seco das vagens de *Libidibia ferrea*:

- Apresenta como compostos majoritários taninos hidrolisáveis e compostos fenólicos;
- Possui atividade antioxidante *in vitro*, pelos métodos ABTS, DPPH, AAT e atividade de eliminação de radicais superóxidos.
- Apresenta atividade gastroprotetora frente aos agentes clássicos de indução de úlceras gástricas aguda;
- Apresenta atividade antioxidante *in vivo*, no tecido gástrico, de animais no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto;
- O mecanismo de ação do ESvLf inicialmente envolve a redução da secreção gástrica e da concentração de H^+ ; a participação de grupamentos sulfidrílicos, mas independe parcialmente do óxido nítrico, e não ocorre pela estimulação da secreção de muco.
- Apresenta atividade cicatrizante na úlcera crônica induzida por ácido acético;
- Apresenta atividade anti – *Helicobacter pylori*;
- Apresenta DL_{50} acima de 2000 mg/kg indicando ser seguro por via oral;
- A administração em doses repetidas do ESvLf causou alterações pontuais hematológicas, bioquímicas e morfológicas;
- A administração do ESvLf no período de pré-implantação e organogênese não interferiu na capacidade de reprodução de ratas Wistar, e na implantação dos blastocistos no útero. ESvLf (1000 mg/kg) apresentou potencial embriofetotóxico.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M. E.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A. *et al.* Gastric mucosal integrity: Gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology**, v. 95, n. 1-6, p. 105-127, 2001.
- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M. *et al.* HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179–191, 2015.
- A-C. ROSAM, WALLACE, J. L.; WHITTLE, B. J. R. Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach. **Nature**, v. 319, n. 6048, p. 54-56, 1986.
- ADINORTEY, M. B.; ANSAH, C.; GALYUON, I. *et al.* *In vivo* models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agentes. **Ulcers**, vol. 2013, Article ID 796405, 12 pages, 2013.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K. *et al.* Pharmacological controlo f gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, presente, and future. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 98, p. 109-27, 2003.
- AKANDE, K. E.; DOMA, U. D.; AGU, H. O. *et al.* Major antinutrients found in plant protein sources: their effect on nutrition. **Pakistan Journal of Nutrition**, n. 9, p. 827-832, 2010.
- ALIVERTI, V.; BONANOMI, L.; GIAVINI, E. *et al.* The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, n. 2, p. 237-242, 1979.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 288, n. 1, p. 1–19, 2005.
- ALMASAUDI, S. B.; EL-SHITANY, N. A.; ABBAS, A. T. *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory, and antiulcer potential of manuka honey against gastric ulcer in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, Article ID 3643824, 10 pages, 2016.
- ALMEIDA, C. L. F.; BRITO, S. A.; SANTANA, T. I. *et al.* *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.1170, Article ID 6593073, 14 pages, 2017.
- ALMEIDA, E. R.; MELO, A. M.; XAVIER, H. Toxicological evaluations of the hidroalcohol extract oh the dry leaves of *Peumus boldus* and *boldine* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 99-102, 2000.
- ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 53-60, 2000.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, P. J. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*. v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALY, A.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1704, p. 1 - 10, 2004.

ALZUGARAY, D. Plantas que Curam. Editora Três. São Paulo, 1983.

ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C-A. *et al.* Effect of Mouriri pusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 431-441, 2006.

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia - GESEF, 2ª versão, 2013.

ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A. *et al.* Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E. *et al.* Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v. 69, n. 10, p. 905-909, 2003.

ASSI, A.; NASSER, H. An *in vitro* and *in vivo* study of some biological and biochemical effects of *Sistrurus Malarius Barbouri* venom. **Toxicology**, v. 137, n. 2, p. 81-94, 1999.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Med**, v. 60, n. 2, p. 118-120, 1994.

BAGCHI, D.; CARRYL, O. R.; TRAN, M. X. *et al.* Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. **Journal of Applied Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 3-13, 1998.

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

BANSAL, V. K.; GOYAL, S. K.; GOSWAMI, D. S. *et al.* Herbal approach to peptic ulcer disease-review. **J Biosci Tech**, v. 1, n. 1, p. 52-58, 2009.

BARNES, D. G.; DOURSON, M. Reference dose: description and use in health risk assessments. **Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 471-486, 1988.

BARRETT, K. E. Fisiologia gastrintestinal. 2ª edição, 321p., AMGH Editora Ltda., 2015.

BARROS, A. O.; SOUZA, R. S., ARANHA, E. S. P. *et al.* Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruit extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, p. 71-76, 2014.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. Avaliação toxicológica: Fundamentos de Toxicologia, São Paulo: Atheneu, 70 p. 1996.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.15, p. 63-72, 2004.

- BAYDAR, N. G.; OZKAN, G.; SAGDIC, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, n. 5, p. 335-339, 2004.
- BEALES, I. L. P. Gastrin and interleukin-1b stimulate growth factor secretion from cultured rabbit gastric parietal cells. **Life Sciences**, v. 75, n. 25, p. 2983 - 95, 2004.
- BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: H. S. Spinosa; S. L. Górniak & M. M. Bernardi. Farmacologia aplicada a medicina veterinária, p. 566-574, 1999.
- BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIACK, S.L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 807-816, 2006.
- BERTLEFF, M. J. O. E.; LANGE, J. F. Perforated peptic ulcer disease: A review of history and treatment. **Digestive Surgery**, v. 27, n. 3, p. 161-169, 2010.
- BESERRA, A. M. S. S.; CALEGARI, SOUZA, M. C. *et al.* Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6957-6965, 2011.
- BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S. *et al.* Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014.
- BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; KOHN, L. K. *et al.* Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from Mikania laevigata Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1, p. 72-77, 2005.
- BOELSTERLI, U. A. Animal models of human disease in drug safety assessment. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 28, n. 3, p.109-121, 2003.
- BORZELLECA, J. F. A proposed model for safety assessment of macronutrient substitutes. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 15-18, 1996.
- BRAGA, M. P.; DA SILVA, C. B.; ADAMS, A. I. H. Inibidores da bomba de prótons: Revisão e análise farmacoeconômica. **Revista Saúde (Santa Maria)**, v.37, n.2, p. 19-32, 2011.
- BRAGANCA, L. A. R. Plantas Medicinais Antidiabéticas. Editora da Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília, DF, 2015.
- BRASSEUR & ANGENOT. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate d'aminoethanol -PEG 400. **Journal Chromatography**, v. 351, p.351-355. 1986.

- BRENT, R. L.; GORDON, W. E.; BENNETT, W. R. *et al.* Reproductive and teratologic effects of electromagnetic fields. **Reproductive Toxicology**, v. 7, p. 535-580, 1993.
- BRITO, S. A.; ALMEIDA, C. L. F.; SANTANA, T. I. *et al.* Antiulcer activity and potential mechanism of action of the leaves of *Spondias mombin* L. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, Article ID 1731459, 20 pages, 2018.
- BROLIO, M. P.; AMBROSIO, C. E.; FRANCIOLLI, A. R. *et al.* A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n.4, p. 222-232, 2010.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman, v. 12. AMGH Editora, 2012.
- CALDAS, G. F. R., LIMEIRA, M. M. F., ARAÚJO, A. V. *et al.* Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1,8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 297-306, 2016.
- CALDAS, G. F. R.; COSTA, I. M. A.; SILVA, J. B. R. *et al.* Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, pp. 886-892, 2011.
- CALDAS, G. F. R.; OLIVEIRA, A. R. S.; ARAÚJO, A. V. *et al.* Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil of *Hyptis martiusii* Benth (Lamiaceae). **PloS one**, v. 9, n. 1, 2014.
- CAMPBELL, S. Fetal Physiology and Medicine. W.B. Saunders Company, p. 27-301, 1976.
- CARMONA, A.; BORGUDD, L.; BORGES, G. *et al.* Effect of black bean tannins on in vitro carbohydrate digestion and absorption. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 8, p. 445-450, 1996.
- CARNEY, E. W.; KIMMEL, C. A. Interpretation of skeletal variations for human risk assessment: delayed ossification and wavy ribs. **Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 6, p. 473-496, 2007.
- CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C. *et al.* Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-178, 1996.
- CASTRO, J. A. Toxicología básica: mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.27, n. 2, p. 197-206, 1993.
- CATALANO, P. M.; DRAGO, N. M.; AMINI, S. B. Maternal carbohydrate metabolism and its relationship to fetal growth and body composition. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, p. 1464-1470, 1995.
- CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S. *et al.* Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 586591, 2009.
- CHANDRANATHATH, S. I.; BASTAKI, S. M. A.; SINGH, J. Comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD- 136450 on acidified ethanol- and indomethacin-

induced gastric lesions in the rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 3, p. 173-180, 2002.

CHANG, C. H.; HSIEH, C. L.; WANG, H. E. *et al.* Unique bioactive polyphenolic profile of guava (*Psidium guajava*) budding leaf tea is related to plant biochemistry of budding leaves in early dawn. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 944-954, 2013.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEI, C-I. *et al.* Tannins and human health: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1118-1125, 2000.

Coles, E. H. Patologia clínica veterinária. Editora Manole, 1984.

COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; VANDENBERGH, J. G. Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. **Female reproductive toxicology**, p. 45-46, 1993.

CORNE, S. J.; MORRISSEY, S. M.; WOODS, R. J. Proceedings: a method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **Journal of Physiology**, v. 242, n. 2, p. 116-117, 1974.

CÔRREA, P. M. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 687 p. 1984.

COSTA-SILVA, J. H., LIMA, C. R., SILVA, E. J. R. *et al.* Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal Ethnopharmacology**, v. 116, p. 495-500, 2008.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R. *et al.* Estudo toxicológico reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em ratas Wistar. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 3. p. 425-428, 2006.

CUMMINGS, A. M. Toxicological mechanisms of implantation failure. **Fundamental Applied Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 571-579, 1990.

CUNHA, L. C. Ç.; AZEREDO, F. S. Ç.; MENDONÇA, A. C. V. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p. 403-11, 2009.

CUNHA, L. C. Ç.; AZEREDO, F. S. Ç.; MENDONÇA, A. C. V. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p. 403-11, 2009.

DA SILVA, M. F.; CARREIRA, L. M. M.; TAVARES, A. S. *et al.* As leguminosas da Amazônia brasileira- lista prévia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 2, n. 1, p. 193-237, 1988.

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract *in vitro*, **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 219-224. 2004.

DE GIACOMO C.; FIOCCA, R. V. L.; LICARDI, G. *et al.* Omeprazole treatment of severe peptic disease associated with antil G cell hyperfunction and hyperpepsinogenemia I in an infant. **J Pediatr**, v. 177, p. 989-993, 1990.

DE JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; GOMES, I. F. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3203-3228, 2012.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J. & PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, n. 3, p. 265-267, 1969.

DO RIO, Ricardo Gomide Woisky. Métodos de controle químico de amostras de própolis. São Paulo, SP. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 1996.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 337-390, 1944.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

EVANGELISTA, S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 23, p. 2977-84, 2006.

FAN, T. Y.; FENG, Q. Q.; JIA, C. R. *et al.* Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. **World Journal Gastroenterology**, v. 11, n. 8, p. 1204-1209, 2005.

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

FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 345-353, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 140-150, 2015.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS S. P.; CASATI, P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 222, Article ID 10.3389, 2012.

FISCHER, U. A.; CARLE R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 127, p. 807-821, 2011.

FISHBEIN, M. H.; MINER, M.; MOGREN, C. *et al.* The spectrum of fatty liver in obese children and the relationship of serum aminotransferases to severity of steatosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 36, p. 54-61, 2003.

FLORIO, J. C.; SOUSA, A. B. S. Farmacocinética. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIACK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 29-48, 2006.

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

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S. *et al.* Biological activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) LP queiroz pod preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, Article ID 514134, 7 pages, 2012.

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

GAZZIERI, D.; TREVISANI, M.; SPRINGER, J. *et al.* Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 581- 589, 2007.

GHANI, M. A.; BARRIL, C.; BEDGOOD JR, D. R. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, v. 230, p. 195-207, 2017.

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

GRAY, L. E.; OTSBI, J.; KELCE, W. R. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v.45, n.4, p. 425-437, 2004.

GUERRA, A. C. V. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A. *et al.* *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 696-706, 2017.

HALLAS, J.; DALL, M.; ANDRIES, A. *et al.* Use of single and combined antithrombotic therapy and risk of serious upper gastrointestinal bleeding: population based case-control study. **BMJ**, v. 169, p.1577–1579, 2006.

HAMILTON, W. J. Tratado de anatomia humana. 2. ed. Rio de Janeiro: 1982.

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

HASSAN, S. K.; EL-SAMMAD, N. M.; MOUSA, A. M. *et al.* Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 6, p. 462-471, 2015.

HAYES, N. A.; FOREMAN, J. C. The activity of compounds extracted from feverfew on histamine release from rat mast cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 466-470, 1987.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

- HIRAISHI, H.; SHIMADA, T.; TERANO, A. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of NSAID-induced gastric mucosal damage. **Journal of Gastroenterology**, v. 35, n. 7, p. 567-569, 2000.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A.B.A. *et al.* Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 406-409, 2009.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BIGHETTI, E. J. B. *et al.* Effects of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. On gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. **Phytomedicine**, v. 9, p. 523-529, 2002.
- HOLZER, P. Neural emergency system in the stomach. **Gastroenterology**, v. 114, p. 823-39, 1998.
- HOLZER, P. Neural regulation of gastrointestinal blood flow. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 4th ed. New York: Academic Press, p. 817-839, 2006.
- 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 gastresofágico. In: Goodman, Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2005.
- HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidante capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.
- HUNT, R. H. Review article: the unmet needs in delayed-release proton-pump inhibitor therapy in 2005. **Alimentary Pharmacology Therapy**, v. 22 (Suppl. 3), p. 10-19, 2005.
- IINO, T.; TASHIMA, K.; UMEDA, M. *et al.* Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. **Life Sciences**, v. 70, n. 10, p. 1139-1150, 2002.
- IZZO, A. A.; DI CARLO, G.; MASCOLO, N. *et al.* Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 3, p. 179-181, 1994.
- JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J. *et al.* Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.
- JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M. *et al.* Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.
- JOZEFCAZAK, M.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J. *et al.* Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3145-3175, 2012.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica, Texto e Atlas*. 12^a edição, 2013.
- KALAYCI, M.; KOCDOR, M. A.; KULOGLU, T. *et al.* Comparison of the therapeutic effects of sildenafil citrate, heparin and neuropeptides in a rat model of acetic acid-induced gastric ulcer. **Life Sciences**, v. 186, p. 102-110, 2017.
- KANGWAN, N.; PARK, J. M.; KIM, E. H. *et al.* Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 5, n. 1, p. 40-47, 2014.

- KATO, H.; MORISHIGE, W. K.; ROTCHILD, I. A. Quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteum activity in pregnant rat. **Endocrinology**, v. 105, p. 846-850, 1979.
- KAUR, R.; ARORA, S.; SINGH, B. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7692-7698, 2008.
- KEATING, Elisa Oliveira Braga. Transport of bioactive substances in the human placenta. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade do Porto, 2007.
- KHAN, M. R.; AHMED, D. Protective effects of *Digera muricata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. **Food and Chemical Toxicology**, n. 47, p. 1393-1399, 2009.
- KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. A.; DOULL, J. Casarett and Doull's: toxicology the basic science of poisons, 5 ed. New York: McGraw Hill, 1996.
- KOBAYASHI, Y. T. S.; ALMEIDA, V. T.; BANDEIRA, T. *et al.* Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34-40, 2015.
- KOPIC, S.; GEIBEL, J. Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health. **American Physiological Society**, v. 93, p. 189-268, 2013.
- KROMER W. Similarities and differences in the properties of substituted benzimidazoles: a comparison between pantoprazole and related compounds. **Digestion**, v. 56, p. 443-54, 1995.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.
- KWIECIEŃ, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 39-50, 2002.
- LACERDA NETO, L. J.; RAMOS, A. G. B.; SALES, V. S. *et al.* Gastroprotective and ulcer healing effects of hydroethanolic extract of leaves of *Caryocar coriaceum*: Mechanisms involved in the gastroprotective activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 261, p. 56-62, 2017.
- LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41-60, 2008.
- LANAS, A.; CHAN, F. K. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10094, p. 613-624, 2017.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. (org) Farmacognosia da planta ao medicamento. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 181-196, 2000.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. (org) Farmacognosia da planta ao medicamento. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2007.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. *et al.* Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. CYTED/CNPq, 2002.

LAU, J. Y.; SUNG, J.; HILL, C. *et al.* Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality. **Digestion**, v. 84, n. 2, p. 102-113, 2011.

LEE, S-J.; LEE, I-S.; MAR, W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose in murine macrophage cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 10, p. 832-839, 2003.

LEWIS, D. A.; HANSON, P. J.; Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 201-230, 1991.

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

LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P. *et al.* Fabaceae. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=A1894D23CF3B63472044C50FB8F68440#CondicaoTaxonCP> (acesso em 16.11.2017).

LIMA, S. M. A., ARAÚJO, L. C. C., SITÔNIO, M. M. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum. 2002. 162p.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. v. 2, 2ª ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. 7. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014.

LUCINDA, L. M. F.; ROCHA, C. B.; REBOREDO, M. M. *et al.* Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 4, p. 907-914, 2010.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. New York, USA, 354 p. 1970.

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

- MAHADEVAN, V. Anatomy of the stomach. **Surgery**, v. 35, n. 11, p. 608-611, 2017.
- MANGAN, J. L. Nutritional effects of tannins in animal feeds. **Nutrition Research Reviews**, v. 1, n. 1, p. 209-231, 1988.
- MANJEGOWDA, S. B.; RAJAGOPAL, H. M.; DHARMESH, S. M. Polysaccharide of Black cumin (*Nigella sativa*) modulates molecular signaling cascade of gastric ulcer pathogenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 823-836, 2017.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4 A, p. 609-614, 2002.
- MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press. London, UK, 113 p. 1982.
- MARNETT, L. J. Lipid peroxidation–DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, p. 83-95, 1999.
- MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.
- MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais. Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária. 2007. 349 p.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 27-32, 1999.
- MATTHEWS, G. M.; BUTLER, R. N. Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: A review of the role of glutathione and the oxidative pentose pathway. **Helicobacter**, v. 10, n. 4, p. 298-306, 2005.
- McRAE, J. M.; KENNEDY, J. A. Wine and grape tannin interaction with salivary protein and their impact on astringency: a review of current research. **Molecules**, n. 3, p. 2358-2364, 2011.
- MENEZES, I. A. C.; MOREIRA, I. J. A.; CARVALHO, A. A. *et al.* Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 41-47, 2007.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. C. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.
- MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 939-945, 1983.
- MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E. *et al.* Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 217–252, 2005.

- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. *Embriologia Clínica*. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 536 p. 2008.
- MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F. *et al.* Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979-1012, 2009.
- MOURA, Lilian Maria. Compostos bioativos em frutas cítricas: quantificação, avaliação da atividade antioxidante, parâmetros de cor e efeito da pasteurização. Araraquara, SP. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, 2010.
- MULLEN, W.; YOKOTA, T.; LEAN, M. E. J. *et al.* Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSn. **Phytochemistry**, v. 64, p. 617–624, 2003.
- MURAKAMI, S.; ISOBE, Y.; KIJIMA, H. *et al.* Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase and acid secretion by ellagic acid. **Planta Medica**, v. 57, n. 4, p. 305-308, 1991.
- MUTHURAMAN, A.; SOOD, S. Antisecretory, antioxidative and antiapoptotic effects of montelukast on pyloric ligation and water immersion stress induced peptic ulcer in rat. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 83, n. 1, p. 55-60, 2010.
- NAIK, S. R.; PANDA, V. S. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Ginkgo biloba* phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. **Liver International**, n. 27, p. 393-399, 2007.
- NAKAMURA, E. S.; FUMIYA, K.; MUNEHISA, A. *et al.* Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119-124, 2002.
- NAKAMURA, M. U.; KULAY JUNIOR, L.; PASQUALE, L. Uso de fármacos na gravidez: benefício e custo. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n 1, p.14, 2008.
- NASCIMENTO, R. F.; SALES, I. R. P.; FORMIGA, R. O. *et al.* Review: Activity of alkaloids on peptic ulcer: What’s new? **Molecules**, v. 20, p. 929-950, 2015.
- NAVA, A.; ROMAN, S. S. Efeito do Antimoniato de Meglumina durante o período fetal sobre o desenvolvimento físico da prole em camundongos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n.1. p. 37-42, 2010.
- OECD (Organisation of Economic for Cooperation and Development). Guideline for Testing of Chemical: Acute Oral Toxicity - Up–and–Down Procedure. n. 425, Paris: OECD, 2001.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Draft OECD guideline for the testing of chemicals. Guidance no. 421. Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, 2015.
- OECD. Guideline for Testing of Chemicals: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents Method. Guideline: 407. Paris, 2008.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D. *et al.* Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 56-67, 2000.

- PACIFICO L, CELESTRE M, ANANIA C. *et al.* MRI and ultrasound for hepatic fat quantification: relationships to clinical and metabolic characteristics of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **Acta Paediatrica**, v. 96, p. 542-547, 2007.
- PARKMAN, H. P.; URBAIN, J-L. C.; KNIGHT, L. C. *et al.* Effect of gastric acid suppressants on human gastric motility. **Gut**, v. 42, n. 2, p. 243-250, 1998.
- PARMAR, N. S.; GHOSH, M. N. Gastric anti-ulcer activity of (+)-cyanidanol-3, a histidine decarboxylase inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 25-32, 1981.
- PEREIRA, L. P.; SILVA, R. O.; BRINGEL, P. H. S. F. *et al.* Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal Ethnopharmacology**, v. 139, p. 642-648, 2012.
- PÉREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T. PUEYO, E. *et al.* Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish Honeyys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 360-365, 2007.
- PETERS, V. M.; SOUZA, S. O.; CARVALHO J. C. T. *et al.* Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. **Boletín latino americano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas**, v. 7, n. 5, p. 268-272, 2008.
- PICKLER, T. B.; LOPES, K. P.; MAGALHÃES, S. A. *et al.* Effect of *Libidibia ferrea* bark and seed in maternal reproductive and biochemical outcomes and fetal anomaly in rats. **Birth Defects Research**. v. 111, n. 13, p.863-871, 2019.
- PICKLER, Thaisa Borim. Ensaios pré-clínicos da exposição materna à *Caesalpinia ferrea*. Sorocaba, SP. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de Sorocaba, 2015.
- PORT'S, P. S.; CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T. *et al.* The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 875-881, 2013.
- PORTH, C. M., KUNERT, M. P. Fisiopatologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- PRICE, E. A.; SCHRIER, S. L. Hemoglobinopathies and hemolytic anemias. **American College of Physicians**, p. 1-34, 2008.
- PRIETO P., PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E, **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.
- RAFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M. A. *et al.* Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 25-34, 1990.
- RAO, R.; BAKER, R. D.; BAKER, S. S. Inhibition of oxidant-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in Caco-2 cell monolayers by epidermal growth factor. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 6, p. 685-695, 1999.

- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. *et al.* Antioxidant activity applying in the improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol & Medic**, v.26, p. 1231-1237, 1999.
- REBAYA, A.; BELGHITH, S. I.; BAGHDIKIAN, B. *et al.* Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 1, p. 52-57, 2014.
- REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers Natural antiulcerogenic antioxidant compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523–534, 2002.
- RHIOUANI H, EL-HILALY J, ZAFAR HI *et al.* Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 378-386, 2008.
- ROBERT, A.; J. E. NEZAMIS.; LANCASTER, C. *et al.* Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433-443, 1979.
- ROBERTS, E. A. H., CARTWRIGHT, R. A, OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal Science of Food and Agriculture**, v.8, p. 72-80. 1957.
- RODRIGUES, Natalie Emanuelle Ribeiro. Avaliação da toxicidade aguda, subaguda e reprodutiva do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* L. Recife, PE. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 2017
- ROULEAU, A.; HERON, A.; COCHOIS, V. *et al.* Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, p. 1331 -1338, 2004.
- ROZZA, L.; CESAR, D. A. S.; PIERONI, L. G. *et al.* Antiulcerogenic activity and toxicity of *Bauhinia holophylla* hydroalcoholic extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, Article ID 439506, 9 pages, 2015.
- RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; AMORNLERDPISON, D. *et al.* Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 120-122, 2005.
- SAIRAM, K.; RAO, CH. V.; DORA B. M. *et al.* Antiulceratogenic effect of methanolic extract of *Emblica officinallis*: experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p. 1-9, 2002.
- SAKUNPAK, A.; PANICHAYUPAKARANANT, P. “Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad-spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone”. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 826-831, 2012.
- SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S.; DIAS, C. S. *et al.* In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289-294, 2009.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTANA, J. A. S.; FERREIRA, L. S.; COELHO, R. R. P. *et al.* Tecnologias de baixo custo para superação de dormência em sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* Mart. ex. Tul. (pau-ferro). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 1, p. 225-229, 2011.

SANTOS, F. A.; SILVA, R. M.; TOME, A. R. *et al.* L. 1,8-cineole protects against liver failure in an in-vivo murine model of endotoxemic shock. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 505–511, 2001.

SANTOS, P. M. L.; JAPP, A. S.; LIMA, L. G. *et al.* Antioxidant activity from the leaf extracts of *Jacaranda puberula* Cham., Bignoniaceae, a Brazilian medicinal plant used for blood depuration. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 147-153, 2010.

SANTOS, S. A. O.; VILLAVERDEA, J. J.; SOUSA, A. F. *et al.* Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 262–269, 2013.

SARAVANAN G, PONMURUGAN P. S-allylcysteine improves streptozotocin-induced alterations of blood glucose, liver cytochrome P450 2E1, plasma antioxidant system, and adipocytes hormones in diabetic rats. **Int J Endocrinol Metab**, v. 11, n. 4, 2013.

SCHMIDT, C. A.; MURILLO, R.; HEINZMANN, B. *et al.* Structural and conformational analysis of proanthocyanidins from *Parapiptadenia rigida* and their wound-healing properties. **Journal of natural products**, v. 74, n. 6, p. 1427- 1436, 2011.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v. 10, n. 10, p. 308-13, 2004.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, p. 595-601, 2007.

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

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, p. 636-643, 2005.

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

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

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

SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. Anatomia e Fisiologia. Loures, Lusociência, 2003.

SELLAMUTHU, P. S; ARULSELVAN, P; KAMALRAJ, S. *et al.* Protective nature of mangiferin on oxidative stress and antioxidant status in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. **ISRN Pharmacology**, ID750109, 10p. 2013.

- SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. S. *et al.* A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.
- SHUKLA, S.; MEHTA, A.; JOHN, J. *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 1848-1851, 2009.
- SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T. *et al.* The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107, p. 50-55, 2008.
- SILVA, A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M. *et al.* Antiviral activities of extracts and phenolic components of two Spondias species against dengue virus. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 406-413, 2011.
- SILVA, H. R.; SILVA, C. C. M.; CALAND NETO, L. B. *et al.*, Chemical constituents of *Cenostigma macrophyllum* stem bark: Occurrence of cholesterol. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.
- SILVA, L. C. N.; SILVA JÚNIOR, C. A.; SOUZA, R. M. *et al.* Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2222-2228, 2011.
- SILVA, L. C. N.; SILVA JÚNIOR, C. A.; SOUZA, R. M. *et al.* Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2222-2228, 2011.
- SINGH, A.; BHAT, T. K.; SHARMA, O. P. Clinical biochemistry of hepatotoxicity. **Journal of Clinical Toxicology**, S4:001. doi: 10.4172/2161-0495, 2011.
- SIVRI, B. Trends in peptic ulcer pharmacotherapy. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 23-31, 2004.
- SMITH, T.; NCUBE, S.; DUBE, J. S. Dry season supplementation with polyethylene glycol (PEG) or a digestive modifier (Browse plus). **Journal of the Zimbabwe Society for Animal Production**. v. 7, p. 181-186, 1995.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.
- SOLL, A. H.; WALSH, J. H. Regulation of gastric acid secretion. **Annu Rev Physiol**, v. 41, n. 1, p. 35-53, 1979.
- SOONG, Y-Y.; BARLOW, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Magnifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 524-530, 2006.
- SOUZA, C. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. Farmacognosia: coletânea científica. Ouro Preto: UFOP, 372 p., 2012.

SOUZA, L. A. G. Leguminosas da Amazônia: Jucá – *Caesalpineia ferrea* Mart. Manaus: INPA, 2007.

STAPLES, R. E.; SCHNELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technol**, v.39, p.61-63, 1964.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y. *et al.* Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679-693, 2007.

SZABO, S.; TRIER, J. S.; BROWN, A. *et al.* A quantitative method for assessing the extent of experimental gastric erosions and ulcers. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 13, n. 1, p. 59-56, 1985.

TAHRAOUI, A.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSI, B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.132, p. 48-55, 2010.

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

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 24–33, 2005.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: Cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 1, p. 126-132, 2013.

THOMSON, A. B. R., SAUVE, M. D., KASSAM, N. *et al.* Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. **World Journal Gastroenterology**, v. 16, n.19, p. 2323-2330, 2010.

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

TOALDO, I. M.; CRUZ, F. A.; DE LIMA, A. T. *et al.* Bioactive potential of Vitis labrusca L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, v. 173, p. 527–535, 2015.

TOMÁS-MENOR, L.; MORALES-SOTO, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish Cistus species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 313-322, 2013.

TULASSAY, Z.; HERSZÉNYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 99-108, 2010.

UCHÔA, D. A.; OLIVEIRA, W. F.; PEREIRA, A. P. C. *et al.* Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Arruda leaves extracts. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 19, p. 3038-3044, 2015.

UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of ellagic acid and 2-(2, 3, 6-trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid on sorbitol accumulation in vitro and *in vivo*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1584-87, 2004.

VANDERHOFF, M. D.; TAHBOUB, R. M. Proton pump inhibitors: an update. **Clin Pharmacol**, v. 66, p. 273-80, 2002.

VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; BATISTA, T. M. *et al.* Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1533-41, 2011.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

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

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiology Review**, v. 88, n. 4, p. 1547-65, 2008.

WALLACE, J. L.; WHITTLE, B. J. R. Profile of gastrointestinal damage induced by platelet activating factor. **Prostaglandins**, v. 32, n. 1, p. 137-142, 1986.

WAYNFORTH, H. B. Changes in the volume of rat corpus luteum during pregnancy and after surgical interference with the uterus and placenta. **Acta Endocrinologica**, v. 66, p. 296-302, 1971.

WEBSTER, W. S.; FREEMAN, J. A. D. Is this drug safe in pregnancy. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 619-629, 2001.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; EDEN, M. E. V. *et al.* Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 7, p. 577-83, 2002.

WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. Editora Philadelphia: Saunders Company p. 377, 1994.

WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting mal formations in experimental animal. In: Wilson, J. C. Warkany J. Teratology: principles and techniques. University of Chicago Press, p. 262-277, 1965.

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

WOLFE, M. M. Pharmacological principles governing the use of proton pump inhibitors: tailoring therapy to improve GERD outcomes. **Gastroenterol Clin**. v. 32, p. 7-9, 2003.

WYREPKOWSKI, C. C.; DA COSTA, D. L. M. G.; SINHORIN, A. P. *et al.* Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. **Molecules**, v. 19, p. 16039-16057, 2014.

ZHU, A.; KAUNITZ, J. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Gastroenterology Reports**, v.10, p. 548-54, 2008.

ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA Nº 0016/2016



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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

Recife, 16 de março de 2017.

Ofício nº 13/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0016/2016

Certificamos que a proposta intitulada “**Carecterezação fitoquímico e estudo das Estudo das atividade antioxidantes e gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das vagens de Libidibia férrea Var. parvifolia (mart. Extul.) L.P. Queiroz (Leguminosae)**”, registrada com o nº 0016/2016 sob a responsabilidade de Prof.º **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 08/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2016 á 01/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus
Nº de animais	276
Peso/Idade	Machos (310-340g) fêmeos (200-240g) 60 dias
Sexo	Femea e machos
Origem	Biotério de Depto de Fisiologia e Farmacologia

Atenciosamente,


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

ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA Nº 0032/2016



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biotecnologias

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 9351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 16 de março de 2017.

Ofício nº 13/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**

Centro de Biotecnologias

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0032/2016

Certificamos que a proposta intitulada "**Estudo da atividade anti-hiperglicemiante oral e segurança de uso do extrato hidroalcoólico das vagens de *Libidibia ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Leguminosae)**", registrada com o nº 0032/2016 sob a responsabilidade de Prof. **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 08/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2016 à 01/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus
Nº de animais	244
Peso/Idade	Machos (310-340g) e fêmeas (200-240g) 60 dias
Sexo	Fêmeas e machos
Origem	Biotério de Depto de Fisiologia e Farmacologia

Atenciosamente,

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

ANEXO C - CADASTRO DO PROJETO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO



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 A936B85

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: **A936B85**
 Usuário: **Lady Dayane Kalline Travassos dos Prazeres Paixão**
 CPF/CNPJ: **010.666.634-75**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Libidibia ferrea

Título da Atividade: **Caracterização fitoquímica, atividades antioxidante, gastroprotetora e segurança de uso do extrato seco das vagens de Libidibia ferrea (Leguminosae)**

Equipe

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

Data do Cadastro: **07/11/2018 13:40:42**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:42** de **07/11/2018**.



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

ANEXO D - ACEITE DA OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY PARA A PUBLICAÇÃO DO ARTIGO

28/10/2019

Gmail - 1983137: Your manuscript has been accepted



lady dayane kalline travassos dos prazeres <kallinetravassos@gmail.com>

1983137: Your manuscript has been accepted

Pedro Mena <omcl@hindawi.com>

18 de setembro de 2019 03:31

Responder a: revathy.murali@hindawi.com

Para: almir.wanderley@ufpe.br

Cc: kallinetravassos@gmail.com, ticianaragao@yahoo.com.br, samaralvesbritobrito19@gmail.com, cynthialayse@gmail.com, amandanielles@gmail.com, macielfreire.mirella@gmail.com, juhffarias@hotmail.com, leucio_filho@hotmail.com, bolivarpd@hotmail.com, larissa.rolim@univasf.edu.br, brunoveras@hotmail.com, ismaelroch@gmail.com, jacintocosta@hotmail.com, milenabit@gmail.com, rita.goncalves@ufes.br, rodrigo.kitagawa@ufes.br

Dear Dr. Wanderley,

The review process of Research Article 1983137 titled "Antioxidant and Antiulcerogenic Activity of the Dry Extract of Pods of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. (Fabaceae)" by Lady Dayane Kalline Travassos Prazeres, Ticiana Aragão, Samara Brito, Cynthia Layse Ferreira de Almeida, Amanda Silva, Mirella Paula, Juliane Farias, Leucio Vieira, Bolívar Damasceno, Larissa Rolim, Bruno Veras, Ismael Rocha, Jacinto da Costa Silva Neto, Milena Bittencourt, Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves, Rodrigo Rezende Kitagawa and Almir Gonçalves Wanderley submitted to Oxidative Medicine and Cellular Longevity has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/1983137/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file of the final accepted manuscript (Word or TeX/LaTeX).
- 2- PDF file of the final accepted manuscript.
- 3- Editable figure files (each figure in a separate EPS/PostScript/Word file) if any, taking into consideration that TIFF, JPG, JPEG, BMP formats are not editable.

If you have deposited your manuscript on a preprint server (e.g. arXiv, bioRxiv, chemRxiv), now would be a good time to update it with the accepted version. If you have not deposited your manuscript on a preprint server, you are free to do so.

Thank you again for submitting your manuscript to Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Best regards,

Pedro Mena