



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E
MODELAGEM MOLECULAR**

VANEZA RODRIGUES VIEIRA

**ATIVIDADE CITOPROTETORA E CICATRIZANTE DA ESPÉCIE *Conocarpus
erectus L* EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS EM RATOS WISTAR ADULTOS**

**BELÉM-PÁ
2017**

VANEZA RODRIGUES VIEIRA

ATIVIDADE CITOPROTETORA E CICATRIZANTE DA ESPÉCIE *Conocarpus erectus L* EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS EM RATOS WISTAR ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Vanessa Joia de Mello.

**BELÉM-PÁ
2017**

Vieira, Vaneza Rodrigues

Atividade Citoprotetora e Cicatrizante da Espécie *Conocarpus erectus L* em Lesões Gástricas Induzidas em Ratos Wistar Adultos./ Vaneza Rodrigues Vieira -BELEM, 2017.

Orientadora: Prof (a). Dr (a). Vanessa Joia de Mello

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde- Programa de Pós-graduação de Química Medicinal e Modelagem Molecular.

1- Plantas Medicinais 2- *Conocarpus erectus L* 3- Úlcera Gástrica 4- Belém (PA) - I Mello, Vanessa. II Universidade Federal do Pará.

VANEZA RODRIGUES VIEIRA

ATIVIDADE CITOPROTETORA E CICATRIZANTE DA ESPÉCIE *Conocarpus erectus L* EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS EM RATOS WISTAR ADULTOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Vanessa Joia de Mello (Orientadora- UFPA)

Prof. Dra. Márcia Cristina Freitas da Silva (UFPA)

Prof. Dra. Barbarella de Matos Macchi (UFPA)

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal (UFPA)

Este trabalho é dedicado ao meu PAI (In memória), minha FAMÍLIA, assim como toda minha vida, é dedicado a DEUS, pois sem eles não teria concretizado mais este sonho. Obrigado meu SENHOR!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, por todas as oportunidades maravilhosas que ele me proporciona a cada dia e por permitir a conclusão deste trabalho.

À minha **Família** que sempre me apoiou nos momentos difíceis. Aos meus pais, **Maria Benedita Rodrigues e Antônio João F. Vieira** que mesmo você **PAI** não estando aqui perto de mim fisicamente sei que está ao lado de **Deus** muito feliz e orgulhoso pela minha conclusão neste mestrado, vocês que sempre acreditaram em mim e me incentivaram ir em busca de novos conhecimentos e crescimento profissional. As minhas irmãs, **Maria Benedita Vieira, Benedita AntoniaVieira, Maria AntoniaVieira, LuanaVieira e Gleiciane Vieira** pelo amor, compreensão, apoio e incentivos para que eu realizasse este sonho.

À **Profª Dra. Vanessa Joia de Mello** que me aceitou em seu laboratório sem ao menos me conhecer. Por todos esses anos de atenção, ensinamento, orientação, amizade, apoio e pelo exemplo de determinação e competência profissional.

Ao **Prof. Dr. Moises Hamoy** por suas observações e opiniões didáticas, e por ceder seu laboratório para realização deste trabalho.

Às minhas amigas **Laiane Nascimento e Wanessa Aires** obrigada pela amizade e por todos os momentos de ensinamento, ajuda em cada experimento, paciência, ombro amigo, parceria, risadas e piadas durante ao longo desta caminhada.

À equipe do **laboratório de Farmacologia e toxicologia de Produtos Naturais** as amigas **Andria Linhares, Ana Carolina, Jessica Machado e Silvana Lopes** obrigada pela amizade, pela colaboração neste trabalho e por todos os momentos que passamos juntas.

À **Profª Dra. Márcia Freitas** por disponibilizar seu **laboratório de Ciências Aplicadas**, pelos ensinamentos e por aceitar o convite para participar da minha banca de defesa.

À **Profª Dra. Barbarella de Matos Macchi** pela disponibilização do seu **laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular**.

Ào **Profª Dr. Wallace Gomes Leal** pela sua disponibilização em participar da minha banca, e por toda as dicas prestadas para melhorar o desenvolvimento deste trabalho.

Às **Professoras Maria Auxiliadora e Rosineide Martins do laboratório de Processamento de Materiais** pela portas abertas, e a minha amiga **Dona Lia Priante** técnica do laboratório, pelos ensinamentos e ajuda nos cortes histológicos e montagem das laminas.

À minha amiga **Keury Rodrigues**, meu muito obrigada pela companhia nas noites, pelos momentos de descontração com muitas risadas e pela ajuda na conclusão deste trabalho. Nunca vou esquecer de você falando: Te meeeeete!!!

À **Profª Dra. Kelly Guimarães** do **laboratório de Química Analítica** que disponibilizou seu laboratório e ao **Alan Cruz** que ajudou na produção do liofilizado da planta em estudo deste trabalho.

Ao meu cunhado **Cleivaldo Silva** pelo tempo que se disponibilizou para me ajudar na formatação deste trabalho, obrigada pelos momentos de preguiça e muitas risadas.

À **Luana Diniz** minha melhor amiga, que sempre esteve comigo em todos os momentos me apoiando. Obrigada pela verdadeira amizade.

Ao meu querido **Grupo de Oração Universitário (GOU) Maranatá** às minhas amigas **Milena Santos** e **Raquel Souza** e ao meu amigo **José Augusto Quaresma**, pessoas maravilhosas e cheias do amor de Deus, obrigada pelo chamado para servi a Deus, pelas orações e abraços aconchegantes. Agradeço também a **Cristiane Ferreira** que me informou sobre a existênciado GOU na ufpa.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Química Medicinal e Modelagem Molecular** pela atenção concedida sempre que necessário.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação de Química Medicinal e Modelagem Molecular**. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos durante estes anos.

Aos **funcionários** da Secretaria **da Pós-Graduação de Química Medicinal e Modelagem Molecular**, por todos os auxílios e informações prestadas.

À **FAPESPA**, pelo apoio financeiro na concessão da minha bolsa.

À **todos** que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

1. “ E agora, eis o que diz o Senhor, aquele que te criou, Jacó, e te formou, Israel: Nada temas, pois eu te resgato, eu te chamo pelo nome, és meu.

2. Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo. E os rios não te submergirão; se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá.

3. Pois eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, teu salvador. Dou o Egito por teu resgate, a Etiópia e Sabá em compensação.

4. Porque és precioso a meus olhos, porque eu te aprecio e te amo, permuto reinos por ti, entrego nações em troca de ti.

5. Fica, tranquilo, pois estou contigo, do oriente trarei tua raça, e do ocidente eu te reunirei.

6. Devolve-os, direi ao setentrião e ao meio-dia: Não os retenhas! Traze meus filhos das longínquas paragens, e minhas filhas dos confins da terra;

7. Todos aqueles que trazem meu nome, e que criei para minha glória.”

RESUMO

A pesquisa farmacológica têm se voltado ao conhecimento da medicina popular, a fim de estabelecer as bases científicas dos seus efeitos farmacológicos. Entre as diversas fontes naturais utilizadas em nossa região destaca-se a espécie *Conocarpus erectus* L, popularmente conhecida como “mangue botão” pertencente à família Combretaceae. Diferentes partes da planta como folhas, caule, frutos e flores têm descrito sua atividade biológica, dentre estas anticancerígena e antimicrobiana. Relatos etnofarmacológicos obtidos na região de Salinópolis - PA descreveram potencial utilização em distúrbios digestivos. Apesar do grande avanço na terapêutica medicamentosa utilizada nos quadros de úlcera gástrica se faz importante a realização de estudos que possam comprovar sua validação. Este trabalho tem como objetivo verificar a atividade citoprotetora e cicatrizante do liofilizado do chá das cascas obtido por decocto da espécie *Conocarpus erectus* L (LCE) em lesões gástricas agudas e crônicas. Como metodologias para avaliação do efeito citoprotetor foram utilizados indução de lesões agudas por indometacina e etanol, enquanto o efeito cicatrizante foi avaliado por lesões crônicas induzidas cirurgicamente por ácido acético em ratos wistar adultos. A variação do pH intragástrico foi aferida pelo ensaio de ligamento de piloro. Foi avaliada atividade antioxidante do LCE pelo ensaio de DPPH, bem como os níveis de peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS em lesões crônicas induzida por ácido acético à 5% e 10%. Os resultados revelaram atividade citoprotetora do LCE no modelo de indução por indometacina reduzindo o índice de ulceração (IU) nos grupos tratado com LCE em 51,49%, omeprazol em 51,33% e sucralfato em 71,28% quando comparados ao grupo controle. Já no modelo de indução por etanol o grupo tratado com o LCE reduziu a área lesionada em 90,94% e 75,88% no grupo sucralfato, ambos quando comparados ao grupo controle. Já na atividade cicatrizante o grupo tratado com o LCE reduziu as lesões gástrica (5%) em 80,11%, o grupo omeprazol em 52,75% e o grupo sucralfato em 66,33%, já as lesões gástricas (10%) o grupo tratado LCE reduziu 72,11%, o grupo omeprazol 57,47% e o grupo sucralfato 43,77% ($p > 0,05$ Anova, *post test* *Dunnnett's e Turkey's*). O tratamento com o LCE revelou um aumento de 39% sobre o pH intragástrico quanto comparado ao controle ($p > 0,05$ Anova, *post test* *Dunnnett's e Turkey's*) e não apresentou-se estatisticamente diferente do grupo que recebeu omeprazol no modelo de ligadura de piloro. A atividade antioxidante do LCE foi comprovada no ensaio de DPPH, pois o mesmo foi diluído em 10x, 50x e 100x apresentando um percentual de $(67,65 \% \pm 0,52)$, $(73,22 \% \pm 0,17)$ e $(72,70 \% \pm 1,39)$, respectivamente, quando comparado ao antioxidante ácido

ascórbico (AA) usado como padrão que apresentou 33,74% já a concentração remanescente de DPPH encontrada no AA foi de $(92,84 \pm 1,20)$ e nas diluições do LCE foram de 10x $(53,84 \pm 0,60)$, 50x $(47,44 \pm 0,20)$ e 100x $(48,04 \pm 1,60)$ ambos ($p < 0,05$ Anova, *post test Turkey's*). A peroxidação lipídica avaliada nas lesões induzidas no modelo de indução por ácido acético a 5% demonstrou que a média dos níveis de MDA nos grupos nave, controle e tratado LCE foi $(0,492 \pm 0,0849)$, $(1,579 \pm 0,219)$ e $(0,399 \pm 0,092)$, respectivamente, demonstrando que o LCE reduziu a peroxidação lipídica em 74,73% com relação ao grupo controle ($p < 0,05$ Anova, *post test Dunnett's*) não apresentando-se diferente do grupo nave estatisticamente. Já na indução a 10% a média dos níveis de MDA observado nos grupos nave, controle e tratado LCE foi de $0,628 \pm 0,042$, $1,567 \pm 0,234$ e $0,441 \pm 0,12$ respectivamente. O grupo tratado LCE reduziu em 71,85 % a peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$ Anova, *post test Dunnett's*). Estes resultados confirmam o efeito citoprotetor e cicatrizante do LCE sugerindo possíveis mecanismos de ação associados a seu potencial antioxidante bem como uma possível inibição da secreção ácida.

Palavras-chaves: Plantas Medicinais, *Conocarpus erectus* L, úlcera gástrica, efeito citoprotetor e cicatrizante.

ABSTRACT

The pharmacological research has been aimed at the knowledge of regional folk medicine, in order to establish the scientific bases of their respective pharmaceutical products' effectiveness. Among the many natural sources used in our region are the species *Conocarpus erectus* L, popularly known as the "mangrove bud", belonging to the Combretaceae family. Different parts of the plant such as leaves, stems, fruits and flowers have their biological activity studied, among them the anticancer and antimicrobial effects. Ethnopharmacological reports obtained in the region of Salinópolis - PA also described a potential use in digestive disorders. Although a great advance in the drug therapy used in the cases of gastric ulceration has been made, it is important to carry out studies that prove its validity. This work aims to verify the cytoprotective activity and cicatrizing activity of the lyophilizate bark tea obtained by decoction of the species *Conocarpus erectus* L (LCE) in acute and chronic gastric lesions. The methodologies for evaluating the cytoprotective effect were acute lesions induced by indomethacin and ethanol, while the cicatrization effect was evaluated by chronic acetic acid-induced lesions in adult Wistar rats. The intragastric pH variation was measured by the pylorus ligament assay. The lyophilizate's antioxidant activity was evaluated by the DPPH assay, as well as the lipid peroxide levels' that were evaluated by the TBA-RS method in chronic lesions induced by acetic acid 5 and 10%. The results showed cytoprotective activity of LCE by the indomethacin induction model reduced the ulceration index (IU) in the treated group by 51,49%, omeprazole group by 51,33% and sucralfate group by 71,28%, all of them when compared to the controlled group. On the model of ethanol LCE's induction, the area affected was reduced by 90.94%, and in the sucralfate's induction group, by 75.88% when compared with the controlled group. The LCE's healing effect reduced gastric lesions to 5% in 80.11%, while the on omeprazole group to 52.75% and the sucralfate group reduced to 66.33%, whereas in the 10% gastric lesion the LCE group reduced 72.11%, the omeprazole 57.47%, and the sucralfate group 43.77% ($p > 0,05$ Anova, post test Dunnett's and Turkey). The LCE treatment showed an increase of 39% on intragastric pH when compared to control ($p > 0,05$ Anova, post test Dunnett's e Turkey's) and did not statistically showed any different from the omeprazole group by the model of pylorus ligation. The LCE lyophilizate's antioxidant effect was confirmed by the DPPH assay, as it was diluted in 10x, 50x and 100x with a percentage of $67.65\% \pm 0.52$, $73.22\% \pm 0.17$ and $72.70\% \pm 1.39$, respectively, when compared to the ascorbic acid antioxidant of 33,74% (AA) like this (p

<0.05, Anovapost testDunnett). A lipid peroxidation evaluated in the lesions obtained by the 5%-acetic-acid-induction model showed that the average MDA levels in the nave group, controlled group and treated group LCE were 0.492 ± 0.0849 , 1.579 ± 0.219 , and 0.399 ± 0.092 , respectively, showing that the LCE-treated group was able to reduce lipid peroxidation by 74.73% in comparison to the controlled group ($p < 0.05$ Anovapost testDunnett) and it did not statistically differ from the nave group. On the 10%-acetic-acid-model the average level of malonaldehyde in the nave group, controlled group and the LCE-treated group was 0.628 ± 0.042 , 1.567 ± 0.234 and 0.441 ± 0.12 , respectively. The LCE treated group managed to reduce by 71.85% the lipid peroxidation caused by acetic acid induced lesions when compared to the control group ($p < 0.05$ Anovapost testDunnett). These results confirm the cytoprotective and cicatrizing effects of LCE and suggest possible action mechanisms associated with its antioxidant potential, as well as possible acid secretion inhibition.

Key words: Medicinal Plants, *Conocarpus erectus* L, gastric ulcer, cytoprotective and cicatrizing effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécie <i>Conocarpus erectus</i> L	21
Figura 2: Distribuição da espécie <i>Conocarpus erectus</i> L no Sul do Brasil.	22
Figura 3: Regiões anatômica do estômago	23
Figura 4: Histologia da parede gástrica	24
Figura 5: Anatomia funcional da mucosa gástrica	25
Figura 6: Desequilíbrio entre os fatores protetores e agressores da mucosa	32
Figura 7: Maguezal de Salinópolis-Pá, localda coleta do material botânico em 20/04/16.....	37
Figura 8: Exsicata da planta de espécie <i>Conocarpus erectus</i> L, obtida na Embrapa Amazonia Oriental (EMBRAPA).....	37
Figura 9: Etapas de obtenção do LCE	38
Figura 10: Rendimentodo LCE	45
Figura 11: Efeito citoprotetor do LCE, sob úlceras gástricas induzidas por indometacina. Os animais receberam por via subcutânea como indutor de lesão (50 mg/Kg de indometacina), 30 minutos antes da indução o grupo controle n=6 recebeu (água 0,5ml/kg a.n), grupo tratado n=6 (LCE 0,1206 mg/kg a.n), grupo controle positivo n=5 (omeprazol 20mg/kg a.n) e grupo controle positivo n=5 (sucralfato 1g/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de <i>pos test</i> *Dunnett's e #Turkey's)	45
Figura 12: Efeito citoprotetor do LCE, sob lesões agudas induzidas por etanol P.A. Os grupos dos animais receberam etanol PA por via oral como indutor de lesões, 30 minutos antes o grupo controle n=6 recebeu (água 0,5ml/kg a.n), grupo tratado n=6 (LCE 0,1206 mg/kg a.n) e o grupo controle positivo n=6 (sucralfato 1mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de <i>pos test</i> *Dunnett's e #Turkey's).....	46
Figura 13: Efeito cicatrizante do LCE, sob úlceras induzidas por ácido acético a 5%. Os animais foram submetidos a laparotomia para a indução da lesão por ácido acético a 5%. Durante o tratamento de 8 dias os animais do grupo controle n=9 receberam (água 0,5ml/kg a.n), grupo tratado n=8 (LCE 0,1206mg/kg a.n), grupo controle positivo n=8 (omeprazol 20mg/kg a.n) e grupo controle positivo n=8 (sucralfato 1mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de <i>pos test</i> *Dunnett's e #Turkey's).....	47

Figura 14: Efeito cicatrizante do LCE, sob úlceras induzidas por ácido acético a 10% . Os animais foram submetidos a laparotomia para a indução da lesão por ácido acético a 10%. Durante o tratamento de 8 dias os animais do grupo controle n=9 receberam (água 0,5ml/kg a.n), grupo tratado n=8 (LCE0,1206mg/kg a.n), grupo controle positivo n=8 (omeprazol 20mg/kg a.n) e grupo controle positivo n=8 (sucralfato 1mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *pos test *Dunnnett's e #Turkey's*) 48

Figura 15: Imagens das Lesões gástricas induzidas por indometacina (a – grupo controle negativo, b – grupo tratado LCE, c – grupo positivo omeprazol e d – grupo positivo sucralfato). Lesões gástricas induzidas por etanol (e – grupo controle negativo, f – grupo tratado LCE e g – grupo positivo sucralfato). Lesões induzidas por ácido acético à 5% e 10% (h – grupo tratado LCE, i – grupo controle negativo, j – grupo positivo sucralfato e l – grupo positivo omeprazol..... 49

Figura 16: Imagens Histológicas das Lesões gástricas induzidas por indometacina (a), etanol (b) e por ácido acético à 5% e 10% (c) 49

Figura 17: Efeito do LCE sob pH da secreção gástrica. Os animais receberam o tratamento por via intraduodenal. O grupo controle n=5 recebeu (1 ml solução salina 0,9%), grupo tratado n=6 recebeu (LCE 0,14 mg/kg a.n) e o grupo controle positivo n=5 recebeu (omeprazol 20 mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *pos test *Dunnnett's e #Turkey's*) 50

Figura 18: Efeito antioxidante do LCE na técnica de DPPH. Para se obter a atividade antioxidante do LCE, foi feita duas curvas, a primeira curva, com várias concentrações de DPPH (1 a 120 μ M) e a segunda com o ácido ascórbico (antioxidante padrão) com concentrações similares a do DPPH. Foi feita diluições do (LCE 0,1206kg/0,5ml água destilada em 10X, 50X e 100X). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *pos test #Turkey's*) 51

Figura 19: Concentração de DPPH remanescente nas concentrações de AA e nas diluições de LCE analisadas. Para se obter a atividade antioxidante do liofilizado, foi feita duas curvas, a primeira curva, com várias concentrações de DPPH (1 a 120 μ M) e a segunda com o ácido ascórbico (antioxidante padrão) com concentrações similares a do DPPH. Foi feita diluições do (LCE 0,1206kg/0,5ml água destilada em 10X, 50X e 100X). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *pos test *Dunnnett's*) 51

Figura 20: Níveis de peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS, em lesões crônicas induzida por ácido acético á 5%. Avaliou-se os grupos naven=9 (normal), controle negativo n=8 (0,5ml/kg a.n) e tratado com LCE n=8 (0,1206 mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p>0,05$ seguida de *pos test* **Dunnett's e #Turkey's*) 52

Figura 21: Níveis de peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS, em lesões crônicas induzida por ácido acético á 10%. Avaliou-se os grupos naven=9 (normal), controle negativo n=8 (0,5ml/kg a.n) e tratado com LCE n=8 (0,1206 mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p>0,05$ seguida de *pos test* **Dunnett's e #Turkey's*)..... 53

LISTAS DESIGLAS E ABREVIACÕES

- ❖ AA – Ácido ascórbico
- ❖ ACh – Acetilcolina
- ❖ AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
- ❖ BSA– Albumina de soro bovino
- ❖ CAT – Catalase
- ❖ COX – Ciclooxigenase
- ❖ COX-1 – Ciclooxigenase1
- ❖ COX-2 – Ciclooxigenase2
- ❖ COX-3 – Ciclooxigenase3
- ❖ DNA– Ácido desoxirribonucléico
- ❖ DPPH – 2,2-difenil 1-picrilhidrazil
- ❖ ECL – Célula enterocromoafim
- ❖ EMBRAPA– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria
- ❖ EROs – Espécies reativas derivadas de oxigênio
- ❖ GPx – Glutathione peroxidase
- ❖ GSH – Glutathione reduzida
- ❖ GST – glutathione-S-transferase
- ❖ H₂ – Histamina
- ❖ HCL – Ácido clorídrico
- ❖ HE– Hematoxilina e eosina
- ❖ H⁺, K⁺ ATPase – hidrogênio, potássio adenosina trifosfatase
- ❖ H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- ❖ IBP_s – Inibidores da bomba de prótons
- ❖ ip – via intraperitoneal
- ❖ IU– Índice de ulceração
- ❖ LCE– Liofilizado da espécie *Conocarpus erectus L*
- ❖ MDA– Malonaldeído
- ❖ NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido oxidase
- ❖ NO – Óxido nítrico
- ❖ NaCl – Cloreto de sódio

- ❖ Omep –Omeprazol
- ❖ OMS– Organização Mundial de Saúde
- ❖ OH – Radical hidroxila
- ❖ O₂ – Oxigênio molecular
- ❖ PG – Prostaglandina
- ❖ PGE₂ – Prostaglandina E₂
- ❖ PGG₂ – Prostaglandina G₂
- ❖ PGH₂ - Prostaglandina H₂
- ❖ PGI₂ – Prostaciclina
- ❖ PKA - Proteína quinase A
- ❖ RENAFITO – Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapicos
- ❖ RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais
- ❖ -S-S-- Ponte de disulfeto
- ❖ -SH – Tiol
- ❖ SOD – Superóxido dismutase
- ❖ SUS– Sistema Único de SaúdeTBAR-RS –Ácido tiobarbitúrico
- ❖ TGI – Trato gastrointestinal
- ❖ UG – Ulcera gástrica
- ❖ VO – via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO ETNOFARMACOLOGICO PARA A MEDICINA TRADICIONAL	19
1.1.1 Plantas medicinais	19
1.1.2 Espécie <i>Conocarpus erectus L.</i>	21
1.2. ANATOMIA E HISTOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL	23
1.3. FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL	26
1.3.1 Secreção gástrica	26
1.3.2 Mecanismos estimulantes da secreção gástrica	26
1.3.3 Fatores protetores da mucosa gástrica	26
1.3.4 Fatores de Proteção Pré-Epiteliais	27
1.3.4.1 Muco e bicarbonato	27
1.3.4.2 Fatores de Proteção Epiteliais	28
1.3.4.3 Fatores de Proteção Sub-Epitelial	28
1.3.4.3.1 Fluxo sanguíneo	28
1.3.4.4 Fatores Moduladores da Mucosa Gástrica	29
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	30
1.4.1 Espécies reativas de oxigênio	30
1.4.2 Peroxidação Lipídica	31
1.5 ULCERA GÁSTRICA	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E METODOS	37
4.1 MATERIAL.....	37
4.1.1 Obtenção e identificação do material botânico	37
4.1.2 Obtenção do LCE	38
4.1.3 Animais experimentais	38
4.2 MÉTODO	39
4.2.1 Avaliação da atividade citoprotetora gástrica	39

4.2.1.1	Indução e avaliação de lesão gástrica induzida por indometacina (Djahanguiri, 1969)	39
4.2.1.2	Indução e avaliação de lesão gástrica induzida por etanolPA(Robert <i>et al.</i> , 1979)	40
4.3.1	Avaliação da atividade cicatrizante gástrica	40
4.3.1.1	Indução e avaliação de lesão gástrica induzida por ácido acético à 5% e 10%(Takagiet <i>al.</i> , 1969) modificada por (Mello <i>et al.</i> , 2008)	40
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPROBATÓRIA DE LESÕES CAUSADAS PELOS INDUTORES: INDOMETACINA, ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO	41
4.5	AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO GÁSTRICA	41
4.5.1	Ligadura de Píloro (Shay et al, 1945)	41
4.6	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	42
4.6.1	Avaliação da atividade antioxidante do LCE no ensio de DPPH	42
4.6.2	Determinação do estresse oxidativo	43
4.6.2.1	Preparo das amostras	43
4.6.2.2	Dosagem de proteína	43
4.6.2.3	Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS	43
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS	45
5.1	OBTENÇÃO DOLCE	45
5.2	ATIVIDADE CITOPROTETORA DO LCE, EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA	45
5.3	ATIVIDADE CITOPROTETORA DOLCE EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL PA	46
5.4	ATIVIDADE CICATRIZANTE DOLCE EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO (5% E 10%)	47
5.5	COMPROVAÇÃO MICROSCÓPICADOS DANOS CAUSADO NO ESTÔMAGO APÓS A INDUÇÃO DE LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA, ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO	49
5.6	EFEITO DO LCE SOBRE O PH DA SECREÇÃO GÁSTRICA	50
5.7	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	51
5.7.1	Avaliação da atividade antioxidante do LCE no ensaio de DPPH	51
5.7.2	Avaliação da concentração remanescente de DPPH observadas na concentração de AA e nas diluições do LCE	52
5.7.3	Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS em lesões gástricas induzidas por ácido acético à 5% e 10%	52

6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	62
8 REFERÊNCIAS	63
ANEXO: Parecer do Comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação	72
APÊNDICE:Tabela de avaliação do índice de ulceração (IU) em lesões gástricas causada por indometacina.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO ETNOFARMACOLOGICO PARA A MEDICINA TRADICIONAL.

1.1.1 Plantas medicinais

Históricamente existem relatos fósseis sobre a utilização de plantas medicinais pelos seres humanos há mais de 60 mil anos atrás. Estes relatos concentram-se nas épocas das sagradas escrituras, papiros e principalmente aos povos que habitavam em regiões tropicais, onde havia uma grande variabilidade de opções naturais, como exemplo, a nossa região Amazônia Brasileira (PINTO; MADURO, 2003; Argenta *et al.*, 2011).

O Brasil destaca-se no cenário mundial da produção de fitomedicamentos, por possuir a maior biodiversidade do mundo, a qual corresponde cerca de 20% do número total de espécies existente no planeta. As plantas medicinais existentes na região Amazônia correspondem a uma grande parcela da biodiversidade do mundo e são utilizadas como remédios caseiros pela população local, e a cada dia ganha espaço na indústria de fitoterápicos. É importante ressaltar que os princípios biologicamente ativos presentes em muitas plantas medicinais podem também servir de modelo para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados com a grande diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas encontrados na natureza (JARDIM, 2007 ;BOCHUWANG, 2011).

A utilização de plantas medicinais com finalidade terapêutica foi reconhecida oficialmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1978, com difusão em âmbito mundial dos conhecimentos necessários para o consumo, respeitando os critérios e as normativas vigentes para sua aplicabilidade. No entanto, ainda existe o consumo de plantas medicinais para tratar patologias sem embasamento científico comprovado, que ocorre em decorrência das indicações populares (OMS, 2014). Embora nesta última década tenha ocorrido um aumento no crescimento socioeconômico da população brasileira, sabe-se que ainda existem necessidades no atendimento primário à saúde em comunidades carente e isoladas com difícil acesso aos hospitais. O interesse por terapias de origem natural não é exclusivamente motivada por achados científicos, mas pela opção da “consciência ecológica” usada na atualidade (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

Dentro desta ótica, diversas plantas medicinais tem sido utilizadas no tratamento de distúrbios digestivos, principalmente as lesões gástricas. A humanidade tem convivido e sofrido com úlceras pépticas tanto de característica gástrica como duodenal desde os tempos remotos, porém nos últimos anos estudo relacionado ao quadro aumentou significativamente devido à identificação de várias técnicas, as quais têm possibilitado um estudo mais detalhado e específico da mucosa gástrica e novas alternativas de tratamento. A gama terapêutica válida poderá ser ainda maior diante da comprovação científica da medicina tradicional, principalmente associada a utilização de plantas medicinais (BRZOZOWSKI, 2003).

Segundo Rebouças (2011) a respeito dos mecanismos fisiopatológicos da doença ulcerativa é fundamental o equilíbrio entre os mecanismos protetores e agressores da mucosa gástrica, pois não existe relatos sobre a utilização medicamentosa ou métodos capazes de interferir farmacologicamente nas predisposições genéticas da mucosa. Diante disso, novas terapias que visem não somente o controle da secreção gástrica, mas a reversão dos danos causados à mucosa e o controle dos eventos inflamatórios que sucedem após a instalação das lesões tem sido o principal alvo em estudos promissores a agentes com potencial antiulcerogênico.

Todo conhecimento adquirido de novas substâncias que possuem potencial terapêutico na reversão de lesões gástricas, principalmente desprovidas de efeito tóxico, caracteriza-se como matérias-primas inovadoras para possíveis fármacos. Diante disso, a busca de recursos farmacológicos mais econômicos, principalmente através da pesquisa de substâncias utilizadas pela sociedade, surge como uma alternativa terapêutica à disposição de todos. Através da literatura, percebe-se que diversas plantas medicinais e alimentos já foram estudados para prevenir e tratar úlceras gástricas, afirmando que suas propriedades terapêuticas podem estar relacionadas com a presença de taninos, flavonoides, gomas, fibras, mucilagens, terpenóides, isotiocianato, alcalóides, glicosídeos, saponinas e esteróides que possuem efeito antiinflamatório (LORENZI, 2002; JORGE; LEITE; OLIVEIRA; TAGLIATI, 2004).

Há uma grande variedade de substâncias químicas já isoladas de plantas e extratos vegetais, com atividade terapêutica comprovada em modelos experimentais por indução de úlceras gástricas, afirmando o grande potencial das plantas e seus princípios ativos, para serem usados na terapêutica contra úlceras pépticas (Mota *et al.*, 2009).

Visando a validação das atividades citoprotetora e cicatrizante atribuída ao chá das cascas da espécie *Conocarpus erectus* L em distúrbios relacionados ao trato gastrointestinal, o

presente trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Pará, desenvolveu estudos com o liofilizado do chá em roedores com aplicação de dose alométrica e a utilização de metodologias internacionalmente padronizadas.

1.1.2 Espécie *Conocarpus erectus* L



Figura 1: Espécie *Conocarpus erectus* L

Fonte: <https://goo.gl/images/pVDsuU>

Classificação Taxonomica

REINO: *Plantae*

FILO: *Magnoliophyta*

CLASSE: *Magnoliopsida*

ORDEM: *Myrtales*

FAMILIA: *Combretaceae*

GENERO: *Conocarpus*

ESPÉCIE: *Conocarpus erectus* L

A espécie *Conocarpus erectus* L é popularmente conhecida como “mangue botão” pertencente à família Combretaceae, podendo ser encontrada nos manguezais em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (BANDEIRA, 2003). Suas diferentes partes como as folhas, caules, frutos e flores possuem em sua composição propriedades antioxidante, anticancerígenos e antimicrobianos. Na medicina popular é utilizada na prevenção de anemia, diabetes, conjuntivite, dor de cabeça, diarreia, febre, gonorreia, hemorragia, inchaços e sífilis (Abdel-Hameed *et al.*, 2013).

A família Combretaceae possui cerca de 13 gêneros e 500 espécies, com distribuição tropical, existente em ambientes quentes de todo o continente, com centros de diversidade na

África e Ásia, suas espécies constituem importantes elementos de mangues, florestas úmidas e de regiões semi-áridas. As subfamílias Strephonematoideae e Combretoideae já foram reconhecidas dentro da família Combretaceae. A subfamília Strephonematoideae possui um único gênero, *Strephonema*, com distribuição exclusiva na África, sem representantes na flora brasileira e a subfamília Combretoideae que possui o maior número de espécies apresentando uma distribuição mais ampla, com duas tribos, Laguncularieae e Combreteae, com 4 a 12 gêneros, respectivamente, sendo os gêneros *Combretum* e *Terminalia* encontrados em todos os continentes (STACE, 2004).

Segundo Tomlinson (2006), de acordo com as funções ecológicas e etnobotânicas que a espécie *Conocarpus erectus* L apresenta, ela é defenida como um arbusto de beira-mar ou árvore com folha altamente resistente ao sal, que protege o solo durante a tempestade e ajuda a estabilizar as dunas, fornecendo comida e cobertura para a vida selvagem (várias espécies de caranguejos e insetos), sua madeira é pesada e muito durável em água, tornando-a útil para a confecção de barcos e outras construções marítima, porem, é susceptível ao ataque de cupins, é o combustível preferido para defumar peixes, faz uma excelente lenha pelo fato de emitir pouca fumaça durante a sua queima e também sendo utilizada como fonte de carvão. A espécie floresce de janeiro a abril, junho, julho e outubro e com frutifica de fevereiro a julho. Estudo descreverão que suas folhas são ricas em tanino e flavonóides.



Figura 2: Distribuição da espécie *Conocarpus erectus* L no Sul do Brasil.

Fonte: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6910>>.

Quanto a distribuição geográfica da espécie *Conocarpus erectus* L, ela pode ser encontrada no litoral meridional da Flórida, México, América Central e na América do Sul, desenvolve-se no litoral do Equador ao Brasil. Sempre associada a ambientes de manguezal. No Brasil, ela encontra-se registrada nos estados do Pará, Alagoas, Bahia, Maranhão, Paraíba,

Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná. Já no Ceará foi registrada ao longo do litoral em manguezais (Fig. 2) (MARQUETE, 2012; Linsigen *et al.*, 2009).

Através de informações etnofarmacológicas sobre a utilização da espécie *Conocarpus erectus* L no tratamento de doenças relacionadas ao trato gastrointestinal e sua atividade citoprotetora e cicatrizante no tratamento de úlceras gástricas, faz-se necessário sua comprovação, a qual servirá com novo fitoterápico para indústria farmacêutica, uma vez que esta espécie não possui embasamento científico.

1.2. ANATOMIA E HISTOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL

O trato gastrointestinal é composto pelo trato digestivo constituído pela cavidade oral, estômago, esôfago, intestino delgado, intestino grosso e pelas glândulas anexas que são as glândulas salivares, fígado e o pâncreas, um conjunto diversificado de órgãos responsáveis pela digestão das substâncias alimentares advindas da nutrição extracorpórea e absorção das moléculas de nutrientes para corrente sanguínea, além de servir também como uma barreira de proteção entre o meio externo e interno contra agentes nocivos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SILVERTHORN, 2010).

O órgão acometido pela doença úlcera gástrica é o estômago, possui forma sacular com volume variável de 1200 mL a 1500 mL com capacidade acima de 3000 ml, tendo como função armazenar o alimento, iniciar a digestão de proteínas, além de eliminar as bactérias pela ação da acidez do suco gástrico e transportar o alimento na forma pastosa (quimo) para o intestino delgado (SILVERTHORN, 2010).

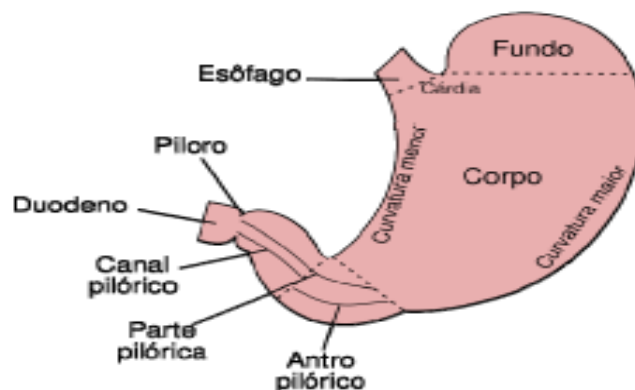


Figura 3: Regiões anatômicas do estômago

Fonte: <http://reforcocias.blogspot.com/2008/04/doenas-relacionadas-aoestomago.html>

O estômago é dividido em quatro regiões anatômicas que corresponde a região **cárdia** que faz a transição entre o esôfago e estômago; o **fundo** que está situado na região superior e tangencia a junção esôfago gástrica; o **corpo** corresponde à maior parte do órgão e o **antro** que encontra-se situado na região próxima ao canal pilórico. Sendo limitado por dois sistemas de esfíncteres, o **infícter esofágiano** localizado na parte superior ou proximal do estômago e o **infícter pilórico** localizado na parte inferior ou distal do estômago (Fig3). Vale ressaltar que as regiões do fundo e corpo possuem estrutura microscópica idêntica, portanto, somente três regiões são consideradas histologicamente (DANGELO; FATTINI, 2007; Kummar *et al.*, 2010).

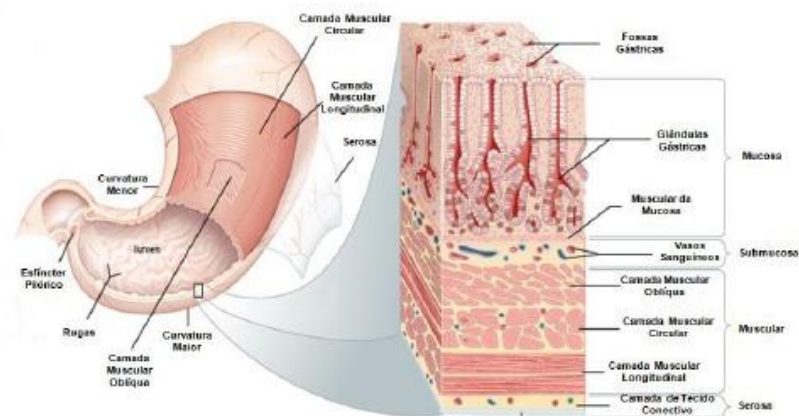


Figura 4: Histologia da parede gástrica

Fonte: http://1.bp.blogspot.com/_mEwwMHwfzo4/TAiE0Xo5XrI/AAAAAAAAAHQ/9TK7X

[Sj9Zxs/s1600/estomago+%2B+parede.jpg](http://1.bp.blogspot.com/_mEwwMHwfzo4/TAiE0Xo5XrI/AAAAAAAAAHQ/9TK7X)

A parede do estômago é composta por quatro camadas também chamadas de tûnicas básicas que são comuns ao trato gastrointestinal estas são: A **mucosa**, que reveste o estômago com uma camada de células epiteliais, uma de lâmina própria, composta por tecido conjuntivo frouxo, no qual as células epiteliais estão fixadas, e uma delgada camada de músculo liso, também chamada de muscular da mucosa; **submucosa**, uma espessa camada de tecido conjuntivo ou fibroso localizado sob a mucosa, que possui vasos sanguíneos, linfáticos e em certas regiões contém glândulas e plexos nervosos; **muscular externa**, compreende a uma dupla camada de fibras musculares lisas (involuntárias), responsáveis pelos movimentos peristálticos, que levam o alimento ao longo do trato gastrointestinal misturando-o com as enzimas digestivas. Entre suas duas camadas existe o plexo mioentérico (plexo de *Auerbach*), que provê o principal suprimento nervoso do trato gastrointestinal e a camada **serosa** considerada a camada mais externa, constituída por tecido conjuntivo e recoberta por uma camada de tecido epitelial, a qual tem a função de proteção (FOX, 2007).

A mucosa possui fossetas com formato de longas dobras, e suas aberturas no lúmen gástrico correspondem as fossetas gástricas. As células que revestem as fossetas da mucosa secretam várias substâncias, formando as glândulas exócrinas, que constituem-se de diversos tipos de células. As células parietais presentes na mucosa gástrica, secretam um polipeptídeo denominado fator intrínseco, fundamental para que a vitamina B12 seja absorvida no intestino (FOX, 2007).

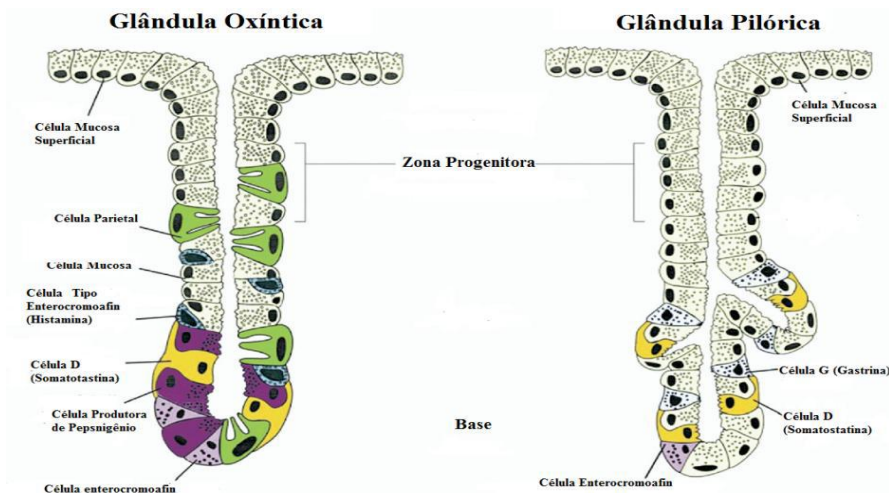


Figura 5: Anatomia funcional da mucosa gástrica

Fonte: SCHUBERT, 2011

No trato gastrointestinal existem vários tipos de glândulas, pois no estômago podem ser encontrado as glândulas oxínticas e pilóricas, que secretam varias substâncias responsáveis pelos processos digestivos e homeostáticos do órgão (Fig 5). As glândulas oxínticas podem ser encontradas na superfície interna do corpo e fundo do estômago, compostas por células mucosas (que secretam o muco), células pépticas ou principais (responsáveis pela secreção do pepsinogênio), células parietais (que secretam o ácido clorídrico), células D (que secretam somatostatina) e as células enterocromafins (ECL) (que secretam histamina). Já as glândulas pilóricas estão localizadas na porção antral do estômago e possuem células mucosas (produtoras de muco), células G (quando estimuladas liberam o hormônio gastrina, tendo papel importante na secreção gástrica) e também células D (SCHUBERT;PEURA, 2008).

1.3. FISILOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL

1.3.1 Secreção gástrica

O suco gástrico é uma solução extremamente ácida, constituído de HCL, pepsina, fator intrínseco, muco, bicarbonato, água e sais. Formado a partir da mistura de secreção das glândulas gástricas e das células epiteliais superficiais gástricas (Berne *et al*, 2004).

As células parietais são consideradas as principais células secretoras de ácido na mucosa gástrica, regulada por vários mecanismos em níveis central e periférico como hormonais, neurais, parácrinos e autócrinos, os quais convergem para a etapa final da secreção de HCL (Konturek *et al*, 2004; SCHUBERT, 2005).

Segundo Fry (2009) a secreção gástrica divide-se em 3 fases distintas que são: **Afase cefálica** onde uma parte é controlada pelo hipotálamo e mediada pelo nervo vago, sendo estimulada pela visão, pensamento, pelo cheiro e sabor do alimento; A **fase gástrica** induzida pela distensão do estômago e exposição luminal dos nutrientes, realizando a ativação de receptores sensoriais do corpo e do antro gástrico aumentando assim a quantidade de secreção gástrica e a **fase intestinal** estimulada pela presença de aminoácidos e peptídeos provenientes do quimo e pela distensão mecânica.

1.3.2 Mecanismos estimulantes da secreção gástrica

O controle da secreção de ácido gástrico pelas células parietais acontece por meio da interação harmônica da sinalização neuronal, hormonal e parácrino agindo direta e indiretamente nas células parietais, através da modulação da secreção do hormônio gastrina e os agentes parácrinos, histamina e somatostatina presente no estômago. Os principais estimulantes da secreção gástrica são a **Histamina** liberada a partir das células enterocromafins (ECL) (parácrinos); **Gastrina**, liberada a partir das células G (hormonal) e **acetilcolina** (ACh) liberada de neurônios entéricos pós-ganglionares (neurócrinos). Já a **somatostatina** é a principal inibidora da secreção ácida sendo liberada das células D oxintica e pilórica (parácrinos), sendo que cada um desses agentes atuam diretamente na célula parietal, assim como indiretamente na modulação de células neuroendócrinas (SCHUBERT; PEURA, 2008).

1.3.3 Fatores protetores da mucosa gástrica

A mucosa gástrica mantém sua integridade funcional e estrutural mesmo estando constantemente exposta a fatores nocivos como HCl, pepsina e bactéria *H. Pylori*. Em condições normais ela é mantida por fatores pré-epiteliais como o muco, bicarbonato e

fosfolípídeos; uma superfície das células epiteliais justapostas que secretam muco, produzem bicarbonato, peptídeos, prostaglandinas e *heatshock proteins*; renovação celular contínua realizada pela proliferação de células progenitoras (reguladas por fatores de crescimento e prostaglandinas E2); fluxo sanguíneo contínuo devido aos microvasos da mucosa; uma barreira endotelial com inervação sensitiva assim como o óxido nítrico (Laine *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2009).

1.3.4 Fatores de Proteção Pré-Epitelial

1.3.4.1 Muco e bicarbonato

A barreira pré-epitelial é considerada a primeira linha de defesa, constituída pelo muco, bicarbonato e fosfolípídeos que tem a função de cobrir a superfície da mucosa, mantendo um pH neutro ~7,0 na interface luminal da superfície das células epiteliais, enquanto que o pH do lúmen é de 1,0-3,0. Esta camada retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais mantendo na superfície epitelial um pH neutro, impedindo a penetração de pepsina e a digestão proteolítica do epitélio da superfície. O muco gástrico possui também atividade antioxidante pelas glicoproteínas presentes nele, pois os açúcares são potentes sequestradores de espécies reativas de oxigênio (Tarnawski *et al.*, 2013).

O muco possui papel importante na proteção da mucosa gástrica, ele é um gel transparente, viscoso, elástico e aderente, constituído por 95% de água e 5% de glicoproteínas que cobre toda a mucosa gastrointestinal. Vale ressaltar que a propriedade protetora do muco depende não somente da estrutura do gel, mas também da espessura e da aderência da camada na superfície da mucosa (REPETTO E LLESUY, 2002; Laine *et al.*, 2008).

O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon, formando um gel aderente entre a mucosa e o lúmen, que protege a mucosa contra agentes agressivos. Sua secreção é estimulada por hormônios gastrointestinais, como a gastrina, secretina, prostaglandina (PGE2) e agentes colinérgicos. Substâncias úlcero-gênicas como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e sais de bile, causam dissipação do gel mucoso e da camada de fosfolípídios, causando a lesão da mucosa (Laine *et al.*, 2008).

A produção de bicarbonato na camada aderente ao muco cria um gradiente de pH quase neutro na superfície epitelial do estômago. A função primária da secreção de bicarbonato da mucosa é impedir a difusão do ácido na camada de gel e de muco, e ser

suficiente para manter um pH neutro entre a superfície da mucosa e o muco. Evidências sugerem que em condições fisiológicas normais, a barreira de bicarbonato junto ao muco é suficiente para a proteção da mucosa gástrica contra o ácido e pepsina, apresentando também proteção ao duodeno (ALLEN E FLEMSTROM, 2005).

1.3.4.2 Fatores de Proteção Epitelial

A proteção epitelial está ligada primeiramente os aspectos anatômicos, já que as células epiteliais gástricas possuem propriedades intrínsecas de proteção tanto por sua disposição anatômica quanto por sua constituição bioquímica. As junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica. Quando há destruição nas barreiras gástricas e ocorrência de morte celular, as células necróticas podem ser repostas pela migração de células epiteliais sobreviventes nas bordas da lesão ou através da divisão das células do cólo glandular que migram até o lúmen e diferenciam-se em células epiteliais superficiais (Laine *et al.*, 2008).

Segundo Cnubben (2001) e Bayir (2005) descrevem que além dos aspectos anatômicos, a proteção epitelial também envolve fatores bioquímicos, ou seja, um sistema antioxidante. As enzimas antioxidantes formam a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido e o H_2O_2 , elas são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona S-transferase (GST). Já a segunda linha de defesa antioxidante é realizada por alguns compostos de moléculas químicas pequenas, incluindo vitaminas, flavonóides, carotenóides, ácido úrico e a glutatona (GSH).

1.3.4.3 Fatores de Proteção Sub-Epitelial

1.3.4.3.1 Fluxo sanguíneo

As principais funções do fluxo sanguíneo é suprir a mucosa com oxigênio, nutrientes e hormônios, regulação (entrada e saída de ácido), produção de muco, secreção de bicarbonato e remoção dos produtos do tecido, incluindo a retro-difusão de íons de hidrogênio, assim, o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da mucosa, além de participar da cicatrização de úlcera gástrica. Pois, sua redução está relacionada a formação de lesões gástricas causadas por estresse, etanol e AINES. O fluxo sanguíneo adequado é crucial para a integridade da mucosa, ele remove o ácido difundido através de um epitélio lesionado

fornecendo a energia metabólica necessária para apoiar o transporte e outras funções (Rodríguez *et al.*, 2001; KAWANO, 2000).

Segundo Rodriguez (2001) a circulação sanguínea gástrica mantém a estrutura e a função do estômago, estando interligada com a patogênese e o processo de cicatrização das lesões gastrointestinais, regulado por fatores neurais e humorais, e modificado por fatores metabólicos locais. Os fatores derivados do endotélio que são produzidos por células endoteliais vasculares, induzem o relaxamento ou contração dos vasos sanguíneos servindo como mediadores básicos que regulam a circulação no estômago.

1.3.4.4 Fatores Moduladores da Mucosa Gástrica

As prostaglandinas são derivadas de ácidos graxos de 20-carbonos encontradas em praticamente todos os tecidos e órgãos por ser uma substância produzida em quase todas as células com exceção nas hemácias, ela executa funções fisiológicas e patológicas. São sintetizadas a partir de diferentes precursores como o ácido araquidônico (AA) que é convertido em endoperóxidos instáveis, PGG₂ e PGH₂ pela ação da ciclooxigenase (COX) (Chandrasekharan, *et al.*, 2002).

As prostaglandinas possuem papel fundamental na proteção e manutenção da mucosa gástrica, e estão envolvidas em vários processos fisiológicos no estômago como a produção de muco, bicarbonato e secreção de fosfolípidos, o aumento do fluxo sanguíneo, também a rápida restituição epitelial e cicatrização, são estimulados e/ou facilitados através de sua ação. Diante disto, inibem a secreção ácida e fazem a ativação de mastócitos e leucócitos, bem como a aderência de plaquetas no endotélio vascular. São importantes para citoproteção da mucosa gástrica causadas por AINEs, envolvendo fatores neurais, vasculares e hormonais (Laine *et al.*, 2008; Brzozowski *et al.*, 2005).

As ciclooxigenases também chamadas de prostaglandina H₂ sintase é constituída pelas isoenzimas COX-1, COX-2 e recentemente COX-3. A COX-1 é constitutivamente expressada na maioria dos tecidos desempenhando funções fisiológicas como a manutenção da mucosa. A COX-2 é induzível, isto é, não é residente dos tecidos orgânicos, mas se forma a partir de estímulos inflamatórios, seu nível é geralmente baixo ou indetectável em condições normais, que aumentam rapidamente sob influência de estímulos pro-inflamatórios ou mitogênico. Já a COX-3 estudos revelam que ela é uma variante da COX-1. Recentemente estudos em ratos normais demonstraram que a inibição seletiva de COX-1 ou de COX-2 não lesiona a mucosa

gástrica, e sim quando ambas são inibidas, demonstrando que a COX-2 participa na defesa da mucosa gástrica (GUDIS, 2005).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que participa da cascata de sinalização de vários processos fisiológicos na mucosa gástrica, como o relaxamento do músculo liso, agregação plaquetária, controle da pressão arterial e fluxo sanguíneo, neurotransmissão e regulação de mecanismos pró e anti-apoptótico (KUROKI; SCHROEDER, 1995).

Segundo o Cho (2001) quando o óxido nítrico é produzido em pequenas quantidades seu efeito é benéfico para o trato gastrointestinal, protegendo a mucosa contra danos e promovendo a cicatrização de úlcera gástrica, mas quando produzido em excesso ele promove ou até mesmo inicia respostas inflamatórias quando combinado com outras espécies reativas de oxigênio (EROs) em todo o trato gastrointestinal.

O NO possui participa do reparo da mucosa e no processo da cicatrização, podendo provocar ou aumentar o depósito de colágeno pelos fibroblastos, além de também estimular a angiogênese. Ele participa da modulação da defesa da mucosa gástrica agindo como regulador na secreção de muco, inibidor da migração de neutrófilo e vasodilatador. Durante o processo de cicatrização da úlcera gástrica, ele regula o fluxo sanguíneo estimulando diretamente a secreção de muco gástrico, ativando a guanilatociclase solúvel, além de, induzir o estresse oxidativo na fita de DNA inibindo assim as enzimas envolvidas na reparação do DNA (WALLACE; MILLER, 2000).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

1.4.1 Espécies reativas de oxigênio

Normalmente, os organismos aeróbicos necessitam de oxigênio (O_2) para a produção de sua energia, sendo que a maior parte desse oxigênio diminui na organela mitocôndrias, pois a água através da ação da enzima citocromo oxidase, transfere 4 elétrons para o oxigênio sem fazer liberação de intermediários reativos. No entanto, somente 5% do oxigênio presente nos organismos reduz-se através da ação de enzimas que são altamente reativas, gerando assim as espécies reativas de oxigênio que constituem os chamados radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Segundo Ribeiro (2008), a palavra “radical livre” é utilizada para denominar qualquer átomo ou molécula cuja sua estrutura atômica apresente no seu orbital mais externo um ou

mais elétrons desemparelhados, permanecendo-se instável e muito reativo. Porém outras espécies químicas podem se formar apartir dos radicais livres, que apesar de não apresentarem elétrons desemparelhados possuem uma similar instabilidade estrutural do mesmo.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo excesso da formação de radicais livres ou pela incapacidade na remoção das moléculas altamente reativas, o excesso de agentes oxidantes ou a deficiência do sistema protetor, causa o desequilíbrio entre o consumo de glutathiona reduzida (GSH) e a produção da glutathiona oxidada (GSSG). A formação de pontes de dissufeto (-S-S-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH) ocorrem através do aumento da GSSG, e a sua redução pode ocorrer devido a ação de compostos antioxidantes, como a GHS e pelo sistema tioredoxina (VALKO, 2007; NORDBERG & ARNER, 2001).

Portanto, o estresse oxidativo não pode ser definido somente pelo desequilíbrio entre parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes, mais como perturbação da sinalização e do controle redox, levando-se em consideração o sistema redox GSSG/GSH, tioredoxina e cisteína/cistina (JONES, 2006).

1.4.2 Peroxidação Lipídica

A primeira consequência do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica caracterizada pela deteriorização dos ácidos graxos poliinsaturados (LH) que se inicia com o radical *OH ao capturar um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia polialquil dos ácidos graxos, formando um radical. O oxigênio é mais solúvel em meio não polar do que polar, permitindo com que as membranas biológicas apresentem uma elevada concentração de O₂ na região hidrofóbica medial, onde sua potencialidade gera efeitos deletérios nos ácidos graxos poliinsaturados da membrana. Diante disso, um elétron e um ácido graxo desemparelhado ao reagirem com o O₂ formam um radical peroxil (LOO*), tornando-se capaz de retirar um hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado adjacente da membrana, aumentando assim a peroxidação lipídica e a formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (JONES, 2006; LOUREIRO, 2002).

Segundo Droge (2002), um dos produtos para determinar a peroxidação lipídica é o malonaldeído (MDA), um dialdeído considerado altamente reativo, que ao reagir com os grupos amino de proteínas, fosfolipídios ou ácidos nucleicos, permite modificações estruturais nas moléculas biológicas. Sua avaliação é realizada espectrofotometricamente ao se medir um complexo colorido, sendo o produto da reação com o ácido tiobarbitúrico.

1.5 ULCERA GÁSTRICA

A úlcera gástrica (UG) é considerada uma doença grave, com origem multifatorial, geralmente crônica e de prevalência mundial, com grande relevância na saúde pública por causa morbimortalidade aos seus pacientes, e por isso ela é foco de novas frentes de pesquisa. A cada ano os casos de úlceras gástricas afeta cerca de 4 milhões de pessoas ao redor do mundo com 2 milhões de caso do Brasil, com risco de morte até 40% (COELHO, 2003; Zelickson *et al.*, 2011; OMS, 2014).

Segundo Aires (2008), a úlcera gástrica caracteriza-se como uma descontinuidade “rompimento” das células da mucosa do TGI podendo chegar à camada da submucosa, em humanos é vista como uma lesão definida, circular ou oval e com aproximadamente 4cm de diâmetro.

O surgimento da lesão ulcerativa ocorre através do desequilíbrio entre os fatores protetores com o muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, óxido nítrico, prostaglandina dentre outros fatores agressores como a pepsina, ácido clorídrico, H_2O_2 , OH^- , O_2^- e fatores emocionais como estresse, ansiedade, emoções e manifestações na vida afetiva. Estas lesões também podem ser ocasionadas e agravadas pelo estresse, consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de AINEs e presença da bactéria *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal. As lesões ocorrem em maior parte na pequena curvatura do estômago e próximo do duodeno, também podendo desenvolver-se na zona inferior do esôfago, zona distal do duodeno ou no jejuno (BARKUN; LEONTIADIS, 2010; Beserra *et al.*, 2011)

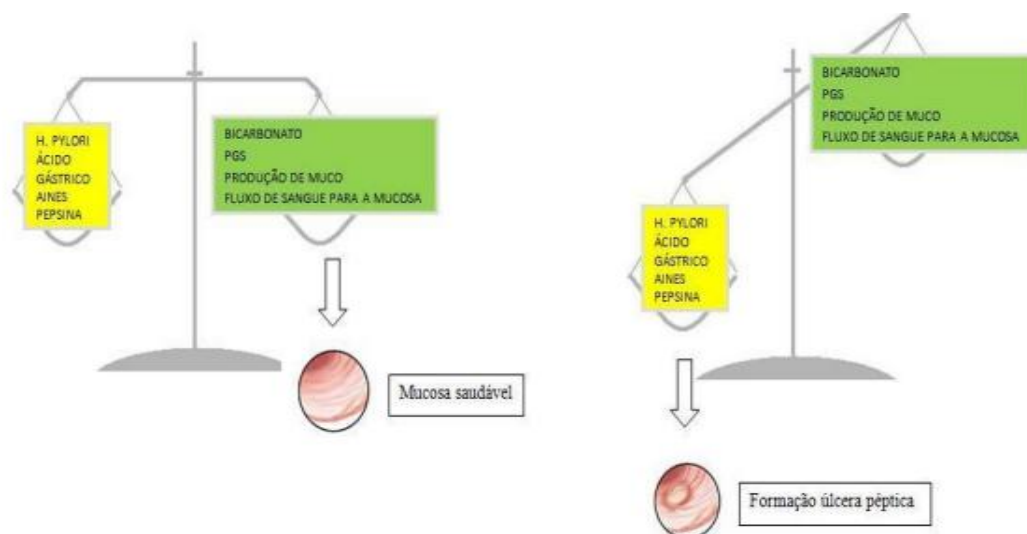


Figura 6: Desequilíbrio entre os fatores protetores e agressores da mucosa

Fonte: Adaptada de <http://www.jhmicall.org>

Existem fatos que comprovam que a bactéria *H. pylori* é um fator importante na gênese da úlcera péptica, em razão de sua presença durante a inflamação da mucosa e sua capacidade de alterar os mecanismos reguladores da produção de ácido. Dados demonstram que 90% das pessoas portadoras de úlceras gástricas encontram-se infectados pela bactéria, apesar de nunca ter manifestado qualquer tipo de sintomas ou complicações por causa da sua presença na mucosa. A alta prevalência da infecção causada pela bactéria tem dificultado sua terapia e por isso, ela é considerada um problema de saúde pública (Momtazet *et al.*, 2012).

As úlceras gástricas podem ser encontrada 60% na região antro, 25% na junção nas regiões corpo e 25% na pequena curvatura, sua maior incidência é em homens, faixa etária de maior ocorrência entre 50 à 70 anos. Sua incidência clínica e chances de cura é de 95% durante o primeiro tratamento. Já as chances de reincidência é de 65-80% um ano após a cura, e quase 100% depois de dois anos (WALLACE & DEVCHAND, 2005 ; ABITBOL, 2013).

Os sintomas associados ao desenvolvimento deste tipo de lesão é variado, apresentando manifestação com dores epigástrica, dispepsia, vômitos, perda de apetite, intolerância a alimentos gordurosos, anemia, hematemesa e melenas (RAMAKRISHNAN E SALINAS, 2007).

Segundo Coelho (2003), no tratamento de úlceras gástricas os fármacos buscam neutraliza o conteúdo gástrico. Pois, os antiácidos tem como finalidade restabelecer o equilíbrio da mucosa gástrica lesionada, diminuindo os agentes agressores como o ácido gástrico, pepsina e bile. A descoberta dos receptores de Histamina H₂ e antagonista seletivos, como a cimetidina e a ranitidina ocasionou grande impacto mundial na terapêutica (Jain *et al.*, 2007).

Diversos fármacos gastroprotetores foram também introduzidos, como os inibidores da bomba de prótons (IBPs), a exemplo o omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol, onde sua ação provoca a redução nas secreções de ácido gástrico basal, sendo ativados pelos canalículos secretores de ácido da célula parietal, e sua forma ativa, sulfenamida cíclica, liga-se covalentemente a H⁺,K⁺-ATPase, inativando-a, por modificar sua conformação estrutural (Sachs, *et al.*, 2010; HOOGERWERF & PASRICHA, 2012).

Mas apesar da grande efetividade apresentada pelos antagonistas dos receptores H₂ e IBPs, esses medicamentos podem causa conseqüências quando são utilizados por muito tempo, devido à intensa supressão do ácido. Dentre os efeitos causados, podemos citar a

osteoporose, maior risco de infecções entéricas, metabolismo alterado pelo uso de outros medicamentos, desenvolvimento de pólipos gástricos que podem evoluir para câncer gástrico e até mesmo a reincidentia de doenças (CHUBINEH e BIRK, 2012).

Diante dessas problemáticas observadas nos pacientes submetidos ao uso de medicamentos prologados no tratamento de úlceras gástricas, faz-se necessário a investigação de novos alvos terapêuticos, de preferência advindos de plantas medicinais, desprovidos de efeitos tóxicos, uma vez que, esta alternativa podera beneficiar a todos devido seu baixo custo, servir de alicerce para a obtenção de novos fitoteráticos para a indústria farmacêutica. E assim, contribuir para a inserção da espécie como recurso terapêutico oficial na RENESUS.

2 JUSTIFICATIVA

A úlceração gástrica é uma condição patológica muito frequente na população mundial e de modo não diferente tem grande expressão em nível nacional em nossa região. Apesar dos avanços na área da terapêutica com a inserção dos IBPs e antibióticoterapia aplicada a *H. pylori*, a busca de novas alternativas de tratamento que apresente eficácia e segurança é constante, principalmente se lhe for atribuída menor incidência de efeitos colaterais. Dentro desta ótica a investigação de saberes relacionados a medicina popular tem revelado grande destaque no cenário técnico-científico.

A utilização de plantas medicinais é vastamente evidenciado na região norte e muitas vezes encontra-se desprovida de comprovação científica. Em adição, atualmente várias políticas publicas tem sido desenvolvidas para incorporar o conhecimento popular a terapêutica, dentre estas, podem ser citado a Relação Nacional de Plantas Mediciniais (RENISUS) de interesse ao SUS que tem como finalidade subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva relacionadas a regulamentação, cultivo, manejo, produção e comercialização de plantas medicinais e fitoterápicos. Tendo a função de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar na elaboração da Relação Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (RENAFITO), o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos. Desta forma projetos que visam a validação do saber popular podem contribuir diretamente no estabelecimento e ampliação de políticas desta natureza.

Estudos etnofarmacológicos na região do mangue de Salinópolis-PA, previamente desenvolvidos pelo grupo, revelaram a utilização da planta *Conocarpus erectus L* no tratamento em distúrbios digestivos, como a úlceração gástrica. Diante disso buscou-se a comprovação da sua atividade citoprotetora e cicatrizante em modelos experimentais de úlceração gástrica. Desta forma os resultados obtidos com esta proposta poderão beneficiar a população com menos recurso, devido seu baixo custo e poderá servir de alicerce para a obtenção de novos fitoterápicos para a indústria farmacêutica e para a inserção da espécie como recurso terapêutico oficial na RENESUS.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citoprotetora e cicatrizante da espécie *Conocarpus erectus L.*, em diferentes modelos de lesões gástricas induzidas em ratos wistar adultos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtenção do LCE das cascas da espécie *Conocarpus erectus L.*
2. Avaliar a atividade citoprotetora gástrica do LCE em lesões agudas induzidas por indometacina e etanol PA em ratos.
3. Avaliar a atividade cicatrizante gástrica do LCE em lesões crônicas induzidas por ácido acético em ratos.
4. Avaliar o efeito gastroprotetor do LCE sob a secreção gástrica.
5. Analisar capacidade antioxidante do LCE na técnica de DPPH.
6. Verificar os níveis de peroxidação lipídica (LPO) em lesões crônicas induzidas por ácido acético nos grupos controle e tratado LCE.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Obtenção e identificação do material botânico

O material vegetal *Conocarpus erectus L* foi coletado no manguezal do município de Salinópolis-PA sobre as coordenadas (-0.604030, -47.373605), sua exsicata foi encaminhada a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) para sua identificação botânica (código: IAN 194435).



Figura 7: Manguezal de Salinópolis-Pá, local da coleta do material botânico em 20/04/16

Fonte: Arquivo Pessoal



Figura 8: Exsicata da espécie *Conocarpus erectus L*, encaminhada a Embrapa Amazonia Oriental (EMBRAPA).

Fonte: Arquivo Pessoal

4.1.2 Obtenção do LCE

A extração sob forma de chá (decocto) e a parte da planta para este fim foi baseado nas informações etnofarmacológicas. O chá foi preparado conforme feito pela população, no entanto, foi utilizado um sistema alométrico ajustando o cálculo da dosagem pela taxa metabólica do animal, de acordo com estudos encontrados na literatura. Inicialmente o material biológico (casca) foram secas por 48 horas em uma estufa a 40°C, depois triturado manualmente. Em seguida 200g do material triturado foi submetido a uma extração por decocção em 1L de água destilada em temperatura à 100°C durante 10 minutos de fervura. Posteriormente o chá foi coado em papel filtro e após seu resfriamento foi transferido para tubos de falcon sendo preenchidos com 40ml em cada e colocados no liofilizador até completado o processo.

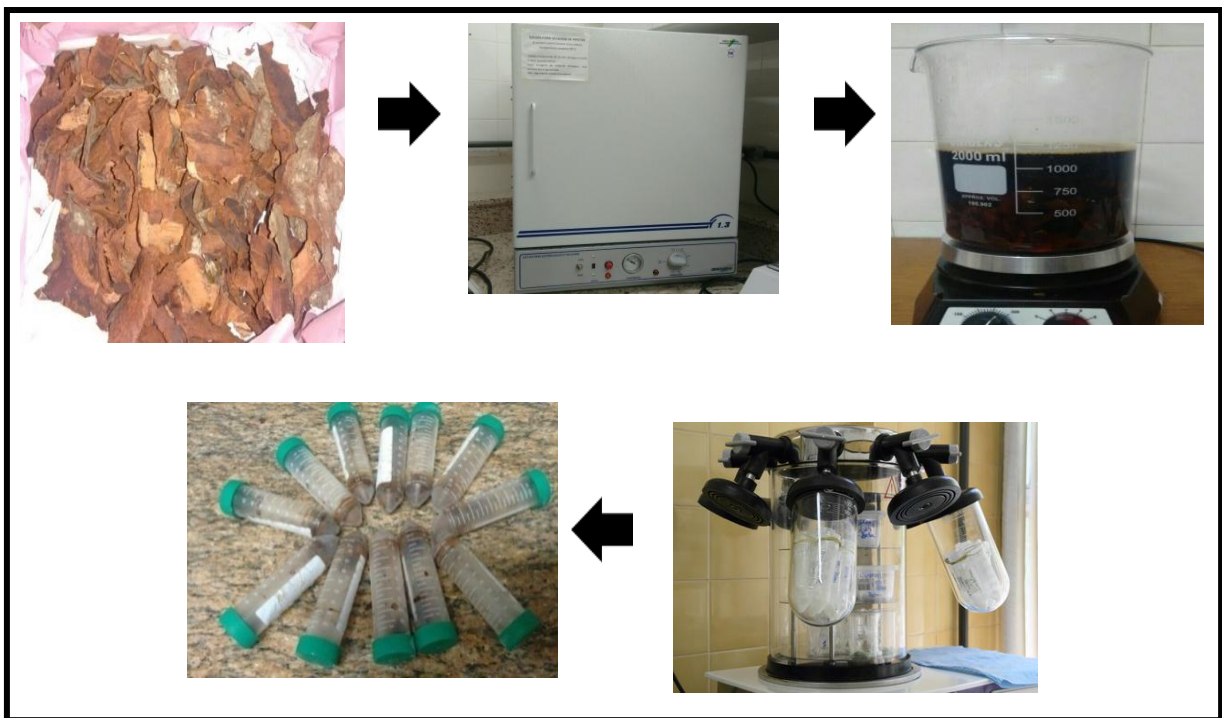


Figura 9: Etapas de obtenção do LCE

Fonte: Arquivo pessoal

4.1.3 Animais experimentais

Durante todos os ensaios biológicos experimentais desenvolvidos neste trabalho foram utilizados ratas wistar (175g a 200g) com 90 dias de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram aclimatados às condições do

laboratório por 5 dias antes da manipulação experimental, a ciclos claro-escuro de 12 hs/12 hs controlados, recebendo ração (Purina®) e água (filtrada). Todo o protocolo experimental foi conduzido de acordo com as normas éticas de experimentação animal (CEPAE 23/2015).

Em todos os casos, os experimentos foram conduzidos aproximadamente na mesma hora do dia, para que não houvesse variações decorrentes de alterações no ritmo diurno na regulação das funções gastrointestinais. Todas as soluções do LCE, indometacina, etanol, ácido acético, omeprazol e sucralfato foram preparadas imediatamente antes da administração. As concentrações das soluções administradas foram ajustadas de maneira que o volume administrado fosse o mesmo para todos os animais (0,5 mL/100g), respeitando-se o limite máximo recomendável de 1mL/100g de acordo com massa corporal do animal (OECD, 2001).

4.2 MÉTODO

4.2.1 Avaliação da atividade citoprotetora gástrica

4.2.1.1 Indução e avaliação de lesão gástrica induzida por indometacina (Djahanguiri, 1969)

Após um período de cinco dias de ambientação, os animais foram submetidos ao jejum de 24hs. Em seguida, receberam por via subcutânea, 50 mg/Kg de indometacina (recém preparada em solução salina com 0,5% NaHCO₃ como indutor de lesões gástricas), 30 minutos antes da injeção de indução os animais receberam por gavagem no grupo controle (água 0,5ml/kg.a.n), grupo tratado (LCE 0,1206mg/kg.a.n), grupo controle positivo (Omeprazol 20mg/kg.a.n) e grupo controle positivo (Sucralfato 1g/kg.a.n). Após 3hs da 1ª indução das lesões uma nova dose foi repetida nos animais e após de 6hs de indução, foram eutanasiados por deslocamento cervical para serem feitas as avaliações das lesões gástricas.

Os estômagos foram abertos ao longo da grande curvatura, as mucosas foram lavadas suavemente com solução salina (0.9% m/v de NaCl) e estendidas, com o auxílio de alfinetes sobre uma plataforma de isopor com fundo azul para observação e registro fotográfico. Os estômagos das ratas foram submetidos a avaliação macroscópica para designar a quantidade de lesões, e uma régua para medir o tamanho das lesões gástricas. Para determinar o número e o índice das ulcerações (IU) foi utilizada uma lupa cirúrgica (aumento 10x). O IU foi determinado a partir da perda de muco, presença de petéquias, perda de pregas, coloração da mucosa e edema (todos denominados parâmetros da lesão conforme a tabela apresentada em

anexo, assim como o número e dimensionamento das lesões obtidas: IU= Σ parâmetros da lesão), conforme os critérios padrões previamente descritos por (TSUKIMI, Y. OKABE, S, 1994; MELLO, 2008). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente no software *GraphPad Prism* (versão 5).

4.2.1.2 Indução e avaliação de lesão gástrica induzida por etanol PA (Robert *et al.*, 1979)

Após um período de cinco dias de ambientação, os animais foram submetidos ao jejum de 24hs. Em seguida, receberam por via oral, etanol na dose de 0,5 mL/100g de peso corporal. 30 minutos antes da administração do agente indutor de lesões gástricas, os animais receberam também por gavagem no grupo controle (água 0,5ml/kg.a.n), no grupo tratado (LCE 0,1206mg/kg.a.n) e no grupo controle positivo (Sucralfato 1g/kg.a.n). Sendo avaliado o efeito das diferentes concentrações. Após 50 minutos da indução os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para serem avaliadas e quantificadas as lesões gástricas.

Os estômagos foram abertos ao longo da grande curvatura, as mucosas foram lavadas suavemente com solução salina (0.9% m/v de NaCl) e estendidas com o auxílio de alfinetes sobre uma plataforma de isopor com fundo azul para observação e registro fotográfico. A área da região gástrica lesionada foi determinada por meio de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*®). A área ulcerada foi expressa em termos de porcentagem em relação ao corpo gástrico. Os dados foram tratados estatisticamente no software *GraphPad Prism* (versão 5).

4.3 Avaliação da atividade cicatrizante gástrica

4.3.1 Indução e avaliação de lesão gástrica induzida por ácido acético à 5% e 10% (Takagi *et al.*, 1969) modificada por (Mello *et al.*, 2008).

Após um período de cinco dias de ambientação, os animais tiveram fornecimento de ração sólida restrita a 2hs diárias, entre 10-11hs e 17-18hs, com livre acesso a água. Terminado este período os animais foram submetidos ao jejum de 24hs. Em seguida foi efetuada uma laparotomia abdominal na região epigástrica (sob uma solução de xilasina 7,5 mg/Kg e cetamina 60 mg/Kg na dose de 0,1 ml/100g de peso corporal). Após a exposição do estômago foi injetado na região subserosa da parede externa do órgão na face anterior, 50 μ l de solução aquosa de ácido acético à 5% e 10% e 50 μ l de solução salina 0.9% na face

posterior. O estômago foi lavado cuidadosamente com solução salina a 0.9% e a parede abdominal foi suturada. Após a recuperação da anestesia os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas sob o regime alimentar restrito descrito anteriormente. O tratamento foi iniciado 24hs após o procedimento cirúrgico e repetido diariamente durante um período de 8 dias. Ao final do período de tratamento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus estômagos foram retirados para inspeção da mucosa e dimensionamento das úlceras formadas.

Os estômagos foram abertos ao longo da grande curvatura, as mucosas foram lavadas suavemente com solução salina (0.9% m/v de NaCl) e estendidas, com o auxílio de alfinetes sobre uma plataforma de isopor com fundo azul para observação e registro fotográfico. O área úlcera lesionada foi determinada por meio de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*®). A área úlcera foi expressa em termos de percentagem em relação ao corpo gástrico. Os dados foram tratados estatisticamente no software *GraphPadPrism* (versão5).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPROBATÓRIA DAS LESÕES CAUSADAS PELOS INDUTORES: INDOMETACINA, ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO.

Os estômagos obtidos nos protocolos experimentais de indução por indometacina, etanol e ácido acético foram fixados em formol tamponado a 10% v/v por no mínimo 72 horas, foram removidos dos estômagos as regiões lesionadas para estudos histológicos, o tecido úlcera passou por varias etapas como: Fixação, Desidratação, Clareamento, impregnação até a sua inclusão. Posteriormente, as peças foram cortadas em espessura de (5 micróto). Em seguida as amostras foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) para observação geral das estruturas e celularidade (JUNQUEIRA; BEHMER, TOLOSA, & FREITAS NETO, 1976).

4.5 AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

4.5.1 Ligadura de Píloro

A determinação da secreção gástrica foi realizada através do método de Shay *et al.* (1945), com algumas modificações. As animais foram divididos em grupos (n = 7). Após 24 hs de jejum, os animais foram anestesiados (xilasina 7,5 mg/Kg e cetamina 60 mg/Kg na dose de 0,1 ml/100g de peso corporal), o abdômen foi objeto de incisão e do píloro ligado. Imediatamente após a ligadura do píloro, o grupo tratado recebeu (LCE 0,5mg/kg), grupo

controle positivo (Omeprazol 20mg/kg) e o grupo controle (solução salina 0,9% 1ml). Todas as amostras foram administradas intraduodenal. Após 4hs os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, em seguida o abdômen foi aberto e outra ligadura foi colocada ao redor do esôfago perto do diafragma. Os estômagos foram removidos e o conteúdo gástrico recolhido em tubos de centrifugação e em seguida foram centrifugados a 2000×g durante 15 min. O pH foi registrado com um medidor de pH digital (PA 200, Marconi S.A., Brasil).

4.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

4.6.1 Avaliação da atividade antioxidante do LCE na técnica de DPPH

A capacidade antioxidante do LCE foi avaliada a partir da técnica do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O DPPH é um radical livre que em solução apresenta coloração púrpura, e que na presença de moléculas que apresentam atividade antioxidante pode sofrer redução formando o difenil-picril-hidrazina de cor amarela (SOUSA & COLS, 2007). O produto da reação pode ser quantificado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 515 nm. Foram feitas duas curvas, a primeira uma curva com várias concentrações de DPPH (1 a 120 µM) e a segunda com o ácido ascórbico (AA) (antioxidante padrão) com concentrações similares ao do DPPH. Em seguida o LCE foi diluído com o mesmo solvente utilizado nas curvas.

Posteriormente realizou-se a incubação do DPPH (120µM), com as diferentes diluições tanto do LCE quanto do antioxidante padrão AA, por um período de 30 minutos, até que a reação estabilizasse. Em seguida realizou-se a leitura do produto da reação. Os valores de absorvância foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), a partir da equação:

$$\% AA = \{ [Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{controle}$$

Onde $Abs_{controle}$ é a absorvância inicial da solução de DPPH, $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura (DPPH+LCE) e Abs_{branco} é a absorvância apenas do solvente utilizado (metanol).

4.6.2 Determinação do estresse oxidativo

4.6.2.1 Preparo das amostras

Após o último tratamento, os animais dos grupos controle e tratado foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus estômagos removidos, o material foi lavado com tampão fosfato (KCl 140 mM, fosfato 20 mM), em seguida a região úlcera foi dissecada e pesada; para o grupo nave um pedaço do estômago foi retirado de uma região análoga ao da coletada dos estômagos dos grupos que apresentavam úlceras. Em seguida o material obtido de cada grupo foi triturado, colocados em tubos na proporção de 1ml de tampão fosfato para 1g de tecido, homogeneizado em ultra turrax (IKA-WERK), em ciclos de 30 segundos três vezes, em temperatura de 4°C, posteriormente a mistura obtida foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm resfriada a 4°C. O sobrenadante foi alicotado e reservado para análise.

4.6.2.2 Dosagem de proteína

A dosagem de proteínas foi feita a partir do método de Bradford (1976) com modificações. Primeiramente construiu-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA). Em seguida realizou-se o preparo do reativo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol 95% e ácido fosfórico 85%). Em uma microplaca de 96 poços foi colocado 5µl de curva e 5µl da amostra (após previa diluição), em seguida acrescentou-se 250µl do reativo, após 5 minutos realizou-se a leitura em leitor de microplaca em um comprimento de onda de 595nm.

4.6.2.3 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS.

A lipoperoxidação foi determinada a partir de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) formando um produto de coloração rosa claro, que pode ser aferido em espectrofotômetro, em um filtro de 535nm. O aparecimento desta coloração deve-se a presença do malonaldeído (MDA) proveniente da peroxidação lipídica no material biológico.

Primeiramente realizou-se a preparação do reativo de (TBA-RS): TCA 15%, TBA 0,375% e HCl 0,25M. Em seguida, foi colocado em tubos 30µl da amostra (obtida dos estômagos, previamente processada) e 570µl do reativo. Posteriormente o material foi levado ao banho maria por 45 minutos à 80°C. Após esse período os tubos foram agitados e o material foi resfriado, em seguida centrifugado por 10 minutos a 3000rpm. Foi feita uma curva com várias concentrações conhecidas de malonaldeído. O produto tanto da curva quanto do material foi lido em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 535nm. A

concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi expressa em nmoles/mg de proteína.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão da média ($M \pm EPM$). Os valores foram analisados usando ANOVA de uma via, seguido de *pós test Dunnett's e Tukey's*. Foram considerado um valor de $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DO LCE

O rendimento total do LCE obtido foi de 16, 874g a partir de 1L de decocto.



Figura 10: Rendimento do LCE

Fonte: Arquivo pessoal

5.2 ATIVIDADE CITOPROTETORA DO LCE, EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA.

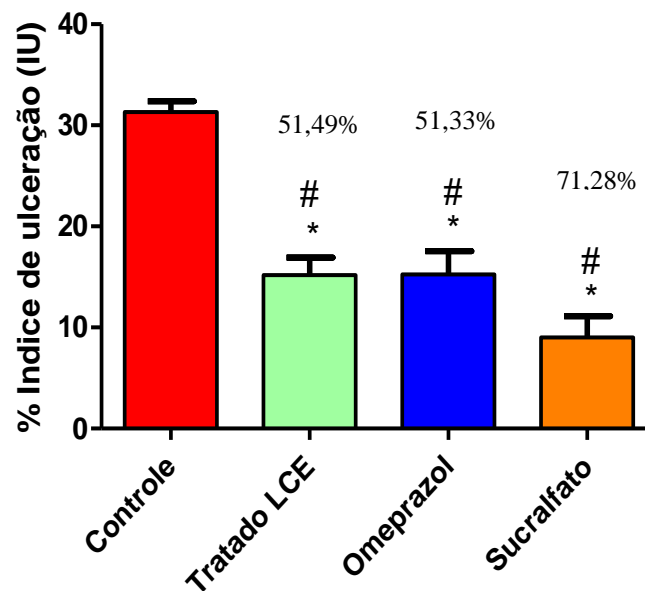


Figura 11: Efeito citoprotetor do LCE, sob úlceras gástricas induzidas por indometacina. Os animais receberam por via subcutânea como indutor de lesão (50 mg/Kg de indometacina), 30 minutos antes da indução o grupo controle n=6 recebeu (água 0,5ml/kg a.n), grupo tratado n=6 (LCE 0,1206 mg/kg a.n), grupo controle positivo n=5 (omeprazol 20mg/kg a.n) e grupo controle positivo n=5 (sucralfato 1g/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *post test* *Dunnett's e #Turkey's).

De acordo com a (figura 11) verificou-se que o grupo controle apresentou média de $31,33 \pm 2,62$, grupo tratado LCE de $15,20 \pm 4,21$, o grupo omeprazol de $15,25 \pm 4,43$ e o grupo sucralfato de $9 \pm 4,20$, indicando percentagens de redução em 51,49%, 51,33% e 71,28% respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados apontam que os animais tratados com o LCE possui efeito satisfatório, uma vez que, é capaz de inibir a área ulcerada e apresentar um percentual semelhante ao do grupo omeprazol que é um fármaco de referência.

5.3 ATIVIDADE CITOPROTETORA DO LCE EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL PA.

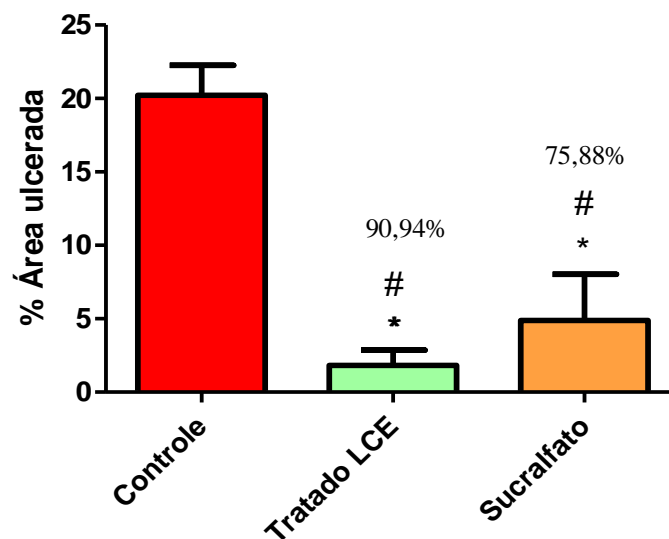


Figura 12: Efeito citoprotetor do LCE, sob lesões agudas induzidas por etanol P.A. Os grupos dos animais receberam etanol PA por via oral como indutor de lesões, 30 minutos antes o grupo controle n=6 recebeu (água 0,5ml/kg.a.n), grupo tratado n=6 (LCE 0,1206 mg/kg a.n) e o grupo controle positivo n=6 (sucralfato 1mg/kg.a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *pos test* *Dunnett's e #Turkey's).

Os resultados obtidos demonstrou que o grupo controle que recebeu somente veículo (água) apresentou intenso dano à mucosa gástrica após o tratamento com etanol apresentando média ± erro de área ulcerada de $20,23 \pm 2,03$. Já o grupo tratado com LCE apresentou média ± erro de área ulcerada de $1,83 \pm 1,02$ e capacidade de reduzir significativamente a área lesionada em 90,94% quando comparado ao grupo controle, mostrando-se promissor seu efeito citoprotetor. Já o grupo sucralfato apresentou média ± erro de $4,88 \pm 3,15$ e redução de 75,88% da área lesionada quando comparado ao grupo controle.

5.4 ATIVIDADE CICATRIZANTE DOLCE EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO (5% E 10%)

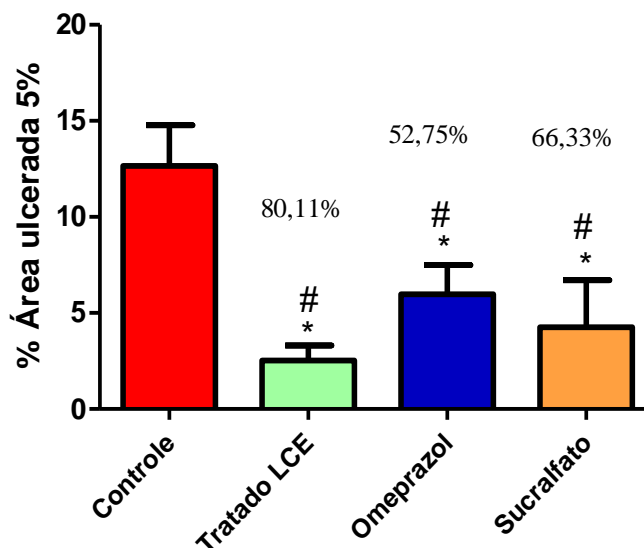


Figura 13: Efeito cicatrizante do LCE, sob úlceras induzidas por ácido acético a 5%. Os animais foram submetidos a laparotomia para a indução da lesão por ácido acético a 5%. Durante o tratamento de 8 dias os animais do grupo controle n=9 receberam (água 0,5ml/kg a.n), grupo tratado n=8 (LCE 0,1206mg/kg a.n), grupo controle positivo n=8 (omeprazol 20mg/kg a.n) e grupo controle positivo n=8 (sucralfato 1mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *post test* *Dunnett's e #Turkey's).

Neste modelo, as lesões gástricas induzidas por ácido acético à 5% apresentou média de área ulcerada pelos grupos submetidos de $12,66 \pm 2,11$ no grupo controle, $2,519 \pm 0,7873$ no grupo tratado LCE, $5,983 \pm 1,512$ no grupo omeprazol e $4,250 \pm 2,240$ no grupo sucralfato. Os animais que foram tratados com o LCE apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ao promover uma redução de área ulcerada em 80,11%. Os grupos omeprazol e sucralfato apresentaram percentual de redução da área ulcerada de 52,75% e 66,33%, respectivamente, considerados significativos quando comparados ao grupo controle.

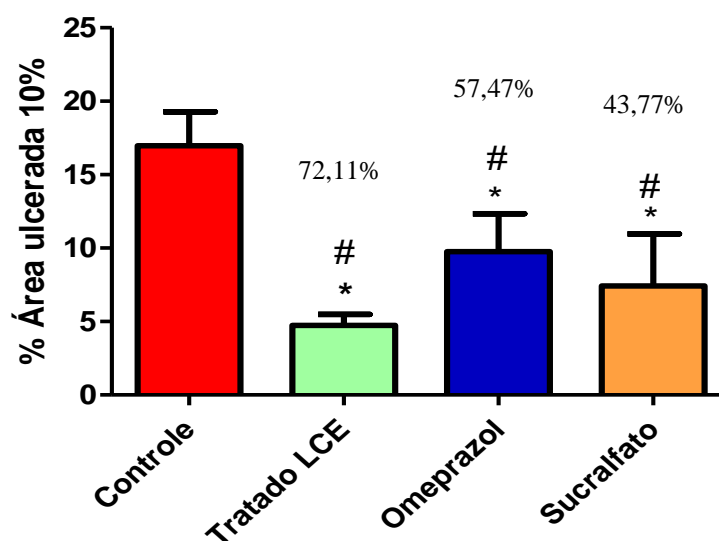


Figura 14: Efeito cicatrizante do LCE, sob úlceras induzidas por ácido acético a 10% . Os animais foram submetidos a laparotomia para a indução da lesão por ácido acético a 10%. Durante o tratamento de 8 dias os animais do grupo controle n=9 receberam (água 0,5ml/kg a.n), grupo tratado n=8 (LCE0,1206mg/kg a.n), grupo controle positivo n=8 (omeprazol 20mg/kg a.n) e grupo controle positivo n=8 (sucralfato 1mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *post test* *Dunnett's e #Turkey's).

As lesões gástricas induzidas por ácido acético à 10% apresentou média de área ulcerada no grupo controle de $16,98 \pm 2,307$. O grupo tratado com LCE promoveu melhora no processo de resolução da lesão gástrica reduzindo a área lesionada em 72,11% com média $4,737 \pm 0,7427$, apresentando-se diferente estatisticamente quando comparado ao grupo controle. Já o grupo omeprazol reduziu área lesionada em 57,47 % e o grupo sucralfato em 43,77%, ambos também com diferença significativa $p < 0,05$.

Diante dos resultados obtidos, percebeu-se que tanto na indução de lesões gástrica à 5% e 10% o LCE demonstrou atividade cicatrizante melhor que o omeprazol e o sucralfato, afirmando possivelmente que o mesmo possui atividade antiulcerogênica, que poderar futuramente servir como nova alternativa terapêutica no tratamento de úlcera gástrica.

5.5 COMPROVAÇÃO DAS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA, ETANOL E ACIDO ACETICO

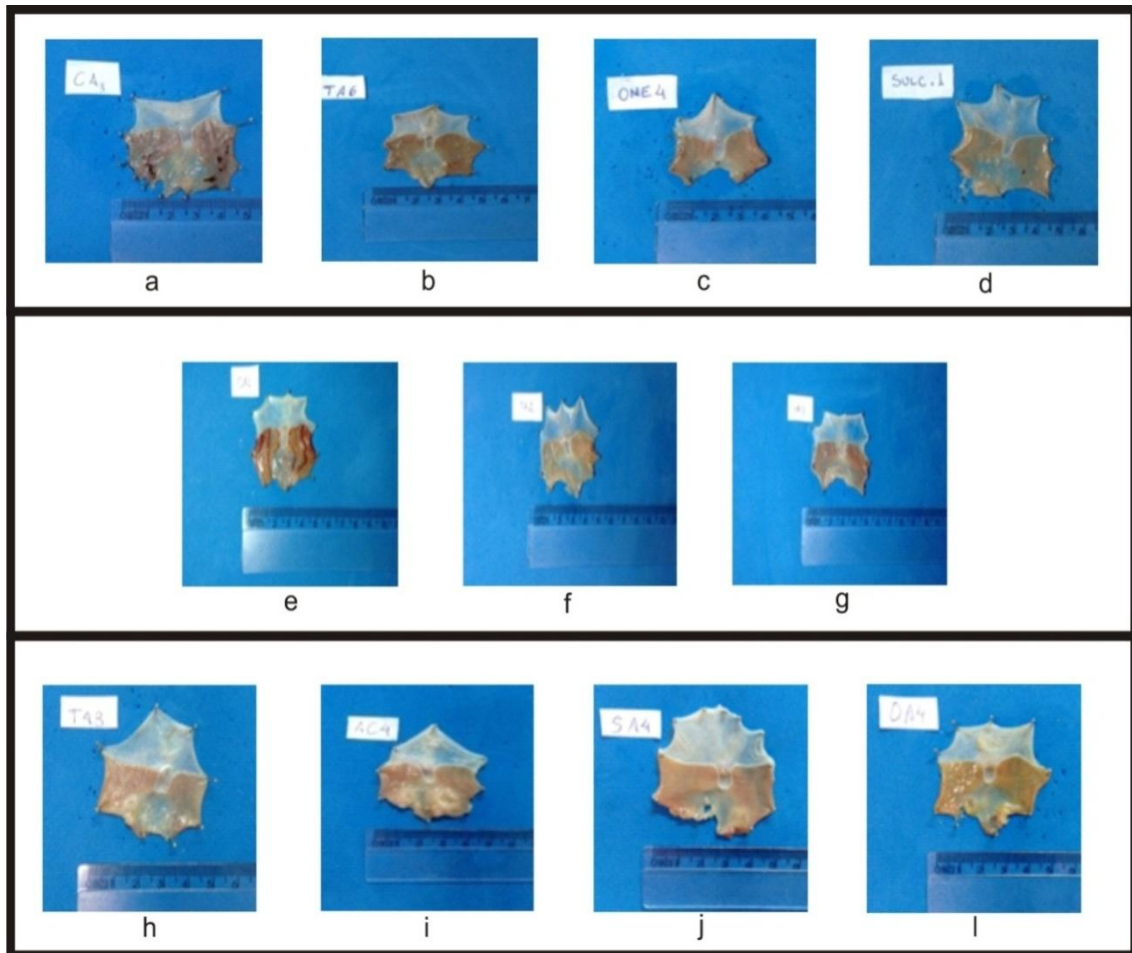


Figura 15: Imagens das Lesões gástricas induzidas por indometacina (a – grupo controle negativo, b – grupo tratado LCE, c – grupo positivo omeprazol e d – grupo positivo sucralfato). Lesões gástricas induzidas por etanol (e – grupo controle negativo, f – grupo tratado LCE e g – grupo positivo sucralfato). Lesões induzidas por ácido acético à 5% e 10% (h – grupo tratado LCE, i – grupo controle negativo, j – grupo positivo sucralfato e l – grupo positivo omeprazol).

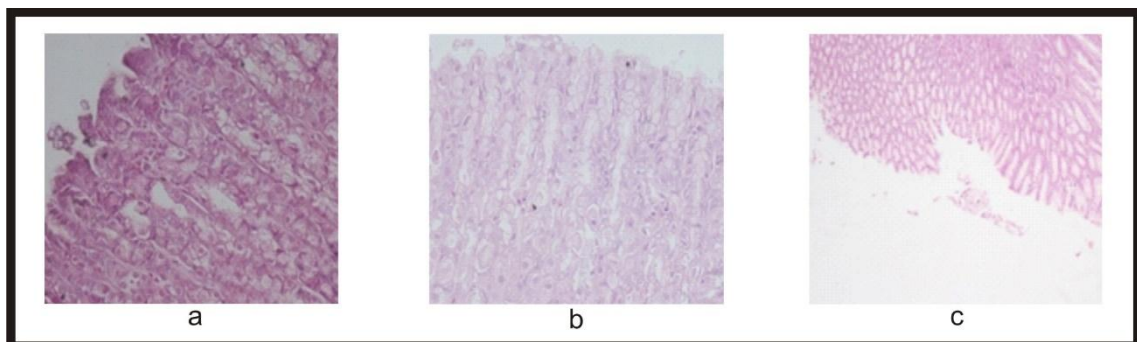


Figura 16: Imagens Histológicas das Lesões gástricas induzidas por indometacina (a), etanol (b) e por ácido acético à 5% e 10% (c).

Durante avaliação das lesões gástricas induzidas por indometacina e etanol observou-se grandes danos causados na mucosa gástrica. Quando avaliada as lesões histologicamente causadas pelo etanol observou-se rapidamente perda epitelial, hemorragias e necrose das células, uma vez, que essas são as principais conseqüências causada por este indutor. Verificou-se também efeito citoprotetor do LCE contra a ação da indometacina e etanol na mucosa gástrica, apresentando redução significativa de área ulcerada quando comparado aos demais grupos em estudo.

De acordo com as avaliações realizadas em úlceras gástricas induzidas por ácido acético observou-se que realmente esse tipo de ulcera é a qual mais assemelha-se á úlceras gástrica em humanos com forma redonda e necrótica conforme descrito na literatura, confirmando o efeito indutor do ácido acético e o efeito cicatrizante do LCE pela redução da área ulcerada ao ser comparada ao grupo controle.

5.6 EFEITO DO LCE SOBRE O pH DA SECREÇÃO GÁSTRICA

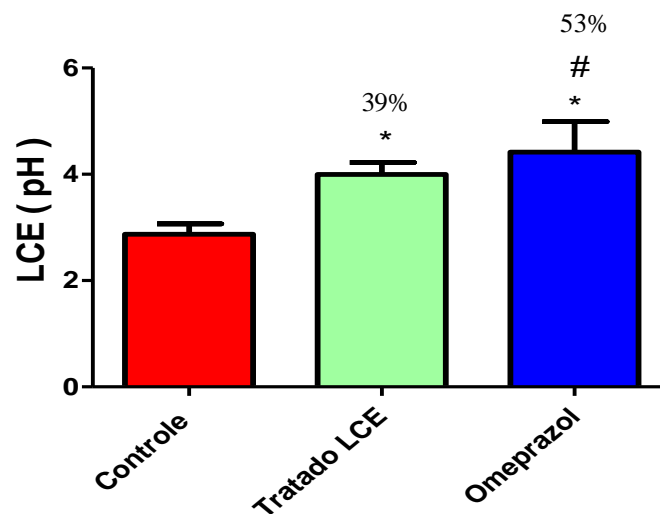


Figura 17: Efeito do LCE sob pH da secreção gástrica. Os animais receberam o tratamento por via intraduodenal. O grupo controle n=5 recebeu (1 ml solução salina 0,9%), grupo tratado n=6 recebeu (LCE 0,14 mg/kg a.n) e o grupo controle positivo n=5 recebeu (omeprazol 20 mg/kg.a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *pos test* *Dunnett's e #Turkey's).

De acordo com os resultados apurados o grupo controle que recebeu somente solução salina intraduodenal apresentou média $2,872 \pm 0,1945$, e o grupo tratado LCE apresentou média $3,998 \pm 0,2258$ e influência no aumento do pH da mucosa gástrica em 39% à mas quando comparado ao pH gástrico do grupo controle. Já o grupo omeprazol apresentou média $4,418 \pm 0,5743$ e aumento no pH de 53%, também apresentando-se diferente estatisticamente quando comparado ao grupo controle.

5.7 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

5.7.1. Avaliação da atividade antioxidante do LCE na técnica de DPPH

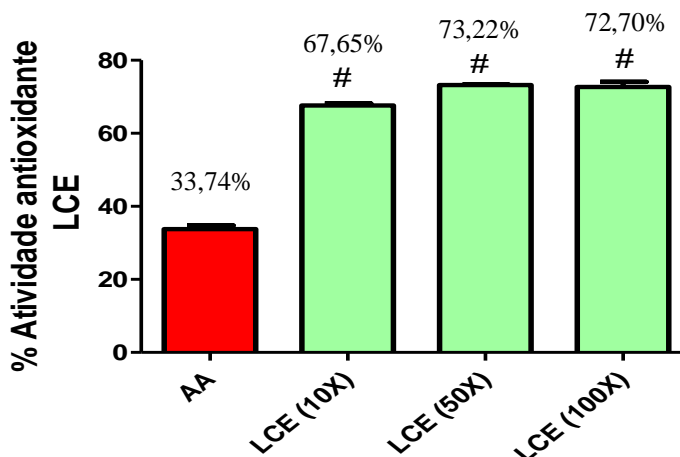


Figura 18: Efeito antioxidante do LCE na técnica de DPPH. Para se obter a atividade antioxidante do LCE, foi feita duas curvas, a primeira curva, com várias concentrações de DPPH (1 a 120 μM) e a segunda com o ácido ascórbico (antioxidante padrão) com concentrações similares a do DPPH. Foi feita diluições do (LCE 0,1206kg/0,5ml água destilada em 10X, 50X e 100X). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *pos test #Turkey's*).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o ácido ascórbico (AA) na maior concentração testada (120 μM) apresentou capacidade antioxidante aproximadamente 33,74% ($\pm 1,04$). Já nas diluições de 10X, 50X e 100X do LCE observou-se atividade antioxidante de 67,65% $\pm 0,52$, 73,22% $\pm 0,17$ e 72,70% $\pm 1,39$ respectivamente, quando comparado ao ácido ascórbico, um antioxidante usado como referência, mostrando-se com maior capacidade antioxidante na diluição de 50X.

5.7.2 Avaliação da concentração remanescente de DPPH observada nas concentrações de AA e diluições do LCE

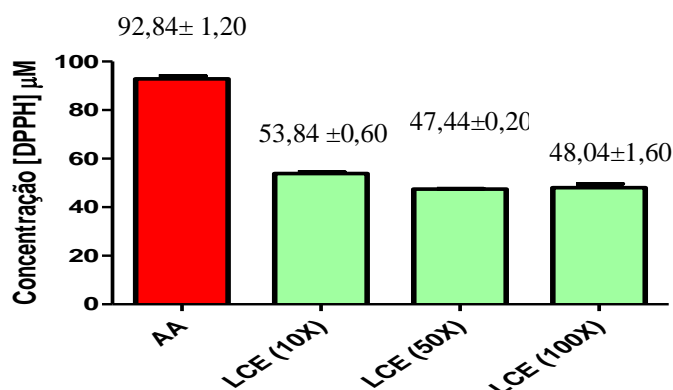


Figura 19: Concentração de DPPH remanescente nas concentrações de AA e nas diluições de LCE analisadas. Para se obter a atividade antioxidante do liofilizado, foi feita duas curvas, a primeira curva, com

várias concentrações de DPPH (1 a 120 μM) e a segunda com o ácido ascórbico (antioxidante padrão) com concentrações similares a do DPPH. Foi feita diluições do (LCE 0,1206kg/0,5ml água destilada em 10X, 50X e 100X). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p>0,05$ seguida de *pos test* *Dunnett's).

De acordo com os resultados obtidos, as médias da concentração de DPPH remanescente observada tanto nas concentrações de AA (120 μm) quanto nas diluições com o LCE em 10x, 50x e 100x foi de $92,84 \pm 1,20$, $53,84 \pm 0,60$, $47,44 \pm 0,20$ e $48,04 \pm 1,60$, respectivamente. Demonstrando que o LCE apresentou maior atividade antioxidante que o AA, uma vez que em todas as diluições com LCE a quantidade de DPPH encontrado foi menor com relação ao encontrado nas concentrações de AA.

5.7.3 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS em lesões gástricas induzidas por ácido acético à 5% e 10%.

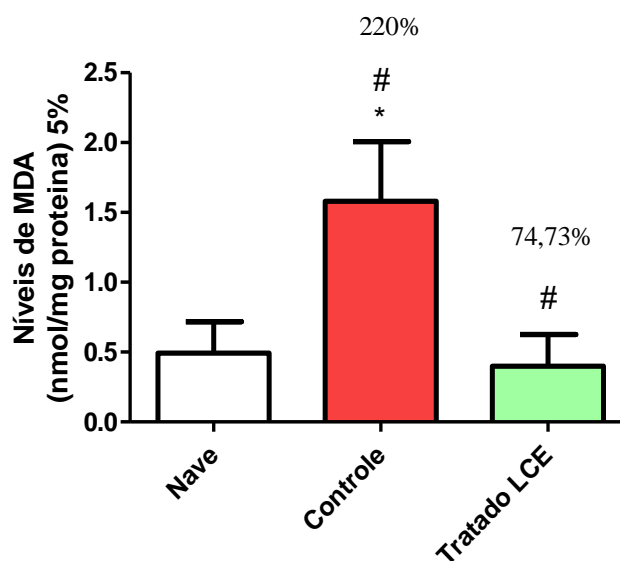


Figura 20: Níveis de peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS, em lesões crônicas induzida por ácido acético à 5%. Avaliou-se os grupos nave n=9 (normal), controle negativo n=8 (0,5ml/kg a.n) e tratado com LCE n=8 (0,1206 mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p>0,05$ seguida de *pos test* *Dunnett's e #Turkey's).

Através dos dados obtidos pelo método TBA-RS na indução por ácido acético a 5% a média encontrada dos níveis de malonaldeído no grupo nave foi de $0,492 \pm 0,0849$, grupo controle $1,579 \pm 0,219$ e no grupo tratado LCE $0,399 \pm 0,092$, demonstrando também que o grupo tratado com o LCE reduziu a peroxidação lipídica em 74,73% a mais, quando comparado ao grupo controle. Já o grupo controle apresentou peroxidação lipídica de 220% maior que a do grupo nave. Outro motivo que comprova o efeito cicatrizante do LCE é que não se diferenciou estatisticamente do grupo nave (grupo de animais sadios usado como

referência), logo somente o grupo controle eo grupo nave apresentaram diferença no *pos test* *Dunnett's e # turkey's o grupo tratado LCE diferiu-se do grupo controle.

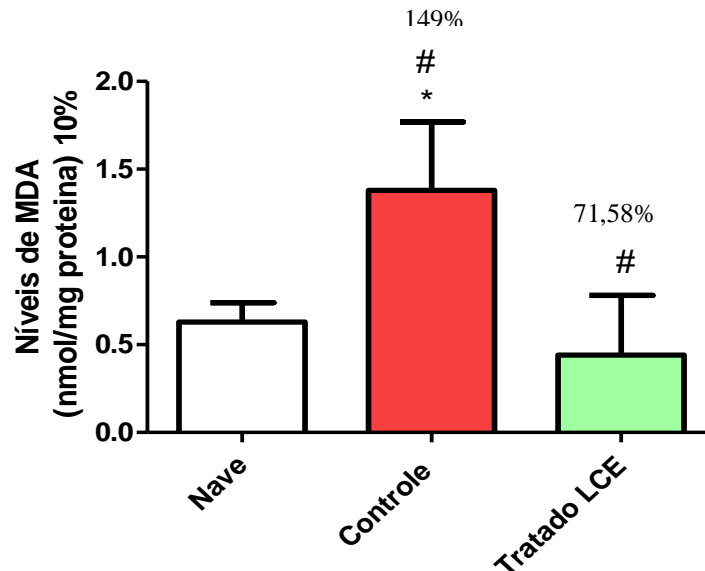


Figura 21: Níveis de peroxidação lipídica pelo método de TBA-RS, em lesões crônicas induzida por ácido acético á 10%. Avaliou-se os grupos naven=9 (normal), controle negativo n=8 (0,5ml/kg a.n) e tratado com LCE n=8 (0,1206 mg/kg a.n). Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância ANOVA, com diferença estatística $p > 0,05$ seguida de *pos test* *Dunnett's e #Turkey's).

De acordo com a peroxidação lipídica observada nos grupos em estudo pelo método TBA-RS por indução de lesões causadas por ácido acético á 10% observou-se que a média dos níveis de malonaldeído no grupo nave foi de $0,628 \pm 0,042$, grupo controle $1,567 \pm 0,234$ e no grupo tratado LCE foi de $0,441 \pm 0,12$. O grupo tratado LCE demonstrou sua atividade cicatrizante contra o estresse oxidativo provocado pelo ácido acético ao reduzir a peroxidação lipídica em 71,85% com relação ao grupo controle, ressaltando que o grupo controle apresentou peroxidação lipídica em torno de 149% maior que o grupo nave ($p < 0,05$ Anova, *post test* *Dunnett' s) e não diferindo-se estatisticamente do grupo nave.

6 DISCUSSÃO

Ao se tratar as varias opções terapêuticas já existentes no tratamento de úlceras gástricas, percebe-se que geralmente os medicamentos mais utilizados são os inibidores de bomba prótons como exemplo o omeprazol e de antagonistas de receptor de histamina H2 a cimetidina. Esses fármacos tem proporcionado a diminuição dos fatores lesivos da mucosa, mas essa terapia que apesar de ter seu ponto positivo acaba provocando o surgimento de efeitos colaterais e em muitos casos, ocorre a reincidentia da lesão gástrica. Isso se deve ao fato de ainda não existir um farmaco capaz de proporcionar uma melhora no tratamento citoprotetor e cicatrizante das lesões gastricas e impedir a ocorrência do retorno da doença quando seus pacientes interromper em a terapia medicamentosa.

Diante dos efeitos colaterais provocados pela utilização crônica de fármacos de referência na terapia medicamentosa para úlcera gástrica, se faz necessário investigar alternativas que agreguem efeitos farmacológicos capazes de promover a prevenção e a rápida cicatrização de úlceras, com redução/ausência de efeitos colaterais (BARKUN; LEONTIADIS, 2010).

Dessa forma, os estudos sobre os efeitos terapêuticos de plantas medicinais têm adquirido a devida importância por validarem o saber popular e por constituírem uma das principais ferramentas para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados com eficácia e comprovação do uso seguro. A medicina tradicional associada aqui na forma de fitoterapia também se constituem como uma ferramenta importante para elevar o acesso da população a terapêutica farmacológica medicamentosa, assim como oferecer novas opções terapêuticas para as diversas doenças, se possível, com redução dos efeitos colaterais que muitas vezes ocorre com o uso contínuo de fármacos de origem sintética. Vale ressaltar também o crescente numero de adaptos as terapias alternativas em todo mundo, das quais a fitoterapia tem vasta expressão.

Quanto a desorgens digestivas, estudos mostram a existência de uma grande variedade de plantas medicinais com atividade gastroprotetora, indicando que as plantas medicinais constituem uma importante fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas para o tratamento da úlcera gástrica (SCHMEDA-HIRSCHMANN & YESILADA, 2005).

É importante o papel desempenhado pelos modelos animais na busca de novas drogas, considerando que a etiologia das ulceras é multifatorial, as lesões na mucosa gastrointestinal provocadas pelo desbalanço entre os fatores protetores e lesivos da mucosa, podem ser

induzidas por diferentes modelos experimentais, como por AINES e outros agentes nocivos, como substâncias necrotizantes incluindo ácidos, dano por substâncias quentes, estresse e etanol, utilizando diversos mecanismos (SAMONINA *et al.*, 2004). A literatura já descreve potencial quimioprotetor através de modelos de citoproteção e cicatrização já existentes onde a indução das lesões é realizada de forma aguda por fármacos anti-inflamatórios, como a indometacina e por agentes necrosantes como etanol e na forma crônica por ácido acético para tratamentos aplicados com o liofilizado do Chá de outras espécies (BERENGUER *et al.*, 2006).

Para iniciar a avaliação da atividade citoprotetora do LCE utilizou-se o modelo de indução por indometacina, um potente inibidor não-seletivo da enzima ciclooxigenase, e elemento fundamental da cascata do ácido araquidônico. A indometacina pode ser administrada em dose única ou em múltiplas doses, provocando a inibição da ciclooxigenase e promovendo o bloqueio da produção de prostaglandinas, as quais são responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica por inibir a secreção ácida, estimular a secreção do muco e bicarbonato, inibir a ativação de mastócitos, diminuir a aderência leucocitária ao endotélio vascular e aumentar ou manter o fluxo sanguíneo da mucosa. (BONAMIN, 2010; SÜLEYMAN *et al.*, 2010). No protocolo experimental aplicado foi utilizado duas doses consecutivas no período global de 6 horas de indução.

A indometacina é uma droga anti-inflamatória não-esteroidal, um derivado indólico, amplamente utilizada na clínica para diversos tipos de doenças inflamatórias, como osteoartrite e gota. Experimentalmente se tornou um fármaco de primeira escolha para indução de lesão gástrica, devido ao seu maior potencial ulcerogênico, mediante outros fármacos da classe, e esse efeito se deve a sua capacidade de inibição tanto da enzima COX-1 como da COX-2. Classicamente se atribui os distúrbios gastrointestinais adversos desse medicamento, a sua capacidade de inibição da COX-1. Porém, diversos estudos apontam que, na realidade, ambas isoformas estão envolvidas no processo de citoproteção. A enzima COX é responsável por catalisar a primeira etapa da reação de síntese do ácido araquidônico em seus metabólitos: PG, tromboxano A₂, leucotrienos e prostaciclina, em condições fisiológicas a síntese de PG é mediada pela COX constitutiva (COX-1). Porém em processos inflamatórios, a outra isoforma (COX-2) é rapidamente induzida, e se torna responsável por esse processo, assim a inibição conjunta dessas enzimas leva à formação de lesão na mucosa gástrica (Suleyman *et al.*, 2010).

Os danos gástricos induzido pela indometacina e outros AINES também está relacionado à produção de EROs e peroxidação lipídica. O acúmulo de hidroperóxidos lipídicos cresce paralelamente ao desenvolvimento das lesões. A fonte de radicais de oxigênio não foi ainda determinada, mas possivelmente, os EROs são derivados de neutrófilos no início da patogênese das lesões, pois o dano induzido por indometacina pode ser significativamente reduzido pela depleção de neutrófilos da circulação. A Indometacina possui também atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética sendo utilizada em diversas condições inflamatórias crônicas, em virtude da sua efetiva supressão da dor, febre e edema (SÜLEYMAN *et al.*, 201; YOSHIKAWA *et al.*, 1993).

Quando avaliado o percentual de área lesionada no grupo tratado com o liofilizado LCE em nosso estudo, percebeu-se uma redução de 51,49%, quando comparado ao grupo controle, sugerindo que o liofilizado da espécie *Conocarpus erectus* L possui substâncias que em conjunto contribui para o efeito citoprotetor observado. Estes dados corroboram a resultados já descritos por Harbone (1982) em estudos de triagem fitoquímica realizado com extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus* L, demonstrando que os principais constituintes químicos indentificados foram flavonóides, saponinas e taninos. Os quais podem ser os principais responsáveis pelos resultados observados no animais do grupo tratado com LCE. Outro ponto que pode ter contribuído significativamente é a atividade antioxidante apresentada pelo LCE no ensaio de DPPH, sugerindo interferência direta também na produção de EROS formados no processo.

Como os resultados percentuais observados no grupo tratado com LCE de 51,49% e no grupo omeprazol 51,33%, foram muito próximos e sem diferença estatística entre ambos, verificou-se que o LCE apresenta efeito citoprotetor semelhante ao medicamento de referência, o que aumenta a expectativa da comprovação efetiva do LCE como um fitoterápico para úlceras gástricas. Uma vez que, o omeprazol constituíam um grupo positivo no que diz respeito a citoproteção gástrica.

O uso contínuo e crônico do omeprazol apresenta efeitos adversos como acefaléia, diarreia, aumento do risco de fraturas ósseas e maior susceptibilidade a certas infecções, como pneumonia. Também está associado ao aumento da gastrina responsável pela hipersecreção rebote de ácido gástrico após a interrupção do tratamento com IBPs, pois a hipersecreção de gastrina também está associada ao crescimento de tumores gastrointestinais e até mesma a reincidência da doença ulcerativa. Apesar da vasta utilidade do omeprazol como medicamento de referência é importante o estudo para a validação de produtos naturais que

possuem atividade citoprotetora, com a intenção de se obter terapias alternativas (COTE; HOWDEN, 2008).

No que diz respeito ao modelo de indução por etanol, as principais características da indução de úlcera gástrica por etanol são a perda epitelial, edema da mucosa e hemorragia sub-epitelial. O etanol penetra rapidamente na mucosa gástrica, a lesão é caracterizada por danos de membrana, hemorrágica erosiva, lesões com necrose das células, de coagulação difusa, esfoliação de células, múltiplas erosões, congestão vascular e formação distinta de úlcera (FARIA *et al.*, 2012).

O etanol afeta a barreira de muco encontrada na parede gástrica, com isso, tornando o epitélio gástrico mais sensível ao ataque do ácido produzido pelo estômago (WALLACE, 2001). Quando esse agente lesivo alcança o epitélio da mucosa, através do rompimento da barreira muco-bicarbonato, provoca a ruptura da parede dos vasos sanguíneos, gerando as hemorragias e os focos hiperêmicos comumente observados nos modelos experimentais (MINCIS *et al.*, 1995). O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e redução ao dos grupamentos sulfidrilícos não-proteicos (GSH) das células que são fatores importantes na proteção da mucosa gástrica (REPETTO & LESUY, 2002).

Ao analisar os resultados obtidos nesse modelo de indução verificou-se que o grupo tratado como LCE demonstrou percentagem de inibição das áreas lesionadas em 90,94% em relação ao grupo controle superando também o percentual expresso pelo o grupo sucralfato que inibiu 75,88% de área ulcerada. Estes resultados sugerem que o LCE possui atividade citoprotetora que supera a exibida pelo citoprotetor Sucralfato, que apesar da diferença acentuada nas percentagens de redução de área ulcerada apresentada entre o grupo LCE e o grupo sucralfato, estatisticamente estes não se diferem, fato que compara a magnitude da resposta do LCE com a do medicamento Sucralfim (sucralfato). A atividade citoprotetora do LCE pode estar relacionada pela presença de substâncias como flavonóides, taninos e saponinas, já que estudos fitoquímico da espécie *Conocarpus erectus L* comprovou sua atividade antioxidante e a presença dessas substâncias químicas em sua composição.

Os mecanismos gastroprotetores evidenciados nos modelos de indução de úlcera por etanol são variados. As drogas antiulcerogênicas que possuem propriedades antioxidantes tendem a proteger a mucosa de danos causados pelo estresse oxidativo induzidos pelo agente lesivo (MIZUI *et al.*, 1987). É possível ainda que a atividade citoprotetora neste modelo de indução seja devido ao fato de o extrato, liofilizado ou fração estar atuando apenas como uma

barreira física, exercendo, portanto uma ação mecânica formando uma película sobre a mucosa e impedindo que etanol removesse a camada de muco (TWARDOWSCHY, 2007).

Vale ressaltar que apesar do sucralfato ser considerado um dos melhores medicamentos comercializados no Brasil para o tratamento de úlceras gástricas, por evitar a ação de agente lesivos devido a formação de um filme espessando o muco, esse fármaco apresenta efeitos colaterais como diarreia, constipação, náuseas e vômitos. Além disso não impedem a recorrência das lesões (BRUTON *et al.*, 2006).

Além de avaliar a atividade citoprotetora do LCE em diferentes modelos de indução de úlcera gástrica, foi avaliado neste trabalho, a atividade cicatrizante, sendo escolhido o modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético. Este modelo experimental é o que mais se aproxima da doença úlcerosa humana, e o dano causado pelo ácido não se restringe somente a camada de muco e a submucosa, mas ele pode se estender até a camada muscular (BONAMIN *et al.*, 2011)

Segundo Okabe (2005) a indução por ácido acético é um modelo de úlcera crônica que muito se assemelha a úlceras em humanos tanto em termos de características patológicas como em mecanismos de cura, também é utilizado para desenvolver novas drogas anti-úlcera que possam potencialmente prevenir a recorrência da úlcera ou melhorar sua cicatrização. Atua na camada submucosa gástrica permitindo indução de úlceras penetrantes consistentes, com solução ácida necrosada a mucosa, úlceras profundas e com formato arredondado.

A cicatrização da úlcera gástrica é um processo complexo, que inclui a reconstrução da mucosa através da formação do tecido de granulação na base da úlcera, angiogênese e o reestabelecimento da arquitetura glandular. Neste processo, é importante a participação da PG gerada pela COX-2, já que essa estimula a proliferação celular, promove angiogênese e restaura a integridade da mucosa. Esse envolvimento da PG foi constatado quando há administração de inibidores seletivos de COX-2, o processo de cicatrização é diminuído, e isso é acompanhado de uma diminuição dos níveis de PG. Como nos modelos agudos o LCE mostrou atuação sobre a regulação de PGs, pode-se esperar que ela também atue sobre essa via na cicatrização, justificando a atividade tão expressiva. O processo de cicatrização também envolve a expressão local de diversos fatores de crescimento na área ulcerada, como o: EGF, TGF α , HGF e bFGF, além da gastrina (KONTUREK *et al.*, 2005).

Além de proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas pela indometacina e etanol, o CLE também foi capaz de aumentar a capacidade de resolução das lesões gástricas

induzidas com ácido acético. Diante dos resultados obtidos tanto na indução á 5% e 10% o LCE foi capaz de reduzir a área ulcerada em 80,11% e 72,11% respectivamente, todos apresentando diferença estatística. E, diante desses resultados o grupo tratado com LCE demonstrou-se melhor atividade cicatrizante quando comparado aos grupos tratados com os medicamentos de referência omeprazol e sucralfato, conforme descrito na (fig..)

Esses resultados são semelhantes com estudos já realizados por Silva (2012) com a espécie *Terminalia catappa* pertencente a família combretaceae, sua atividade cicatrizante foi avaliada através do modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético utilizando extrato etanolico bruto das folhas (25 mg/Kg) com tratamento durante 8 dias apresentando diminuição significativa de área lesionada em 80%. Portanto, a espécie *Terminalia catappa* além do mecanismo gastroprotetor já evidenciado, confirmou-se também sua atividade cicatrizante sobre a mucosa gástrica.

No modelo de ligadura de piloro os resultados obtidos demonstraram a influência no aumento no pH da secreção gástrica no grupo tratado com LCE foi de 39% maior que o expressado pelo grupo controle. Valendo ressaltar que, o grupo omeprazol – inibidor clássico de secreção ácida, promoveu um aumento nos valores de pH em 53% somente.(fig..)

O aumento do pH intragástrico observado no grupo tratado com LCE, não se deve a neutralização direta do conteúdo estomacal, uma vez que o LCE apresentou um pH=6. Esses resultados sugeriram então, uma possível modulação nos mecanismo de secreção ácida e que posteriormente devem ser eliminados, pois o mesmo pode está atuando na liberação de histamina, na resposta colinérgica, na resposta hormonal da mucosa com a diminuição da gástrina e aumento da somatostatina ou atuando diretamente na H⁺K⁺ -ATPase. Portanto, apesar dos resultados promissores, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos relacionados a espécie *Conocarpus erectus* L, uma vez que existe carência na literatura de trabalhos que relatem propriedades e/ou potencial observado nos resultados deste trabalho.

Os resultados obtidos no estudo realizado por Lima (2011), a espécie *Combretum duarteanum* pertencente a família combretaceae, que avaliou parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura de piloro como o volume do suco gástrico, pH e concentração e H⁺ que ao ser analisado nos EEtOH (250 mg/kg) e FaHex (250 mg/kg) demonstrou-se que não houve alterações significativa no parametros avaliados, assim, os resultados sugeriram que a ação gastroprotetora do EEtOH e FaHex da especie em estudo não está relacionada a redução da secreção ácida gástrica.

Dada a suma importância dos sistemas antioxidantes no restabelecimento da homeostasia da mucosa gástrica, objetivando-se melhor na compreensão dos mecanismos pelos quais a espécie *Conocarpus erectus* L promove a melhora das úlceras crônicas induzidas por ácido acético, decidimos avaliar a capacidade antioxidante do LCE através da atividade seqüestradora de radical DPPH.

A atividade seqüestradora de radicais livres do LCE foi realizada por meio da reação com DPPH. O DPPH é um radical livre estável potencialmente reativo. A capacidade antioxidante do LCE confirmado a partir de análises feitas nas diluições do LCE feitas em 10x, 50x e 100x onde as mesmas apresentaram atividade seqüestradora de radical DPPH maior que o ácido ascórbico usado como padrão. Outro fator positivo que reconfirmou sua atividade antioxidante foi através da avaliação das médias de concentração de DPPH remanescente observada tanto na concentração de AA (120µm) quanto nas amostras diluídas do LCE, demonstrando que o DPPH foi observado em menor quantidade nas diluições do LCE, conforme visto na (fig..).

O processo oxidativo pode ser caracterizado, entre outros fatores, pela peroxidação lipídica da membrana das células do tecido lesado, consequência gerada pelo desequilíbrio dos mecanismos de defesa do organismo em relação ao número de substâncias oxidantes produzidas pelo agente indutor da lesão ou ainda por alterações bioquímicas do próprio organismo (LIH-BRODY *et al*, 1996). A taxa de peroxidação lipídica neste trabalho foi mensurada pelo método-TBA-RS aperfeiçoada. Este método é utilizado para fazer a quantificação da formação de malonaldeído durante a peroxidação lipídica.

Na avaliação realizada sobre a peroxidação lipídica causada por lesões crônicas induzida por ácido acético á 5% e 10% pelo método de TBA-RS, demonstrou-se que o efeito cicatrizante do LCE na indução á 5% e 10% estava diretamente ligada as médias dos níveis de malonaldeído encontrada nas amostras dos grupos em estudo, onde grupo tratado com o LCE foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica em 74,73% na indução à 5% e 71,85% na de 10%, ambos quando comparados ao grupo controle negativo, não havendo diferença estatística com o grupo nave. Os resultados demonstraram que entre os grupos controle e nave (5% e 10%) foi observado uma peroxidação lipídica no grupo controle de 220% e 149%, respectivamente, a mais que o grupo nave, ambos ($p < 0,05$ Anova, post test Dunnett e Turkey's).

Logo, os resultados obtidos nas avaliações sobre a atividade antioxidante no ensaio de DPPH e da avaliação da peroxidação lipídica pelo método TBA-RS, já foi observada em

estudos com outras espécies e famílias diferente da família combretaceae. Ainda são muito poucos os estudos sobre está família e principalmente da espécie *Conocarpus erectus* L na literatura, o que valoriza a realização deste trabalho.

Portanto, os resultados até aqui apresentados nos levam a sugerir que a espécie *Conocarpus erectus* L apresenta promissora atividade citiprotetora e cicatrizante, podendo está relacionada com as propriedades existente em sua composição. Cabendo uma moior investigação sobre o mecanismo da atividade antisecretora e antioxidante.

7 CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos nesse trabalho, relacionado a avaliação da atividade citoprotetora e cicatrizante do LCE, obtido das cascas da espécie *Conocarpus erectus* L, em modelos de indução de úlceras que estão relacionado as conseqüências desta patologia em humanos, foi possível concluir que:

- ✓ O LCE apresenta atividade citoprotetora sobre os agente indutores lesões indometacina e etanol absoluto.
- ✓ O LCE apresenta atividade cicatrizante no modelo de úlceras induzidas por ácido acético á 5% e 10%.
- ✓ O LCE apresentou efeito antissecretor por aumentar o pH da secreção ácida gástrica contribuindo para a manutenção da integridade da mucosa.
- ✓ O LCE apresenta atividade antioxidante pela sua capacidade de seqüestrar radicais livres.
- ✓ O LCE tem capacidade de reduzir a peroxidação lipídica em em úlceras induzidas por ácido acético á 5% e 10%.

REFERÊNCIAS

Abdel-Hameed, Abdel SA B and Sabra NA.2013.**Protective Effect of *Conocarpus erectus* .Extracts on CC 14-Induced Chronic Liver Injury in Mice.** Global J Pharm7: 52-60.

ABITBOL, R. A. Doença ulcerosa peptica. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed /dup.htm>. Acesso em 24 de março de 2013.

AIRES, M. (2008).**Sistema Digestivo. In: D. L. Sanioto, *Fisiologia*** (pp. 652-680). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 4º ed.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. **Gastroduodenal mucusbicarbonatebarrier:protection againstacid and pepsin.** *American Journal of Physiology-CellPhysiology*, 288(1): C1-C19, 2005.

ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciencia. *Vivências.v.17, n 12, p.51-60, 2011.*

BANDEIRA AR G. 2003. **Estudo Fitoquímico e a Atividade Biológica de *Conocarpus erectus* L.**(Mangue Botão).

BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. **Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease.** *Am. J. Med.*, v. 123, n. 4, p. 358-366, 2010.

BAYR , H. Reactive oxygen species. **Crit Care Med.** v.33, n,12, p.498-501, 2005.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia: 5ª Edição.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BERENGUER, B.; SÁNCHEZ, L. M.; QUÍLEZ, A.; LÓPEZ-BARREIRO, M.; DE HARO, O. GÁLVEZ, J. MARTIN, M. J. Protective and antioxodant effectsof *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 194-200, 2006.

BONAMIN, F. Atividade antiulcerogênica e avaliação dos mecanismos de ação antiulcerogênica do β - Mirceno, 2010. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

BONAMIN, F.; *et al.* Can a Strychnos species be used as antiulcer agent? Ulcer healing action from alkaloid fraction of Strychnos pseudoquina St. Hil. (Loganiaceae) **J. Ethnopharmacol.**, 138: 47-51, 2011.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11ª Edição. United States of America: McGraw-Hill Companies, Inc., 2006.

BRZOZOWSKI, T. (2003). **Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment - Polish achievements**. *Journal Physiology and Pharmacology* 54(3) , 99-126.

BRZOZOWSKI T, TARNAWSKI A, HOLLANDER D, SEKHON S, KRAUSE WJ, GERGELY H. Comparison of prostaglandin and cimetidine in protection of isolated gastric glands against indomethacin injury. **J. Physiol Pharmacol.**, v.56, suplemento 5, pg.75-88, 2005.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a ciclooxigenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proceedings of the National Academy Sciences*, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHO, C. H. **Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders**. *J. Physiol. Paris*, v. 95, n. 1-6, p. 253-256, 2001.

COELHO. **Projetos Diretrizes: Úlcera péptica**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Federação Brasileira de Gastroenterologia. Ed, 2003.

COTE, G.A ; HOWDEN, C.W. Potential adverse effects of proton pump inhibitors. *Curr Gastroenterol Rep.* v. 10, p 208-214, 2008.

CNUBBEN, N. H. P., RIETJENS, I. M. C. M., WORTELBOER, H., van ZANDEN, J. & van BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, v.10, p.141-152, 2001.

DANGELO, J.G; FATTINI, C.A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

FARIAS, F. M., ALMEIDA, A. C., FERREIRA, A. L., DUNDER, R. J., TAKAYAMA, C., SILVA, M. S., et al. (2012). Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology* 139 , 234– 243.

FRY, C .Secretions of the salivary glands and stomach. *Basic Science*, v. 27, p. 503-506, 2009.

FOX, S. I. *Fisiologia humana*. -7^o ed.- Barueri, SP: Manole, 2007.

GUDIS K, SAKAMOTO C. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. *Digestive Diseases and Sciences*.2005; 50:16-23.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford, UK: Clarendon Press; 2007.

HARBORNE JB. 1982. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*, 2nd ed., Londres: Publisher Chapman & Hallde, 278 p.

HOOGERWERF, W. A. & PASRICHA, P. J. **Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease**. *In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. Goodman's & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics*. 11th Edition, McGraw-Hill, International edition, p.1005-1020, 2012.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JARDIM, M. A. G et al, **Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Barbara do Pará , Pará, Brasil**; Revista Brasileira de Farmacologia p.21-25, 2007.

JONES, D.P. 2006 .Redefining oxidative stress .Antioxid.Redox Signal, 8.1865-1879.

JORGE, R., LEITE, J., OLIVEIRA, A., & TAGLIATI, C. (2004). **Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities.** *Journal of Ethnopharmacology* 194 , 93–100.

JUNQUEIRA, L. C., & CARNEIRO, J. (2008). **Histologia Básica.** In: L. C. Junqueira, & J. Carneiro, *O Trato Digestivo* (pp. 291-300). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 11ª Ed.

KATO, S., Ohkawa, Y., Ito, K., Amagase, K., Takeuchi, K., 2009.Role of endothelial nitric oxide synthase in aggravation of indomethacin-induced gastric damage in adjuvant arthritic rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 147-155.

KAWANO, S.; TSUJI, S. **Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection.** *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 15, p.D1- D6, 2000.

KONTUREK PC, KONTUREK SJ, OCHMANSKI W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **Eur J Pharmacol**, v. 19, pg.15-27, 2004.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **J. Physiol. Pharmacol.**, 56 (5): 5-31, 2005.

KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. **Nitric oxide and intestinal inflammation.** *Am.J. Med.*, 109(2): 150-158, 2000.

KUO, P. C., & SCHROEDER, R. A. (1995). **The emerging multifaceted roles of nitric oxide.** *Annals of Surgery* , 220-235.

KUMMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., & ASTER, J. C. (2010). Bases Patológicas das Doenças. In: R. & Cotran., *Sistema Digestivo* (pp. 1005-1020). Rio de Janeiro: Elsevier.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWASKI, A. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside.** *Gastroenterology*, 135: 135-141, 2008.

Linsigen, L.V.; Cervi, A.C. & Guimarães, O. 2009. **Sinopse taxonômica da família Combretaceae R. Brown na Região Sul do Brasil.** *Acta Botanica Brasilica* 23: 738-750.

LORENZI, H ; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil:** Instituto Plantarim, Nova odessa, 2002.

MARQUETE, N.F.S. 2012. **Combretaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000090>> Acesso em 20 março 2012.

MELLO, V.J., Gomes, M.T.R., Lemos, F.O., Delfino, J.L., Andrade, S.P., Lopes, M.T.P., Salas, C.E., 2008. **The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*.** *Phytomedicine* 15, 237-244.

MINCISSET, M, et al. **Etanol e Trato Gastrointestinal.** *Arq . Gastroenterol.*, v. 32, p 131-139, 1995.

MIZUI, T.: DOUTEUCHI, M **lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats.** *Life Sciences*, v. 38 n.23 p 2167-2167, 1987.

MOMTAZ, H., SOUOD, N., DABIRI, H., & SARSHAR, M. (2012). **Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples.** *World Journal Gastroenterology* 18 (17) , 2105-2111.

MOTA, K. S. D.*et al.* **Flavonoids with Gastroprotective Activity.***Molecules* [S.I.], v. 14, n. 3, p. 979-1012, Mar 2009.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 31, p. 1287 – 1312, 2001.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development . 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals, Oecd 423. **Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method.**Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models —The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research.**Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.8, 2005.

OMS, O. M. (10 de maio de 2014). **Portal do Ministério da Saúde.** Fonte: World Health Organization.

Disponível: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v4n9_erradicacao_hpylori.pdf

PARK, J. S. (2000). **Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats.***Life Sciences* 67 , 3087-3093.

PINTO, A. A. C; MADURO, C. B. **Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima.***Acte Amazonica*, vol 33, n° 2, p.281-290, 2003.

RAMAKRISHNAN, K., SALINAS, R. C. (2007). "Peptic Ulcer Disease." *American Family Physician* 76.

RADOMSKI, M. W.,& MONCADA, S. (1993). **Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide.** *ThrombHaemost*70 , 36-41.

REBOUÇAS, Jia Deng, Yimeng Gao, Liancan Zhu, Rui He, , Yingqian Xu. **The screening toolbox of bioactive substances from natural products.***Areview. Fitoterapia*82 , 1141–1151, 2011.

REPETTO, M. G.; Llesuy, S. F. *Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 35, 523-534, 2002.

RIBEIRO, R.T.M.; Silva, N.M.F.; Loiola, M.I.B. *Combretaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6910>>. Acesso em: 01 Set. 2017

ROBERT, A., 1979. **Cytoprotection by prostaglandins**. *Gastroenterology* 77, 761-767.

RODRÍGUEZ-TÉLLEZ, M. et al. **Anti-inflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract**. *Curr.Pharm. Des.*, v. 7, p. 951-976, 2001.

SACHS, G., SHIN, J. M., VAGIN, O., LAMBRECHT, N., YAKUBOV, I., & MUNSON, K. (2010). **The Gastric H,K ATPase as a Drug Target: Past, Present, and Future**. *Journal of Clinical Gastroenterology* , 226–242.

SAMONINA, G et al. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology**, v.11, p. 1–6, 2004.

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

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; Yesilada, E. *Traditional medicine and gastroprotective crude drugs*. *Journal of ethnopharmacology*, 100, 61-66, 2005.

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**. *Gastroenterology*, v. 134, p. 1842 – 1860, 2008.

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

SENER-MURATOGLU, G.; PASKALOGLU, K.; ARBAK, S.; HURDAG, C.; YANOGLU-DULGER, G. **Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats.** *Dig. Dis. Sci.*, 46(2): 318-330, 2001.

SILVEIRA, P., BANDEIRA, M., & ARRAIS, P. (2008). **Farmaco vigilância e reações adversas as plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade.** *British Journal of Pharmacology* 18(4), 618-626.

SILVERTHORN, D. U. (2010). **Fisiologia Humana**. Porto Alegre: Artemed.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, fevereiro 352-355, 2007.

STACE, C.A. 2004. Combretaceae. Pp. 110-111, fig. 55, pl 15. In: N. Smith; S.A. Mori; A. Henderson; D.W. Stevenson & S.V. Heald (eds.). **Flowering Plants of the Neotropics. United Kingdom, The New York Botanical Garden.** Princeton University Press.

TAKAGI, E.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effect of several drugs on healing. **Japanese Journal of Pharmacology**. v.19, p.416-426, 1969.

TARNAWSKI A., AHLUWALIA, A., JONES M.K. (2013). **"Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids."** *Current Pharmaceutical Design* 19(1): 126-132.

TWARDOWSCHY, A. **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Grieb (Bignoniaceae).** Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/11762>> acesso em: 05 jan. 2010, 2007.

TARIQ, M.; ELFAKI, I.; KHAN, H.A.; ARSHADUDDIN, M.; SOBKI, S.; ALMOUTAERY, M. **Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates**

chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. *WorldJournal of Gastroenterology*, 12(36): 5798-5804, 2006.

TSUKIMI, Y., OKABE, S. (1994). "**Validity of kissing gastric ulcers induced in rats for screening of antiulcer drugs.**" *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9: 60-65.

TOMLINSON, P.B. **The Biology of Trees Native to Tropical Florida.**2006.Harvard University Printing Office.

VALKO, M. Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T. Mazur , M, Telser, J, 2007. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease .***Int .J Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84

WALLACE, J. L., & MILLER, M. J. (2000).**Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way.***Gastroenterology*119 , 512-520.


WALLACE, J. **Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research.***Am J Med*, v.110, p. 19S–23S, 2001.

WALLACE, J. L.; DEVCHAND, P.R. **Emerging role for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense.** *Brit. J. Pharmacol.*, 145: 275-282, 2005.

YOSHIKAWA, T. ; NAITO, Y. ; KISHI, A. ; TOMII, T. ; KANEKO, T. ;IINUMA, S. ; ICHIKAWA, H. ; YASUDA, M. ; TAKAHASHI, S. ;KONDO, M. **Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants inthe pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats.***Gut.*, 34(6): 732-737, 1993.


ZELICKSON, M.S., et al. **Helicobacter pylori is not the predominant etiology for peptic ulcers requiring operation.** *Am Surg.* 77:1054–1060, 2011.

ANEXO



**comitê de ética em pesquisa
com animais de experimentação**





PARECER CEPAE 023-2015

Projeto: Avaliação da atividade cicatrizante gástrica e de parâmetros toxicológicos: bioquímicos, histopatológicos e eletrofisiológicos relacionados ao uso das plantas medicinais *Conocarpus erectus*, *Laguncularia racemosa*, *Rhizophora mangle* L. no tratamento de desordens digestivas: Aspectos relacionados ao risco de envenenamento e medicina tradicional.

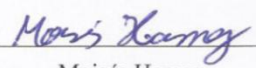
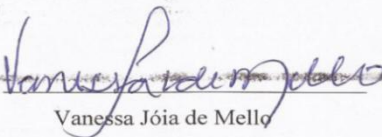
Coordenador: Profa. Dra. Vanessa Jóia de Mallo
Área Temática: Farmacologia

Vigência: 05./06./2015.a.05./06./2017

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação e apresentação de toda a documentação necessária para o cumprimento da legislação vigente Lei 11.794. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria No 0276/2015 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais 156 ratos Wistar, nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 19 de Maio de 2015

 Moisés Hamoy Presidente do CEPAE-UFPA	 Vanessa Jóia de Mallo Vice-Presidente do CEPAE-UFPA
---	--

