

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS

**Laísa Pinheiro da Silva**



**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS  
NAS ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E CICATRIZANTE  
DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO A PARTIR DAS  
FOLHAS DE *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE)**

**ORIENTADORA: PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (AC: Farmacologia).

Botucatu – SP

2012



**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS  
NAS ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E CICATRIZANTE  
DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO A PARTIR DAS  
FOLHAS DE *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE)**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Silva, Laísa Pinheiro da

Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e cicatrizante do extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE) / Laísa Pinheiro da Silva. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 21001006

1. Estômago – Úlceras. 2. *Terminalia*. 3. Taninos.

Palavras-chave: Taninos hidrolisáveis; *Terminalia catappa*; Úlcera gástrica.



# Laísa Pinheiro da Silva



## **AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NAS ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO A PARTIR DAS FOLHAS DE *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (AC: Farmacologia).

### **Comissão Examinadora:**

**1º Titular/Presidente:** Profª. Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima (UNESP/Botucatu)

**2º Titular:** Prof. Titular Wagner Villegas (UNESP/Araraquara)

**3º Titular:** Prof. Dr. Walber Toma (UNISANTA/Santos)

Botucatu  
2012

Auxílio Financeiro: **FAPESP**  
(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)



## *Um dia você aprende que...*

*Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar a alma.*

*E você aprende que amar não significa apoiar-se e que companhia nem sempre significa segurança.*

*E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas*

*E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os nossos planos e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.*

*Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.*

*E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam...*

*E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.*

*E aprende que falar pode aliviar dores emocionais.....*

*E descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la.*

*E percebe que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrependerá pelo resto da vida...*

*E aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.*

*E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.*

*E descobre que devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pois pode ser a última vez que as vejamos....*

*E aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.*

*E começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que se pode ser.*

*E descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser....e que o tempo é curto.*

*E aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo....mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve.*

*E aprende que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existirão dois lados..... E descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se. E aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiências que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou.*

*E aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não lhe dá o direito de ser cruel.*

*E descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não sabe amar...*

*pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.*

*E aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes, você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo.*

*E aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.*

*E aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma,*

*ao invés de esperar que alguém lhe traga flores...*

**(Autor desconhecido)**

# *Agradecimientos*

*Este trabalho não teria sido elaborado sem o auxílio de diversas pessoas às quais quero expressar meus sinceros agradecimentos. Começo então agradecendo,*

*À Prof Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima, e à Profa. Dra Lúcia Regina Machado da Rocha, pela orientação e suporte para o trabalho; Ao Prof. Wagner Vilegas por ter participado da banca de defesa e ter contribuído ao trabalho;*

*Aos meus colegas de laboratório: Katharinne, Célio, Flávia, Catarine, Raquel, Paty, Thiago, Ellen, Vânia, Juliana, Fernando, Larissa, Maycon e Geisy por todas as ajudas nos experimentos;*

*Em especial, agradeço à Katharinne, minha amiga e grande companheira de laboratório, que não sabe quem é o cientista Beackman, os Muppets e quiçá comeu nozes em sua vida rs. E que me fez passar momentos únicos, de rir quando a situação no horizonte era negra, mas de sempre ter o pensamento de que “Eu não vim até aqui pra desistir agora”- Engenheiros do Havaí. Também agradeço especialmente à Flávia-Kalose (Tia) por simplesmente trazer luz e alegria a todos os experimentos e momentos no laboratório, ensinando-me que não importa onde você esteja sempre existirá alguém em quem você pode confiar e que te faz acreditar que vale a pena aquilo que você está fazendo. Além do que, deu a incrível oportunidade de passar momentos felizes ao lado de ícones da Jovem “Velha” Guarda, ou melhor, do laboratório – Roberto Carlos, Erasmo Carlos e Wanderléia rrsrsrs. À Vânia e ao Maycon, que também foram pessoas únicas, que embora a primeira impressão não tenha sido boa, me surpreenderam e se tornaram importantes. E, por fim, ao Célio, companheiro não apenas de mestrado, mas também de graduação, longos 6 anos de convivência, que apesar de todas as brigas e minha grande impaciência com a sua teimosia, me ajudou muito e se mostrou ser uma pessoa extremamente*

“evoluída”, nunca perdendo a fé e o bom senso, sempre sabendo onde chegar;

**Aos funcionários do Departamento de Fisiologia** pelos auxílios gerais durante o projeto. Em especial ao **Hélio “Pon-pon”** por toda a sua disposição e generosidade em ajudar, apesar de todo o seu conhecimento e habilidades, sempre se mostrou humilde, e realmente me fez ter a fé de que se é possível ter títulos acadêmicos, e mesmo assim continuar a ser humano;

À **Janete, Seu Jr. e Lilian** pela AMIZADE e “bom humor” diariamente;

**Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação** por todos os auxílios;

Ao **“Pessoal do Di Stasi”** pela AMIZADE e por compartilhar comigo taaantas vezes o laboratório de vocês, em especial à **Patrícia**, pelo companheirismo em muitos experimentos, e à **Ana Elisa**, pelas inúmeras ajudas!!!!;

À **pós-doutoranda Flávia Delella**, pela ajuda com as metaloproteinases, e também o **peçoal do laboratório da Profa. Alba, Unicamp**, pelos experimentos de western blot, e ao pessoal do laboratório de Fitoquímica da Unesp-Araquara, em especial ao José Francisco, e a profa. Lourdes, pelo suporte;

**Aos Professores do Programa**, por sua generosidade em ensinar, em especial ao **Prof. Dr. André Sampaio Pupo**, que mudou minha forma de ver a farmacologia, e por não me fazer desacreditar no rumo que eu tinha escolhido;

À minha família; **Mãe (Sara)** por apesar de contrariada me apoiar na mudança para Botucatu, e me ajudar em todos os momentos difíceis, lembrando que eu tinha que cuidar de mim. **Pai (Robson)** por ter dado todo o suporte necessário para que essa nova etapa na minha vida

*acontecesse, além de dar o suporte acadêmico necessário, porque além de pai é docente também! **Regina** por sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando eu mesma duvidava dele. **Vô (Noel)** por nunca ter me desencorajado, e por ter me dado o exemplo de vida que eu preciso para seguir em frente. **Vó (Valdecina)**, que apesar de ter falecido no meio do caminho, fez o que pode, sempre, para que eu estivesse aqui, e que apesar de o vazio no meu peito ser enorme, eu tenho certeza que completar essa etapa a encheria de orgulho, e me motivou a ter a força necessária para completar a caminhada. **Tias (Carolina e Valéria)** que sempre me receberam em Santos, todas as vezes que precisava voltar pra casa. **Primo (Luã Pietro)**, a coisa mais linda da minha vida, que me ensinou a compartilhar a alegria e a simplicidade do olhar de uma criança;*

*À **todos os amigos (Re, Fer, Cida, Josué, Bianca, Alisson, entre muitos outros)** que fiz em Botucatu...foram 2 anos de grandes momentos inesquecíveis... Todos vocês possuem um lugar especial no meu coração. Todos vocês que direta ou indiretamente ajudaram-me a vencer esta etapa da minha vida, e que se tornaram a minha família num lugar onde eu simplesmente não conhecia ninguém, e me ajudaram a me tornar uma outra pessoa, e bem melhor;*

*À **todos os meus amigos de Santos (Tami, Naty, Lu, Lilian, Gu, Mila, Vira, Bruninho, Caiozinho, Nathan, Japa, Kelly entre muitos outros também)** que, apesar da distância, moram no meu coração, e morarão para sempre!;*

*Às minhas queridas amigas Dras. Farmacêuticas: **Claudia Antônia, Graziela Maria, Lays Helena e Regina**, garotas Terminalia!, que viram toda essa história surgir, e que deram o incentivo necessário para eu vir até aqui, e mesmo que hoje, estejamos distantes, tudo o que*

*passamos juntas, e não foram poucas coisas e muito menos fáceis, será guardado com muito carinho!;*

*Ao **Professor Walber Toma**, quem me acendeu a luz, e me ajudou a dar o primeiro passo no caminho da pesquisa e me ensinou a amar a farmacologia. E que além de tudo isso, me mostrou a necessidade de ser humano e de sempre superar meus próprios limites, e me salvou de alguns “pequenos problemas” durante a graduação. Com muito carinho que te considero meu “pai-científico”;*

*À **FAPESP**, pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado;*

*Por último agradeço a **Deus**, por todas as oportunidades maravilhosas que Ele me proporciona a cada dia.*

## **Prólogo**

O projeto de mestrado possibilitou a formação específica em farmacologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos as úlceras pépticas. Durante a execução do projeto de mestrado, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional do aluno.

### **Trabalhos apresentados na forma de painel em evento científico internacional**

→ “Gastroprotective action of fractions obtained from *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) leaves ethanolic extract” Silva, L.P., Angelis, C.D., Carvalho, K.I.M., Bonamim, F., Rocha, L.R.M., Toma, W., Hiruma-Lima, C.A. 8th International Congress of Pharmaceuticals Sciences, 21-24 Agosto de 2011, Ribeirão Preto-SP.

→ “Gastroprotective action of the monoterpene geraniol in model of ethanol-induced gastric ulcer: Involvement of NO-synthase and sulphhydryl group” Carvalho, K.I.M., Silva, L.P., Bonamim, F., Rocha, L.R.M., Sousa, D.P., Hiruma-Lima, C.A. 8th International Congress of Pharmaceuticals Sciences, 21-24 Agosto de 2011, Ribeirão Preto-SP.

### **Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos nacionais**

→ “Phytochemical analysis of ethanolic extract from *Terminalia catappa* L. leaves and its correlation with gastroprotection” Silva, L.P., Angelis, C.D., Hiruma-Lima, C.A., Toma, W.” 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 18-21 de outubro de 2010, Ribeirão Preto-SP.

### **Participação em eventos científicos**

→ 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 21-24 de agosto de 2011, Ribeirão Preto-SP.

→ 7th Biota Symposium, 7th Biota Program Assessment Meeting e 4th Bioprospecta Program Assessment Meeting, 3-10 de julho de 2011, São Carlos-SP.

→ 4º Simpósio de Imunologia: Imunobiologia de Tumores, 20-22 de maio de 2011, Botucatu-SP.

→ 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 18-21 de outubro de 2010, Ribeirão Preto-SP.

→ IX Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, 17-19 de junho de 2010, Botucatu-SP.

→ IX Workshop da Pós-graduação & X Workshop de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, 13-15 de maio de 2010, Botucatu-SP.

### **Curso realizado**

→ Curso sobre diseño experimental y tamaño de la muestra em trabajos con animales de laboratorio, 25-29 de julho de 2011, Buenos Aires- Argentina.

### **Palestra proferida**

→ “Da graduação à pós-graduação. Como fazer essa ponte?” – III Simpósio de Integração às Ciências Farmacêuticas, 29 de agosto a 02 de setembro de 2011, Santos-SP.

### **Organização de Eventos**

→ Comissão de apoio do IX Workshop da Pós-graduação & X Workshop de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, 13-15 de maio de 2010, Botucatu-SP.

### **Disciplinas Cursadas**

- Abordagem Estatística em Farmacologia I – Fundamentos (1 crédito)
- Abordagem Estatística em Farmacologia II – Aplicabilidade (2 créditos)
- Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (3 créditos)
- Métodos Biofísicos de Avaliação da Motilidade Gastrointestinal (4 créditos)
- Tópicos de Atualização em Ciências 1º e 2º semestre 2010 (2 créditos)

- Tópicos Especiais em Farmacologia: Farmacologia de plantas medicinais com atividade antinociceptiva (analgésica) e/ou antiinflamatória (2 créditos)
- Interação entre a Pós-graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia (6 créditos)
- Farmacologia Avançada (5 créditos)
- Classificação de Receptores Farmacológicos (3 créditos)

## SUMÁRIO

.....	23
Introdução e Justificativa.....	23
.....	23
1.1. ÚLCERA GÁSTRICA.....	24
1.2. PLANTAS MEDICINAIS.....	26
1.3. Terminalia catappa.....	28
Objetivos.....	30
2.1. Geral.....	31
2.2. Específicos.....	31
Materiais e Métodos .....	32
3.1. COLETA E ELABORAÇÃO DA EXSICATA.....	33
3.2. PROCESSO EXTRATIVO.....	33
3.3. PARTIÇÃO.....	33
3.4. ANIMAIS.....	33
3.5. SOLUÇÕES.....	34
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA.....	34
3.6.1. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	34
3.6.2. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA	34
3.6.3. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM INDOMETACINA	35
3.6.4. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM ETORICOXIBE	35
3.6.5. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA PELO MÉTODO SHAY	36
3.6.6. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA PELO MÉTODO SHAY	36
3.6.7. PRODUÇÃO DE MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA	36
3.6.8. ENVOLVIMENTO DOS GRUPAMENTOS SULFIDRILA NA GASTROPROTEÇÃO	37
3.6.9. ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA GASTROPROTEÇÃO	37
3.6.10. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO	38
3.7. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	38
3.7.1. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL (GSH)	38
3.7.2. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	39
3.7.3. QUANTIFICAÇÃO DE COLECISTOCININA (CCK) e SOMATOSTATINA SÉRICA	39
3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	39

3.8.1. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO	39
3.8.2. TOXICIDADE SUBAGUDA	40
3.8.3. DETERMINAÇÃO DE MPP-2 E MPP-9 POR ZIMOGRÁFIA	40
3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	41
3.10.1. ANÁLISES POR FIA-ESI-IT-MS	42
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
Resultados .....	44
4.1. PROCESSO EXTRATIVO E PARTIÇÃO.....	45
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA.....	45
4.2.1. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	45
4.2.2. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA	48
4.2.3. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM INDOMETACINA	49
4.2.5. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA PELO MÉTODO SHAY	51
4.2.6. PRODUÇÃO DE MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA	51
4.2.7. ENVOLVIMENTO DOS GRUPAMENTOS SULFIDRILA NA GASTROPROTEÇÃO	52
4.2.8. ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA GASTROPROTEÇÃO	53
4.2.9. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO	54
4.3.1. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL (GSH)	54
4.3.2. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	55
4.3.3. QUANTIFICAÇÃO DE COLECISTOCININA (CCK) E SOMATOSTATINA SÉRICA	56
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	57
4.4.1. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO	57
4.4.2. DETERMINAÇÃO DE MPP-2 E MPP-9 POR ZIMOGRÁFIA	58
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	61
4.6.1. ANÁLISES POR FIA-ESI-IT-MS	63
Conclusão .....	80

## RESUMO

*Terminalia catappa* Linn é uma espécie comumente utilizada para arborização nas regiões tropical e subtropical. Essa espécie é também utilizada, em países da Ásia, como Taiwan, Índia, Filipinas e Indonésia, para tratamento de distúrbios hepáticos e do trato gastrointestinal. A literatura aponta que seus constituintes encontrados nos extratos polares das folhas são principalmente compostos polifenólicos, em especial os taninos. A partir desses dados e da ausência de registros na literatura sobre a ação antiulcerogênica desta espécie foram realizados estudos para avaliação dessa atividade das frações e caracterização da fração mais ativa, assim como a determinação do mecanismo de ação gastroprotetor e cicatrizante da fração ativa. A partir do extrato etanólico bruto das folhas, que em estudo anterior realizado pelo grupo demonstrou atividade gastroprotetora, antissecreatória e cicatrizante, foi feita a partição com três solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e metanol/água). As três frações oriundas destas extrações apresentaram ação gastroprotetora em úlcera induzida por etanol absoluto, porém a fração mais efetiva foi a aquosa na dose de 25 mg/Kg, selecionada para caracterizar os mecanismos de ação envolvidos na ação antiulcerogênica como: óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), aumento de muco e atividade antioxidante por meio da manutenção dos níveis de glutathione e redução da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Não foram observadas a participação dos grupamentos sulfidríla e ação antissecreatória.

Foi constatada atividade cicatrizante tanto com 7 como com 14 dias de tratamento, consecutivos, da fração aquosa. Durante o tratamento com a partição aquosa ocorreu uma *down-regulation* da enzima metaloproteinase-2 (MPP-2), durante os dois períodos de tratamento. Na caracterização de uma toxicidade subcrônica, a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg, não demonstrou potencial tóxico. Em virtude de observações da ação da dose de 50 mg/Kg no modelo de úlcera por indometacina, que potencializou as lesões, buscou-se avaliar uma possível atividade antiinflamatória da fração que foi constatada por meio do Teste de Formalina e Edema de orelha induzido por Xilol, assim sendo nessa dose, essa fração possui atividade antiinflamatória, possivelmente, por inibição da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2). E todas essas atividades biológicas se relacionam aos taninos hidrolisáveis, que são os principais constituintes encontrados na fração sendo estes

a punicalagina, punicalina, ácido elágico e ácido galágico, que já são citados na literatura como tendo atividade farmacológica, entre essas gastroprotetora e antiinflamatória.

**Palavras-chave:** úlcera gástrica, *Terminalia catappa*, taninos hidrolisáveis

## ABSTRACT

*Terminalia catappa* Linn is a specie commonly used for afforestation in tropical and subtropical regions. It is used, in Asian countries, as Taiwan, India, Filipines and Indonesia, for treatment of hepatic and gastrointestinal disorders. Studies point to poliphenols as main components of polar leaves extract, specially the tannins. Based on this and in the lack of information about a possible gastroprotective action of this specie, studies for avaliation of this activity were done with fractions of the ethanolic extract, and gastroprotective action mechanisms were characterized in the most active fraction. A previous study done by our group showed the ethanolic extract as gastroprotective, antisecretory and healing. The ethanol extract were partitioned with three different solvents, hexane, etil acetate and methanol/water. The three fractions showed gastroprotective action in the model of ulcer induced by ethanol, but the most effective was aquous fraction in a dose of 25 mg/Kg, which was the one selected to the characterization of the mechanisms involved in the antiulcerogenic activity as: nitric oxide (NO), prostaglandins (PG), mucus and antioxidant activity by maintenance of glutathione levels and reduction in mieloperoxidase (MPO) enzyme activity. No participation of sulphidryls compounds and antisecretory activity were detected. The aquous fraction also showed healing action in the treatment for 7 and 14 days, in both of them was detected a down-regulation in metalloproteinase-2 (MPP-2). In a subchronic toxicity avaliation, the aquous fraction in 25 mg/Kg doesn't presented a toxic potential. In the model of gastric ulcer induced by indomethacin, the aquous fraction in a dose of 50 mg/Kg, aggravated the lesions, which showed an evidence for antiinflammatory activity, it was confirmed in Formalin test and ear edema induced by Xilol, thus in this dose this fraction presents an antiinflammatory activity, and a possible mechanism for that, it is the inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). All these biological activities are related to hidrolisable tannins: punicalagin, punicalin, ellagic acid and galic acid, the major components found out in the aquous fraction. And studies show a relation between gastroprotective and antiinflammatory action and this components.

**Key-words:** gastric ulcer, *Terminalia catappa*, hidrolisable tannins

# *Introdução e Justificativa*

## 1.1. ÚLCERA GÁSTRICA

A úlcera gástrica é uma doença crônica comum, definida como um distúrbio na integridade da mucosa gástrica que causa um dano superficial e que se estende da camada muscular da mucosa à submucosa, ou mais profundamente, devido a um processo inflamatório. A incidência anual de úlcera péptica, doença que abrange tanto a úlcera gástrica como a duodenal, no mundo, é estimada em 1500 a 3000 a cada 100.000 habitantes. Na Europa, as úlceras pépticas são responsáveis por cerca de 20 a 30.000 mortes por ano, principalmente na população acima de 65 anos. O grande problema desta doença são as complicações resultantes desse quadro, onde se tem a prevalência de quadros hemorrágicos, perfurações e obstruções gástricas que são necessárias intervenções cirúrgicas imediatas. A perfuração gástrica acomete de 1 a 6% dos pacientes, e embora exista uma tendência de diminuição da doença, sua prevalência ainda se apresenta constante (d'Acampora *et al.*, 2008).

A úlcera gástrica surge de um desequilíbrio entre fatores protetores da mucosa como, a barreira de muco e bicarbonato, óxido nítrico (NO), fluxo sanguíneo, prostaglandinas, entre outros, e fatores agressores, por exemplo, secreção de ácido, pepsina e radicais livres. Os fatores agressores da mucosa gástrica se originam de uma variedade de estímulos tanto endógenos como exógenos, entre os quais estão o consumo de álcool, o tabagismo, dieta inadequada, drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) e a presença, no local, da bactéria *Helicobacter pylori* (Beserra *et al.*, 2011).

São o uso de antiinflamatórios não-esteroidais (DAINEs) e a bactéria *H. pylori* os maiores responsáveis pela causa da úlcera, atualmente. Os DAINEs estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo, sendo que, na Europa, estima-se que este medicamento represente mais de 7,7% de todas as prescrições. Nos Estados Unidos, no ano de 2004, 111 milhões de prescrições foram feitas, e a expectativa é que esse número se torne cada vez maior devido ao aumento da incidência de doenças reumáticas, e esse uso excessivo é preocupante ao notar-se que mais de 90% das prescrições são feitas a pacientes com mais de 65 anos. O grande problema relacionado com essas drogas se deve aos efeitos adversos que são comuns, especialmente afetando o trato gastrointestinal (TGI), tais como a formação de úlceras, hemorragia e obstrução do trato TGI. Estes efeitos adversos ocorrem em

cerca de 4 a 5% dos pacientes no primeiro ano de tratamento, e o risco de desenvolver sérias complicações é 4 a 5 vezes maior entre os usuários de DAINEs do que entre os não-usuários. Os principais fatores de risco associados ao uso dos DAINEs são um histórico prévio de distúrbios gástricos e a idade avançada (Sostres *et al.*, 2010). Em relação a bactéria *H. pylori*, como fator ulcerogênico, estudos demonstram que a diminuição na incidência e na prevalência de úlcera péptica em países desenvolvidos, tem paralelo com a queda nas taxas de infecção por essa bactéria. E, estudos comprovam que somente, a erradicação desta bactéria já se mostra efetiva no tratamento da úlcera tanto gástrica como duodenal. Embora a infecção por *H. pylori* e o uso dos DAINEs sejam fatores de risco independentes para o surgimento da úlcera, eles podem atuar de forma sinérgica no aparecimento de distúrbios gástricos. A presença desse microorganismo, no estômago, potencializa o processo hemorrágico induzido por baixas doses de aspirina, e esses dois fatores juntos são responsáveis por cerca de 90% da doença ulcerosa (Yuan *et al.*, 2006).

Quando se considera as opções terapêuticas existentes para o tratamento das úlceras, temos medicamentos que promovem: ação antibacteriana (anti-*Helicobacter pylori*), a neutralização do ácido gástrico, redução da secreção ácida estomacal e citoproteção. Geralmente, são utilizados inibidores de bomba protônica (omeprazol) e de antagonistas de receptor de histamina H<sub>2</sub> (cimetidina) (Schroeter *et al.*, 2008). No entanto, esses fármacos disponíveis atuam predominantemente minimizando os fatores lesivos da mucosa, e essa terapia está associada ao surgimento dos efeitos adversos e em muitos casos, ocorre recidiva da lesão gástrica (Tundis *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato de que ainda não foi encontrado um fármaco capaz de proporcionar uma cicatrização qualitativa das lesões gástricas, ou seja, a reconstrução da inteira estrutura da mucosa gástrica, havendo deste modo o retorno da doença assim que o paciente faz a interrupção da terapia medicamentosa (Toma *et al.*, 2005). Portanto, há a necessidade de novos fármacos antiulcerogênicos que sejam mais efetivos, menos tóxicos e a um custo mais acessível para a população (Tundis *et al.*, 2008).

Estimativas globais sugerem que cerca de 3/4 da população mundial ainda não tem acesso às terapias sintéticas para as mais diversas doenças, dentre elas a úlcera gástrica. Deste modo, tal setor populacional torna-se dependente de terapias alternativas, em especial das plantas medicinais, para o tratamento destas doenças

(Dhar *et al.*, 2002). As plantas medicinais têm sido tradicionalmente uma fonte importante para a origem e o desenvolvimento de medicamentos, embora o número de substâncias produzidas sinteticamente em teste tenha aumentado, ainda permanece relativamente alto o número de produtos naturais e seus derivados entre as drogas mais vendidas no mundo. Por isso, o interesse por essa fonte voltou a crescer tendo como expectativa diminuir o custo de pesquisa e desenvolvimento (Villas Boas & Gadelha, 2007). No Brasil, uma grande parte da população não tem acesso aos medicamentos, pelo seu custo elevado, o que leva ao uso de plantas medicinais como alternativa para o combate de diversas doenças (Lima *et al.*, 2008).

## 1.2. PLANTAS MEDICINAIS

Desde a antiguidade a utilização de plantas medicinais constitui a base dos tratamentos para alívio de diversos males pelos povos, em especial esse conhecimento se concentrava nos chamados “raizeiros” ou xamãs. Registro disso pode ser encontrado, por exemplo, no Papiro de Ebers, antigo tratado médico egípcio, escrito há cerca de 3.500 anos, que já mostrava a indicação de substâncias de origem natural, como o uso terapêutico de óleos de alho, girassol, açafraão e terebentina, e também o uso de mel ou de cera de abelhas como veículo para os óleos usados na melhoria da absorção dos medicamentos.

No Oriente, a utilização de produtos naturais também se mostra milenar, na Índia, desde 3000 a.C., os textos *Ayurvedas*, descreviam a utilização de diversos extratos, por exemplo, óleos viscosos no tratamento de diversas doenças. Além disso, na China antiga, há relatos desde o século 28 a.C., de que haviam três tipos de tratamentos: cósmico, anímico e o medicamentoso. E, o progresso da terapêutica chinesa foi grande, já que no século II d.C. havia 222 ensaios, 397 notas e 113 prescrições deixadas por Zhang Ji, e no século VII, Sun Simiao havia estudado mais de 1074 plantas, 443 substâncias animais e 11.091 prescrições de medicamentos, e deixou para a população uma lista conhecida como os “500 remédios de ouro”.

Na Grécia Antiga, Hipócrates (460-377 a.C.), o “Pai da Medicina”, descreveu que o tratamento de diversas doenças poderia ser feito utilizando-se alimentos, e que era necessário o conhecimento da propriedade desses para que a terapêutica fosse adequada. Outro grego, Claudius Galeno (129-216 d.C.), o “Pai da Farmácia”,

foi o primeiro grande observador científico dos fenômenos biológicos, e seus tratados e prescrições permanecem até hoje (Nogueira *et al.*, 2009).

Como observado, o uso de plantas medicinais fez parte da sociedade por muitos anos, porém no século XX, o uso de medicamentos de origem sintética se tornou maior, especialmente, nos países desenvolvidos do Ocidente. Em contraste com isso, os países em desenvolvimento, continuam a utilizar as plantas, como fonte de cura, visto que devido às condições econômicas, o acesso aos medicamentos sintéticos se torna mais difícil (Souza-Moreira *et al.*, 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 1978, incentiva investimentos públicos em plantas medicinais, e com isso a fitoterapia se tornou mais aceita entre profissionais da saúde. Além disso, a OMS estima que 65-80% da população mundial utiliza produtos a base de plantas medicinais na atenção primária à saúde, sendo esses utilizados para várias finalidades (Silveira *et al.*, 2008).

No Brasil, várias razões fazem com que a fitoterapia seja difundida entre a população, entre essas a dificuldade econômica, que não permite o acesso aos medicamentos industrializados, o difícil acesso à assistência médica e farmacêutica e uma “consciência ecológica”, que faz com que os consumidores tenham preferência por produtos de origem natural (Silveira *et al.*, 2008).

O conhecimento popular é o principal determinante para a utilização de determinada espécie pela população, na maioria das vezes, isso se mostra eficaz, o que desperta o interesse do meio científico pelo assunto, sendo que estudos nessa área exigem um conjunto de profissionais, como botânicos, farmacologistas e fitoquímicos (Maciel *et al.*, 2002).

De modo geral, a literatura aponta três modos para que a seleção de uma espécie vegetal a ser estudada seja feita. Essa escolha pode ser ao acaso, baseada na disponibilidade da planta, que seria a abordagem randômica, também pode ser feita levando em conta a ocorrência de certos metabólitos secundários em dado gênero ou espécie, abordagem quimiotaxonômica ou filogenética, e por fim, uma busca baseada nas informações cedidas por uma população, abordagem etnofarmacológica. Embora, na abordagem randômica o número de possibilidades para descoberta de novas substâncias bioativas seja maior, na abordagem etnofarmacológica, essa busca se mostra mais eficaz. Dessa forma, levar em conta o histórico de determinada planta e sua eficácia no tratamento de certa doença pela população faz com que tempo e dinheiro sejam economizados na busca por novas

matérias-primas, o que poderá ser traduzido em um novo medicamento (Maciel *et al.*, 2002).

### **1.3. *Terminalia catappa***

A espécie *Terminalia catappa* é pertencente a família Combretaceae, é originária da Índia. Dentre as características anatômicas da espécie podemos destacar a altura que varia de 25 a 40 m de altura, o diâmetro do tronco alcança de 50 a 150 cm e suas folhas são oblanceoladas a obovadas, coriáceas, altermoespiraladas, medindo cerca de 30 cm. Esta espécie é popularmente conhecida, no Brasil, como amendoeira-da-praia, cuca e chapéu de sol, e sua distribuição ocorre em países de clima tropical e subtropical, principalmente em regiões costeiras devido a sua característica de adaptabilidade em regiões com presença de ventos e salinidade (Thomson & Evans, 2006). No Brasil, sua principal utilização é na ornamentação de ruas e avenidas. Porém, em países asiáticos, esta espécie é usada popularmente para tratamento de dermatite e hepatite (Chen *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2007).

A literatura aponta ainda que os extratos polares de diferentes órgãos de *Terminalia catappa* (folhas, frutos e cascas) apresentam diversas atividades biológicas, tais como: antimicrobiana e antifúngica (Fyhrquist *et al.*, 2002), antioxidante (Masuda *et al.*, 1999; Chyau *et al.*, 2002 e 2006; Chen & Li, 2006), inibidora da transcriptase reversa do vírus HIV (Tan *et al.*, 1991), antiinflamatória (Fan *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 1999), hepatoprotetora (Lin *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2005; Chen & Li, 2006), afrodisíaca (Ratnasooriya & Dharmasiri, 2000) e antidiabética (Nagappa *et al.*, 2002).

Estudos fitoquímicos demonstram a presença de compostos polifenólicos no extrato das folhas, entre essas substâncias se destacam os triterpenóides e taninos hidrolisáveis como: punicalagina, punicalina, ácido chebulágico, geranina, ácido gálico, elágico, entre outros (Kinoshita *et al.*, 2007; Angel *et al.*, 2003).

Os compostos polifenólicos são moléculas, que tem como característica a presença de grupamentos benzênicos substituídos por hidroxilas, e estão presentes em uma variedade de plantas. Estes compostos se destacam principalmente, por sua atividade antioxidante, e por isso, se tornam importantes para a prevenção e terapia de doenças, como câncer, doenças degenerativas e inflamatórias. Os taninos, que se encontram entre esses compostos, apresentam estrutura química

variada, porém possuem em comum seu caráter adstringente. Podem ser divididos quimicamente em taninos hidrolisáveis e condensados, são substâncias solúveis em água e insolúveis em solventes apolares (Angel *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2008).

Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupamentos hidroxilas são esterificados com os ácidos fenólicos (Monteiro *et al.*, 2005). Várias plantas que apresentam na sua constituição essas moléculas são tradicionalmente usadas para distúrbios gástricos, e estudos já demonstraram que entre as atividades biológicas desse grupo estão as ações antiulcerogênica e antissecretória, assim como também é relatada a atuação na proteção da mucosa gástrica por danos causados por agentes necrosantes (Khenouf *et al.*, 2003). Em vista de todas essas informações e da ausência de dados na literatura de uma possível atividade antiulcerogênica da espécie *Terminalia catappa*, esse trabalho visa a avaliação dessa atividade biológica assim como a determinação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção.

# *Objetivos*

## 2.1. Geral

Encontrar plantas medicinais com potencial terapêutico para o combate e/ou prevenção de úlceras gástricas e oferecer novas opções terapêuticas que possuam uma melhor eficácia e promovam a ausência ou atenuação dos efeitos adversos

## 2.2. Específicos

- Avaliar a ação antiulcerogênica das frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto das folhas de *Terminalia catappa* e caracterizar a fração mais ativa em modelos de úlcera gástrica induzida por diversos agentes em ratos;
- Estudar os mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor da fração mais ativa através da participação de: enzima NO-sintase, grupamentos sulfidrilas, muco aderido, prostaglandinas, glutatona, mieloperoxidase, somatostatina e colecistocinina;
- Avaliar a atividade antissecretores da fração mais ativa no modelo de ligadura de piloro;
- Avaliar a atividade cicatrizante da fração mais ativa.

# *Materiais e Métodos*

### 3.1. COLETA E ELABORAÇÃO DA EXSICATA

As folhas de *Terminalia catappa* Linn foram coletadas na orla da praia da cidade de Santos-SP, com autorização da prefeitura, no mês de abril de 2010, identificadas pela equipe de botânicos da Universidade Santa Cecília sendo arquivada e registrada (M Tomaz 01) no Herbário da Universidade Santa Cecília (HUSC).

### 3.2. PROCESSO EXTRATIVO

As folhas coletadas de *Terminalia catappa* foram submetidas ao processo de secagem em estufa a 50°C por 6 dias consecutivos. Após secagem, as mesmas foram trituradas e moídas em moinho de facas. O pó obtido foi extraído com etanol absoluto, por meio de percolação exaustiva (Prista, 1995). O pó foi intumescido com 2 litros de etanol absoluto durante 2 horas. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + etanol absoluto) e o efluente foi coletado na vazão de 2,0 mL/min/Kg.

Após a extração, o líquido extrator foi rotaevaporado sob pressão reduzida, em temperatura menor que 45°C. O extrato bruto etanólico foi transferido para um vidro e deixado em capela até completa eliminação do solvente.

### 3.3. PARTIÇÃO

Após a obtenção do extrato bruto etanólico seco, esse foi ressuspenso em MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) e submetido à partição líquido-líquido com hexano e em seguida com acetato de etila, fornecendo ao final 3 extratos de polaridades: baixa (extrato hexânico), média (extrato em acetato de etila) e alta (extrato aquoso).

### 3.4. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (150 a 200g) e camundongos Swiss (30-50g), provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura (23 ± 2°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado. Os animais

foram alimentados com ração Guabi® e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu através do protocolo n. 18/05 – CEEA.

### **3.5. SOLUÇÕES**

O veículo utilizado para a preparação foi solução de NaCl (0,9%) para a preparação das soluções das frações acetato e aquosa, e tween 80 a 8% para a fração hexânica.

### **3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA**

#### **3.6.1. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL**

Ratos Wistar foram divididos em grupos (n=5-7) e tratados, após 24 h de jejum, com as frações hexânica, acetato de etila e aquosa, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, com 100 mg/kg de carbenoxolona ou 10 mL/Kg de veículo (controle negativo, solução de NaCl (0,9%) para os animais tratados com a fração acetato e aquosa, e tween 80 a 8% para os animais tratados com a fração hexânica), uma hora antes da indução de lesão gástrica pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto. Após 1 h da indução, os animais foram mortos e os estômagos retirados para contagem das lesões. Para a quantificação das lesões, os estômagos foram colocados em placa de vidro, as quais foram escaneadas para realização da quantificação, através do aplicativo AVSoft®, que apresenta os resultados na forma de área (mm<sup>2</sup>) (Morimoto *et al.*, 1991).

#### **3.6.2. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA**

Ratos Wistar foram aleatoriamente separados em grupos (n=5), privados de comida por 12h, com água *ad libitum*. Após 30 minutos decorridos da administração (via oral) de salina, cimetidina 100 mg/Kg, e a fração aquosa, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, indometacina 50 mg/Kg - solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5%, pH 7,4, de acordo com Allen & Hamilton (2000) foi administrada (via oral) para todos os

grupos. Após 6 horas da administração do agente lesivo (indometacina), todos os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, e os estômagos retirados, abertos pela maior curvatura e a área de lesão (mm<sup>2</sup>) determinada pelo programa Avsoft Bioview (Guidobono *et al.*, 1997).

### **3.6.3. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM INDOMETACINA**

Ratos Wistar, em jejum de 12h, foram divididos em grupos (n=5-6) de acordo com os tratamentos (Salina + Salina, Salina+Carbenoxolona, Salina+Fração aquosa; Indometacina+Salina, Indometacina+Carbenoxolona e Indometacina+Fração aquosa). Os controles receberam injeção subcutânea de solução salina e os outros animais de Indometacina 30 mg/Kg - solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5%, pH 7,4, de acordo com Allen & Hamilton (2000). Após 30 min, os grupos receberam por via oral os tratamentos Salina (10 mL/Kg), Carbenoxolona (100 mg/Kg) e fração aquosa na dose de 25 e 50 mg/Kg. Depois de 1h, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol absoluto. Uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, e os estômagos removidos para determinação da área de lesão (mm<sup>2</sup>) pelo programa Avsoft Bioview (Matsuda, 1999).

### **3.6.4. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM ETORICOXIBE**

Animais, em jejum de 12h, foram divididos em grupos (n=5-6) de acordo com os tratamentos (Salina + Salina, Salina+Carbenoxolona, Salina+Fração aquosa; Etoricoxibe+Salina, Etoricoxibe+Carbenoxolona e Etoricoxibe+Fração aquosa). Os controles receberam injeção subcutânea de solução salina e os outros animais de Etoricoxibe (90 mg/Kg). Após 30 min, os grupos receberam por via oral os tratamentos Salina (10 mL/Kg), Carbenoxolona (100 mg/Kg) e fração aquosa na dose de 25 e 50 mg/Kg. Depois de 1h, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol absoluto. Uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, e os estômagos removidos para determinação da área de lesão (mm<sup>2</sup>) pelo programa Avsoft Bioview (Matsuda, 1999).

### **3.6.5. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA PELO MÉTODO SHAY**

Após 12h de jejum, os animais sob anestesia (éter etílico administrado por via inalatória), sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a localização e amarradura do piloro. Os tratamentos (n=7-8) Salina (10 mL/Kg), Cimetidina (100 mg/Kg) e Fração aquosa na dose de 25 mg/Kg foram administrados por via intraduodenal logo após a ligadura do piloro, e, em seguida, as incisões suturadas. Quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, as incisões reabertas, e os estômagos retirados. O conteúdo estomacal foi coletado para determinação do volume e determinação da concentração de íons H<sup>+</sup> da secreção ácida (Shay *et al.*, 1945).

### **3.6.6. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA PELO MÉTODO SHAY**

Após 12h de jejum, os animais (n=6-8) receberam por via oral os tratamentos Salina (10 mL/Kg), Cimetidina (100 mg/Kg) e Fração aquosa na dose de 25 mg/Kg. Após 30 minutos, foram anestesiados (éter etílico administrado por via inalatória) e sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a localização e amarradura do piloro e, em seguida, as incisões suturadas. Quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, as incisões reabertas, e os estômagos retirados. O conteúdo estomacal foi coletado para determinação do volume e determinação da concentração de íons H<sup>+</sup> da secreção gástrica (Shay *et al.*, 1945).

### **3.6.7. PRODUÇÃO DE MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA**

O muco da parede gástrica foi determinado em animais submetidos à ligadura do piloro. Após 12 h de jejum, os diferentes grupos experimentais (n=6) receberam os tratamentos Salina (10 mL/Kg), Carbenoxolona (200 mg/Kg) e Fração aquosa na dose de 25 mg/Kg, por via oral, 1h depois, estes animais anestesiados (éter etílico administrado por via inalatória) foram submetidos à ligadura do piloro conforme o método descrito anteriormente.

Após a morte dos animais, em câmara de CO<sub>2</sub>, os estômagos foram removidos e abertos no sentido da curvatura maior, sendo os segmentos glandulares do estômago removidos e pesados. Cada segmento foi transferido

imediatamente para um tubo contendo 10 mL de Alcian blue 0,1% (em solução de sacarose 0,16M tamponada com acetato de sódio 0,05 M, pH=5). Após imersão por 2 h nesta solução, o excesso de tinta dos estômagos foi removido através de duas lavagens sucessivas com 10 mL de solução de sacarose 0,25 M, primeiro por 15 min e, em seguida, por 45 min. O Alcian blue complexado com o muco da parede gástrica foi extraído com 10 mL de MgCl<sub>2</sub> de 0,5 M com agitação intermitente por 1 min, em intervalos de 30 min, durante 2 h. Uma alíquota de 4 mL de extrato de Alcian blue foi vigorosamente agitada com um volume igual de éter dietílico; a emulsão resultante foi centrifugada a 3600 rpm por 20 min e a absorbância da camada aquosa determinada a 580nm. A quantidade de Alcian blue extraída por grama de tecido glandular foi então calculada, e, expressa como concentração do corante em µg por mL de solução por grama de porção glandular (Corne *et al.*, 1974).

### **3.6.8. ENVOLVIMENTO DOS GRUPAMENTOS SULFIDRILA NA GASTROPROTEÇÃO**

Animais, em jejum de 12h, foram divididos em grupos (n=5) de acordo com os tratamentos (Salina + Salina, Salina+Carbenoxolona, Salina+Fração aquosa; *N-ethyl maleimide* (NEM)+Salina, NEM+Carbenoxolona e NEM+Fração aquosa). Os controles receberam injeção intraperitoneal de solução salina e os outros animais de NEM (10 mg/Kg), um bloqueador do grupamento sulfidril. Após 30 min, os grupos receberam por via oral os tratamentos Salina (10 mL/Kg), Carbenoxolona (100 mg/Kg) e fração aquosa na dose de 25 mg/Kg. Depois de 1h, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol absoluto. Uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, e os estômagos removidos para determinação da área de lesão (mm<sup>2</sup>) pelo programa Avsoft Bioview (Matsuda, 1999).

### **3.6.9. ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA GASTROPROTEÇÃO**

Ratos Wistar, em jejum de 12h, foram divididos em grupos (n=5) de acordo com os tratamentos (Salina+Salina, Salina+Carbenoxolona, Salina+Fração aquosa; *N-nitro-L-arginine methyl-ester* (L-NAME)+Salina, L-NAME+Carbenoxolona, L-

NAME+Fração aquosa). Os controles receberam injeção intraperitoneal de solução salina e os outros animais de L-NAME (70 mg/Kg), um bloqueador da enzima NO sintase. Após 30 minutos, os grupos receberam por via oral os tratamentos Salina (10 mL/Kg), Carbenoxolona (100 mg/Kg) e fração aquosa na dose de 25mg/Kg. Depois de 1h, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol absoluto. Uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, e os estômagos removidos para contagem da área de lesão (mm<sup>2</sup>) determinada pelo programa AvSoft Bioview (Matsuda, 1999).

### **3.6.10. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas. Os tratamentos com Salina (10 mL/Kg), Lansoprazol (30 mg/Kg) e Fração aquosa na dose de 25mg/Kg (n=7-8), foram realizados por via oral, 30 minutos antes de anestésiar os animais (Ketamina 0,08 mL/100g + Xilazina 0,04 mL/100g, intra-muscular). Sob anestesia, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para colocação de um “clamp” na artéria celíaca. Decorridos 30 minutos de isquemia o “clamp” foi retirado e, então, os ratos foram submetidos à uma hora de reperfusão e, em seguida, os animais sendo mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, e os estômagos removidos para contagem da área de lesão (mm<sup>2</sup>) determinada pelo programa AvSoft Bioview (Ueda *et al.*, 1989).

## **3.7. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

### **3.7.1. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL (GSH)**

Tiras armazenadas dos modelos de úlcera gástrica por etanol absoluto e do modelo de isquemia-reperfusão foram pesadas e armazenadas em 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (TCA). O conteúdo de glutatona total do estômago foi determinado utilizando a substância 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) (ANDERSON *et al.*, 1985). A reação enzimática é constituída de 200 µl da amostra contendo 2mg/ml de proteína, 0,2 M de tampão fosfato pH 8,0; 0,5mM DTNB (2mg em 10ml de citrato de sódio 1%) em um volume final de 2 mL. A absorbância foi determinada em 412 nm utilizando um espectrofotômetro. A concentração de glutatona total foi expressa utilizando o coeficiente de extinção de 13,6 mM.

### **3.7.2. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)**

Tiras armazenadas dos modelos de úlcera gástrica por etanol absoluto e do modelo de isquemia-reperfusão foram pesadas e congeladas à -80°C até o momento da utilização. Foi utilizado o tampão de reação HTAB (a 0,5% em tampão fosfato sódico 50 mM, pH 6,0) que atua como detergente lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a enzima, que então foi liberada. A atividade enzimática foi determinada seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação, sendo que 1 unidade de MPO determinada é capaz de degradar 1 nmol/minuto de água oxigenada a 25°C (Krawisz *et al.*, 1984). A atividade da MPO é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa. A absorbância foi determinada em 450 nm utilizando um espectrofotômetro.

### **3.7.3. QUANTIFICAÇÃO DE COLECISTOCININA (CCK) e SOMATOSTATINA SÉRICA**

A administração de salina (10 mL/Kg), cimetidina (100 mg/Kg) e da fração aquosa na dose de 25 mg/Kg, todos por via oral, foi realizada 1h antes da amarradura do piloro em ratos (n=4-5), segundo método descrito por Shay *et al.*, 1945. Após 4h da ligadura do piloro, os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, e o sangue foi coletado para quantificação sérica de CCK e Somatostatina pelo método imunoenzimático, com auxílio de kit da empresa Phoenix Pharmaceuticals, Inc.

## **3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE**

### **3.8.1. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

Após 12 h de jejum, os animais (n=5-6) foram anestesiados (éter etílico administrado por via inalatória) e tiveram o abdômen aberto para exposição do estômago. Um tubo plástico de 4,2 mm de diâmetro interno foi firmemente aplicado à superfície serosa da parede do estômago. Uma solução de 70 µL de ácido acético a 80% foi aplicada por 20 segundos na superfície serosa e removido

completamente, para então sutura do abdômen. O resultado deste processo resultou numa ulceração crônica da mucosa e submucosa, com área aproximada da úlcera de 13,8 mm<sup>2</sup>. Os tratamentos Salina (10 mL/Kg), Lansoprazol (30 mg/Kg) e da fração aquosa na dose de 25mg/Kg, todos por via oral, foram administrados oralmente a partir do 1º dia após a cirurgia e tratados por 7 dias consecutivos. Depois de decorridos 7 dias, os animais foram mortos, em câmara de CO<sub>2</sub>, o estômago removido para análise macroscópica da lesão através da medida das bordas interna e externa da lesão com a utilização de paquímetro digital. A área total da lesão foi scaneada para análise através do programa AVSoft Bioview Spectra e tiras do tecido foram pesadas e armazenadas para determinações bioquímicas (metaloproteinase) e “western blot”. Esse mesmo modelo foi utilizado também para a avaliação da cicatrização após 14 dias de tratamento, onde, porém a morte dos animais foi feita por decapitação, para recolhimento de sangue que será analisado bioquimicamente, e também tiras do tecido foram pesadas e armazenadas para determinações bioquímicas (metaloproteinase) e “western blot” (Takagi *et al.*, 1969, com modificações).

### **3.8.2. TOXICIDADE SUBAGUDA**

O experimento de toxicidade subaguda é uma estimativa das propriedades tóxicas *in vivo* da substância teste em sua dose terapêutica (Lima *et al.*, 2006). O peso dos animais do modelo descrito anteriormente foi registrado durante os 14 dias, no 15º dia os animais foram sacrificados e os órgãos (coração, fígado, rins, pulmões, testículos) removidos para pesagem. Os dados estão expressos pelo arcosseno do peso do órgão/peso do animal. Também foi coletado sangue dos animais e avaliados parâmetros bioquímicos (glicemia, ALT, AST, gama-GT, uréia e creatinina).

### **3.8.3. DETERMINAÇÃO DE MPP-2 E MPP-9 POR ZIMOGRAFIA**

Tiras armazenadas dos modelos de úlcera gástrica induzida por ácido acético, tratamento de 7 e 14 dias, de cada grupo experimental foram utilizados para a extração total de proteínas. As tiras foram homogeneizadas em tampão de extração

(30mg de tecido/100µl de solução), contendo Tris-HCl 50Mm pH 7,4, NaCl 0,2M, Triton X-100 0,1% e 0,1% de cocktail inibidor de protease (P-8849 - Sigma-CO, Saint Louis, MO, USA) utilizando um homogeneizador do tipo Turrax em três ciclos de 5 segundos cada. Após 2 horas de incubação para aumentar a eficiência da extração, o homogeneizado foi centrifugado a 4.000 rpm por 20 min. a 4°C. O sobrenadante coletado foi mantido à -80°C até a hora do uso. A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976).

Alíquotas (30 µg de proteína por linha) do extrato foram submetidas à eletroforese sob condições não redutoras (100V a 4°C) em gel de poliacrilamida a 8% contendo 0,1% de gelatina (colágeno denaturado). Após a eletroforese, os géis foram lavados em Triton X-100 2,5% duas vezes de 15 min., e em seguida em tampão Tris-HCl 50Mm pH 8,4 por duas vezes de 5 min. e então incubados por 20 horas a 37°C no mesmo tampão contendo 5 Mm de CaCl<sub>2</sub>. Após a incubação, os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue 0,50%. Áreas de proteólise aparecem como bandas claras contra um fundo azul escuro.

As bandas obtidas na zimografia foram digitalizadas, convertidas em bandas escuras sobre um fundo claro e analisadas por densitometria. A atividade gelatinolítica total das MMPs -2 e -9 foi analisada obtendo-se a densidade óptica integrada (IOD) das bandas utilizando-se o programa *IMAGE J*<sup>®</sup> (Delella *et al.*, 2009).

### **3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA**

#### **3.9.1. TESTE DE FORMALINA**

Após jejum de 2 horas, os animais (n=8) foram pré-tratados oralmente com salina (10 mL/kg), e com a fração aquosa na dose de 50 mg/Kg. Após uma hora, foi administrado 20 µL de solução de formalina 1% em tampão fosfato que será injetada intraplantarmente na pata traseira direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram observados na câmara até 30 min. O tempo (em segundos) que o camundongo lambe suas patas foi registrado e considerado como indicativo de dor. Após o procedimento, os animais foram mortos em câmara de CO<sub>2</sub> (Hunnskaar & Hole, com modificações, 1987).

### 3.9.2. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR XILOL

Para indução de edema de orelha, 20  $\mu\text{L}$  de xilol foram aplicados topicamente na orelha esquerda dos camundongos (10  $\mu\text{L}$  na face anterior da orelha, 10  $\mu\text{L}$  na face posterior). A orelha direita foi utilizada como controle. Os animais ( $n=8-10$ ), submetidos ao jejum por 2 horas, foram tratados 2 horas antes da indução com dexametasona (5 mg/Kg, i.p) e uma hora antes da indução do edema tratados oralmente com a salina (10 mL/Kg) e fração aquosa nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg. Após uma hora da indução do edema, os camundongos foram mortos (em câmara de  $\text{CO}_2$ ) e uma secção circular (8 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas foram retiradas com o auxílio de um *puncher* (perfurador). Logo em seguida as orelhas foram pesadas. O edema é expresso através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha esquerda e a orelha direita (Swingle *et al.*, 1981 com modificações).

### 3.10. DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO

#### 3.10.1. ANÁLISES POR FIA-ESI-IT-MS

Os espectros de massas da fração aquosa foram obtidos em um espectrômetro de massas LQC Deca (ESI-IT-MS<sup>n</sup>, Thermo Finnigan®), equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). Escolheu-se o modo negativo para geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS<sup>n</sup>). O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa  $m/z$  estabelecida. A partir dos dados da primeira varredura, obteve-se os próximos eventos (experimentos MS<sup>n</sup>) para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. Utilizou-se o software *Xcalibur* versão 1.3 (Thermo Finnigan®) durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

### 3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e seguidos pelo teste de Dunnet e/ou Tukey; e teste t de Student não-emparelhado, com nível de significância de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

# *Resultados*

#### 4.1. PROCESSO EXTRATIVO E PARTIÇÃO

Os dados relativos à extração das folhas de *Terminalia catappa* encontram-se na Tabela 1. O rendimento final do extrato etanólico bruto foi de 8,75%, e em relação às frações, o maior rendimento foi da fração acetato (47,24%), seguida pela fração aquosa (25,46%) e, por último, a fração hexânica (21,41%).

**TABELA 1. Rendimento Extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Terminalia catappa***

<b>Peso: Folhas secas</b>	<b>Extrato etanólico bruto</b>	<b>Fração hexânica</b>	<b>Fração acetato</b>	<b>Fração aquosa</b>
378,54g	33,10g	7,09g	15,64g	8,43g
<b>Rendimento:</b>	8,75%	21,41%	47,24%	25,46%

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA

##### 4.2.1. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

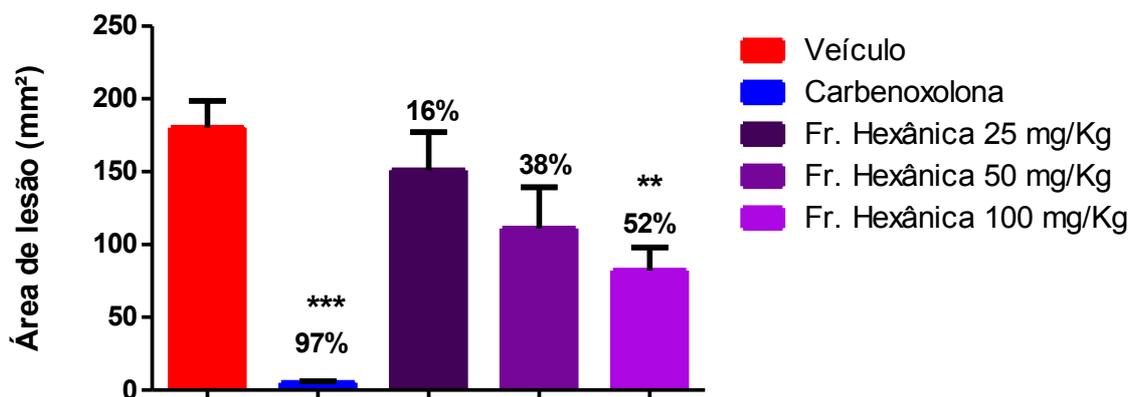
No gráfico 1, são apresentados os resultados obtidos da atividade gastroprotetora da fração hexânica de *T. catappa* administrada nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg em ratos. Houve redução significativa da área de lesão dos animais do grupo controle positivo, tratados com carbenoxolona, redução de 97%, e do grupo de animais tratados com a fração hexânica na dose de 100 mg/Kg, redução de 52%, quando comparados ao grupo controle negativo

No gráfico 2, mostra-se a atividade da fração acetato nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg. Neste gráfico se observa significativa a redução das lesões somente do grupo tratado com carbenoxolona, controle positivo. Mas, apesar de não ter ocorrido reduções expressivas das lesões gástricas, a fração na dose de 100 mg/Kg foi capaz de reduzir as lesões em 66%. Novo experimento foi realizado repetindo-se essa mesma dose, na qual os dados foram expressos no gráfico 3. Foi observado nesse novo experimento, uma redução significativa da área de lesão de, 92% do grupo tratado com carbenoxolona e 50% do grupo tratado com a fração, em relação ao controle negativo.

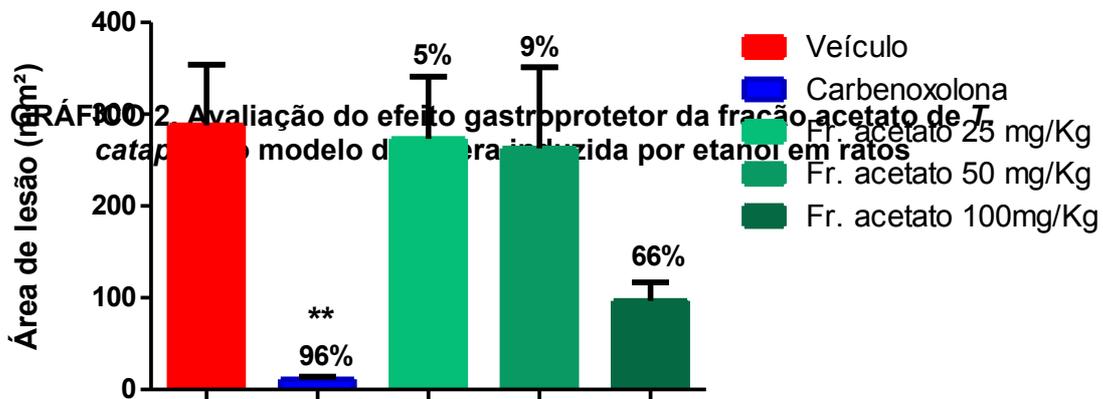
No gráfico 4, são apresentados os resultados obtidos a partir da avaliação do potencial efeito antiulcerogênico de três níveis de dose da fração aquosa (25, 50 e 100 mg/Kg). Os resultados indicam que houve uma redução significativa das lesões gástricas dos animais tratados somente com a carbenoxolona, droga antiulcerogênica utilizada como padrão para este modelo. A redução da área de lesão dos animais tratados com 25 mg/Kg (42% de redução) e 100 mg/Kg (32% de redução) é observada, porém não apresenta diferenças significativas em relação aos animais do grupo tratado somente com o veículo. Para melhor caracterizar os efeitos gastroprotetores da fração aquosa foi realizado novo experimento, incluindo uma dose menor de 12,5 mg/Kg, cujos resultados foram expressos no gráfico 5. Foi observada atividade gastroprotetora significativa nos animais tratados com a carbenoxolona e também com os animais tratados com a fração na dose de 25 mg/Kg, sendo a porcentagem de inibição de lesões do grupo controle positivo de 92% e da fração de 42%, em relação ao grupo controle negativo.

Embora todas as frações de *T. catappa* tenham demonstrado atividade antiulcerogênica nesse modelo de triagem inicial, a fração aquosa foi selecionada para a continuidade dos estudos, considerando a ação gastroprotetora observada na menor dose (25 mg/Kg), em relação as outras frações.

**GRÁFICO 1. Avaliação do efeito gastroprotetor da fração hexânica de *T. catappa* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos**

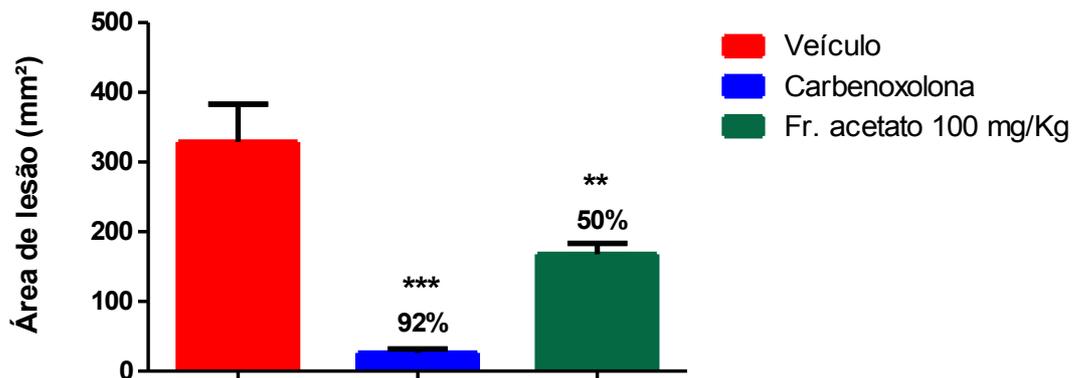


Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=5). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ .



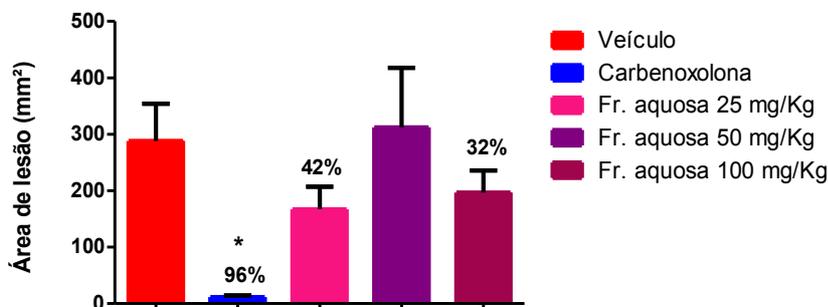
Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=6-7). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com  $**p<0,01$ .

**GRÁFICO 3. Avaliação do efeito gastroprotetor da fração acetato de *T. catappa* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos**



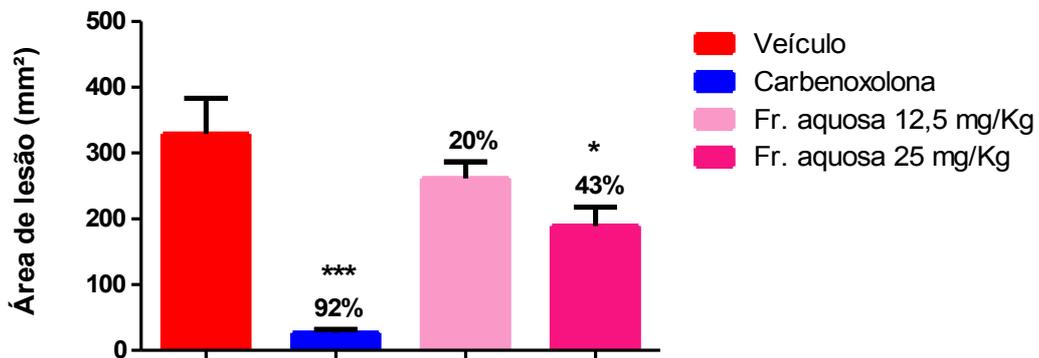
Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=5). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com  $**p<0,01$ .

**GRÁFICO 4. Avaliação do efeito gastroprotetor da fração aquosa de *T. catappa* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos**



Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=6-7). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com  $*p<0,05$ .

**GRÁFICO 5. Avaliação do efeito gastroprotetor da fração de *T. catappa* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos**

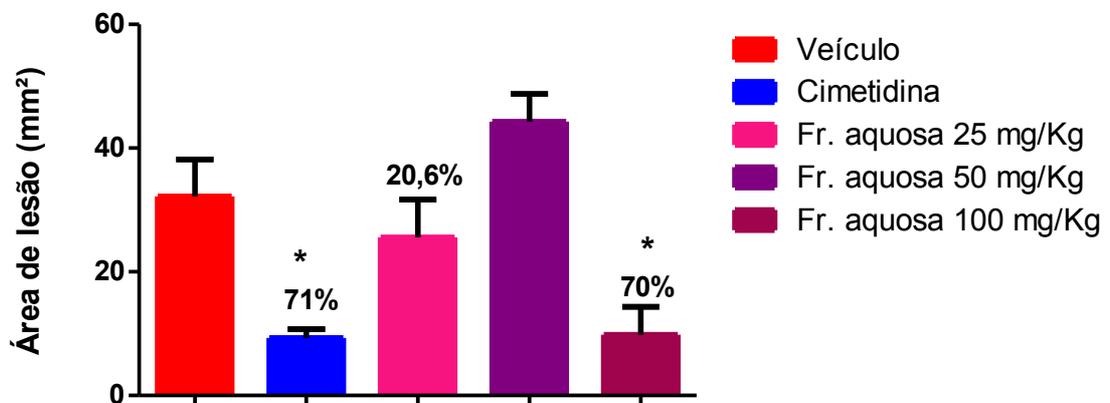


Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=5). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.2.2. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA

Nesse modelo foi avaliado os efeitos da fração aquosa nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg (Gráfico 6), observou-se uma proteção significativa da cimetidina, 71% de inibição, porém apenas a dose de 100 mg/Kg da fração teve ação protetora, 70% de inibição. Notou-se que embora não seja significativo, há uma tendência de aumento nas lesões no grupo tratado com a fração na dose de 50 mg/Kg, dando um indicativo de envolvimento da via da COX na atuação dessa, por isso decidiu-se estudar o perfil dessa dose em alguns modelos de mecanismo de ação envolvendo prostaglandinas e de atividade antiinflamatória.

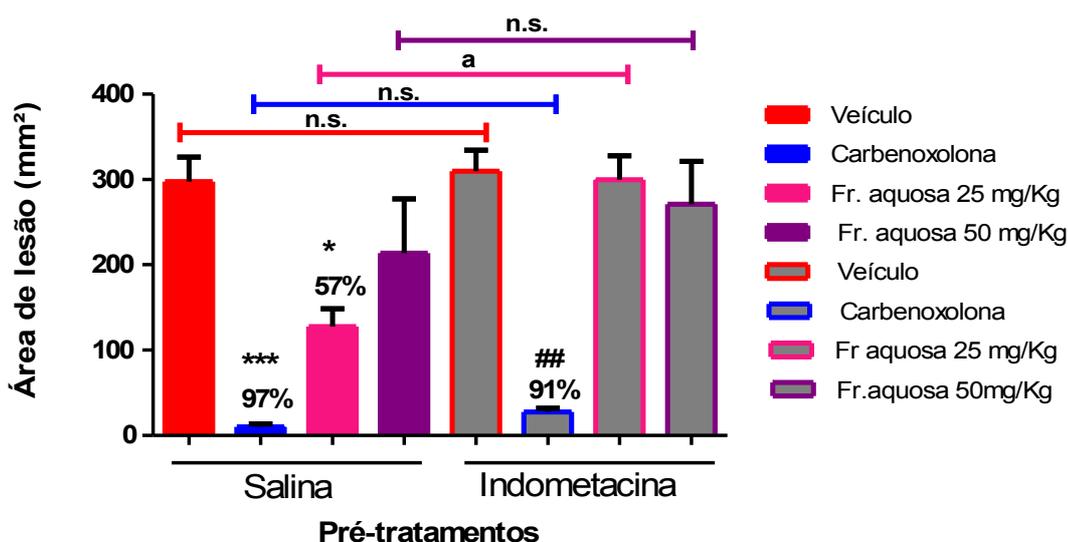
**GRÁFICO 6. Avaliação do efeito gastroprotetor da fração aquosa de *T. catappa* no modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos**



Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=5). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \* $p < 0.05$ .

#### 4.2.3. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM INDOMETACINA

Nesse modelo experimental avaliou-se a ação da fração aquosa nas doses de 25 e 50 mg/Kg em ratos (Gráfico 7). Observou-se que somente o tratamento dos animais com a carbenoxolona foi capaz de inibir as lesões gástricas induzidas por etanol tanto nos animais pré-tratados com o veículo, como naqueles que foram também pré-tratados com indometacina, em que houve, respectivamente, 97 e 91% de inibição. Nos animais pré-tratados com salina, a fração aquosa manteve o perfil descrito anteriormente no modelo de etanol, no qual somente a dose de 25mg/Kg foi capaz de exercer seu efeito gastroprotetor, com uma inibição de 57% das lesões induzidas por etanol. Todavia, nos animais pré-tratados com indometacina, a fração na dose de 25 mg/Kg, tem seu efeito gastroprotetor completamente abolido, e o grupo de animais tratados com a fração na dose de 50 mg/Kg apresentou aumento da área de lesão em comparação ao mesmo grupo pré-tratado com salina. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa. A partir desses resultados, existem evidências do envolvimento da via da COX na ação gastroprotetora da fração aquosa, isso porque a indometacina ao inibir a via da COX fez com que a fração aquosa perdesse sua gastroproteção observada quando o pré-tratamento foi feito apenas com o veículo, porém esse fármaco é um inibidor não seletivo dessa via, o que levou a avaliação do envolvimento exclusivo da COX-2 nesse processo.

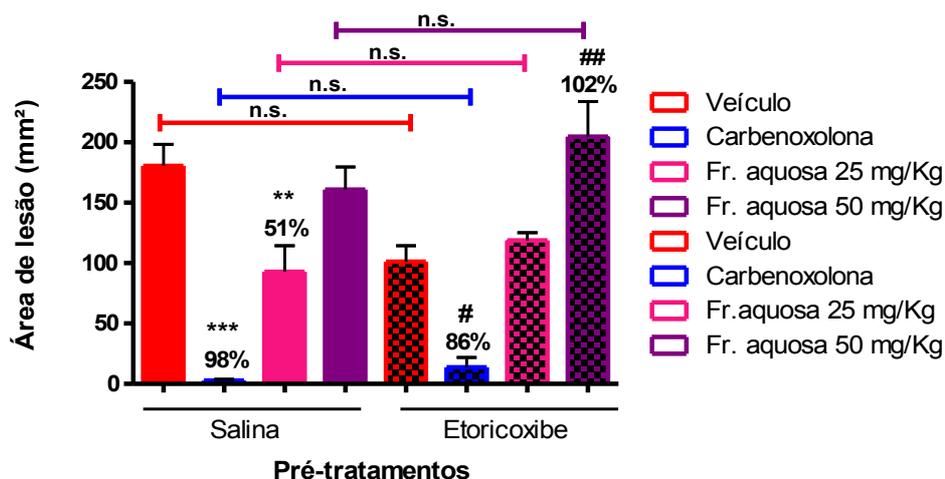


Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média, as diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controle (salina+veículo ou indometacina+veículo). Os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo controle, respectivamente (n=5-6). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett com \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, ##p<0,01. As barras horizontais indicam comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina ou indometacina) ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey com n.s.: diferença não significativa, a: p<0,05.

#### 4.2.4. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM ETORICOXIBE

Para avaliação da participação da via da COX-2 na ação gastroprotetora da fração aquosa, utilizou-se o etoricoxibe, um inibidor seletivo da enzima COX-2. Foram testadas nesse modelo experimental as doses de 25 e 50 mg/Kg da fração aquosa (Gráfico 8). Foi observado que os grupos tratados com o controle positivo, carbenoxolona, e pré-tratados tanto com salina como com etoricoxibe, tiveram uma inibição das lesões gástricas de, respectivamente, 98 e 86%. Nos animais pré-tratados com salina, a fração aquosa somente na dose de 25 mg/Kg teve efeito gastroprotetor, com uma inibição de 51% das lesões gástricas. Nos animais pré-tratados com etoricoxibe, a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg, manteve a mesma média de área de lesão do pré-tratamento com salina. Os animais tratados com a fração aquosa na dose de 50mg/Kg, e pré-tratados com etoricoxibe, apresentaram aumento de 102% na área de lesão em comparação ao grupo tratado com o veículo e pré-tratado com o etoricoxibe. Em decorrência disso, foi evidenciada a atuação dessa dose da fração aquosa de *T. catappa* na via da COX-2, que para ser melhor caracterizada, foi também avaliada em modelos de atividade antiinflamatória.

**GRÁFICO 8. Avaliação do efeito gastroprotetor da fração aquosa de *T. catappa* no modelo de úlcera induzida por etanol em animais pré-tratados com etoricoxibe**



Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, as diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controle (salina+veículo ou etoricoxibe+veículo). Os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo controle, respectivamente (n=5-6). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ . As barras horizontais indicam comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina ou etoricoxibe) ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey com n.s.: diferença não significativa.

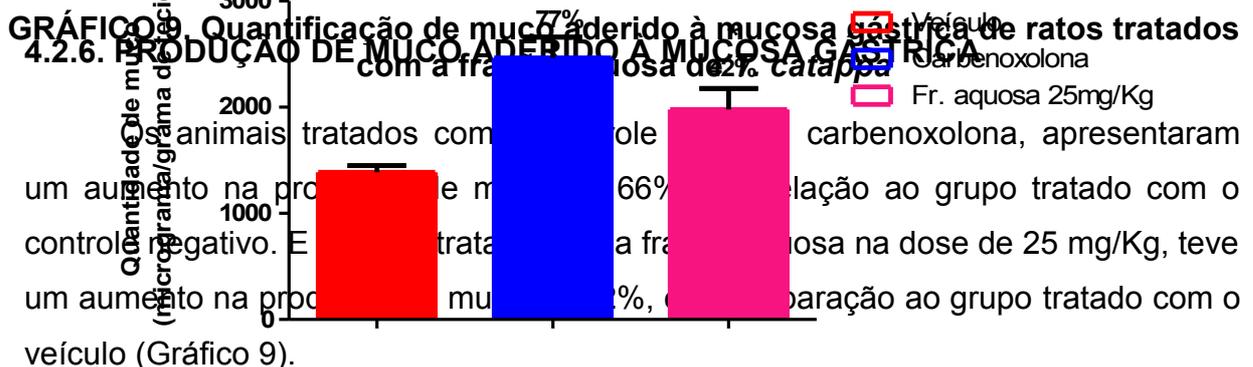
#### 4.2.5. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA PELO MÉTODO SHAY

Neste experimento, quando os tratamentos foram administrados por via oral, apenas o controle positivo causou alterações no volume do suco gástrico e na concentração de íons H<sup>+</sup>, a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg não alterou nenhum desses parâmetros. Porém, na administração por via intraduodenal, a fração aquosa gerou um aumento significativo do volume do suco gástrico, sem interferir na concentração de íons H<sup>+</sup> (Tabela 2).

TABELA 2. Avaliação da Secreção ácida de Ratos submetidos a diferentes tratamentos			
Tratamentos (v.o.)	Dose (mg/Kg)	Volume suco gástrico (mL)	[H <sup>+</sup> ] (mEq/mL/4h)
Veículo	-	7,02 ± 2,25	6,99 ± 1,84
Cimetidina	100	4,29 ± 1,16**	2,77 ± 1,30**
Fr. aquosa	25	8,02 ± 2,18	7,34 ± 0,65
Tratamentos (i.d.)	Dose (mg/Kg)	Volume suco gástrico (mL)	[H <sup>+</sup> ] (mEq/mL/4h)
Veículo	-	3,74 ± 1,01	5,25 ± 1,51
Cimetidina	100	2,63 ± 0,67	1,94 ± 0,87**
Fr. aquosa	25	5,30 ± 1,67*	6,33 ± 0,43

Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=6-8).

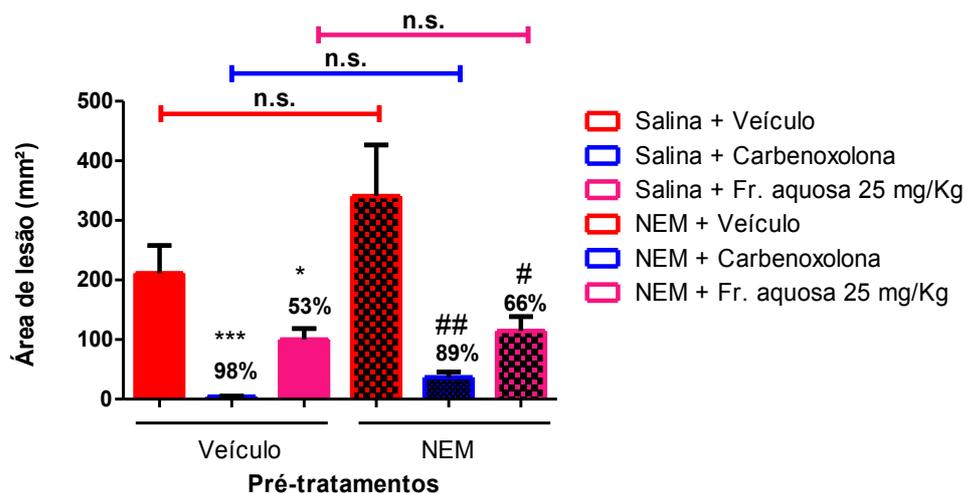
ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*p<0,05; \*\*\*p<0,01.



#### 4.2.7. ENVOLVIMENTO DOS GRUPAMENTOS SULFIDRILA NA GASTROPROTEÇÃO

Os animais tratados com a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg e pré-tratados com salina tiveram uma inibição na área de lesão gástrica de 53%, em relação ao grupo tratado com o veículo. E, o grupo que recebeu o mesmo tratamento, e pré-tratamento com NEM, manteve a ação gastroprotetora, observando-se uma inibição de 66% das lesões gástricas, em relação ao grupo tratado com o veículo (Gráfico 10).

**GRÁFICO 10. Avaliação do envolvimento dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção da fração aquosa de *T. catappa***

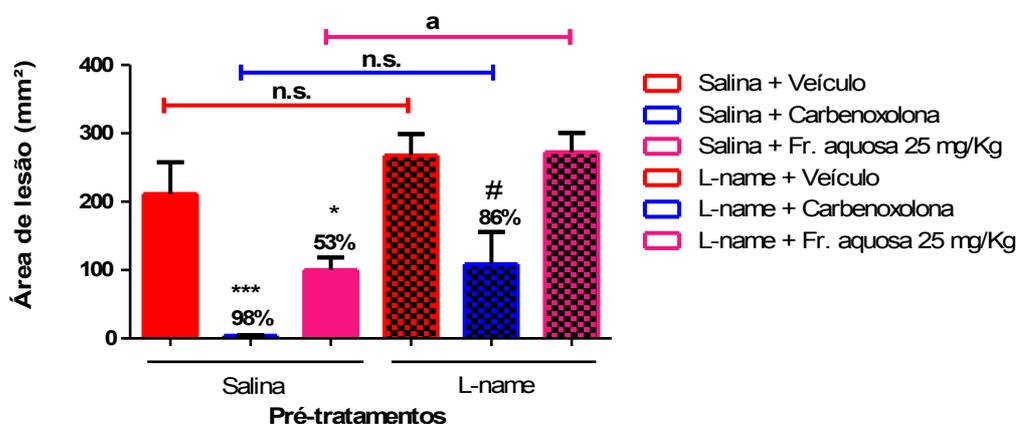


Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, as diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controle (salina+veículo ou NEM+veículo). Os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo controle, respectivamente (n=5). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*p<0,05; \*\*\*p<0,001; #p<0,05; ##P<0,01. As barras horizontais indicam comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina ou NEM). ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey com ns: diferença não significativa.

#### 4.2.8. ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA GASTROPROTEÇÃO

Os animais tratados com a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg e pré-tratados com salina tiveram uma inibição na área de lesão gástrica de 53%, em relação ao grupo tratado com o veículo, porém o grupo que recebeu o mesmo tratamento, e pré-tratamento com L-name teve uma reversão completa dessa gastroproteção (Gráfico 11).

**GRÁFICO 11. Avaliação do envolvimento do NO na gastroproteção da fração aquosa de *T. catappa***

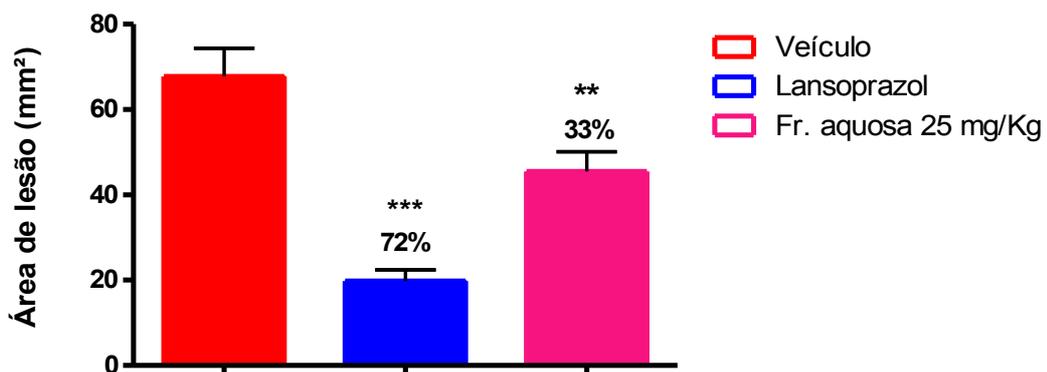


Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, as diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controle (salina+veículo ou L-name+veículo). Os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo controle, respectivamente (n=5). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.05$ . As barras horizontais indicam comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina ou L-name) ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey com ns: diferença não significativa; a:  $p < 0.05$ .

#### 4.2.9. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

Nesse experimento, houve redução significativa da área de lesão dos animais do grupo controle positivo e do grupo tratado com a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg, quando comparados ao controle negativo, com redução das lesões em 72% e de 33%, respectivamente (Gráfico 12).

**GRÁFICO 12. Avaliação do efeito gastroprotetor da fração aquosa de *T. catappa* no modelo de úlcera induzida por isquemia-reperfusão em ratos**



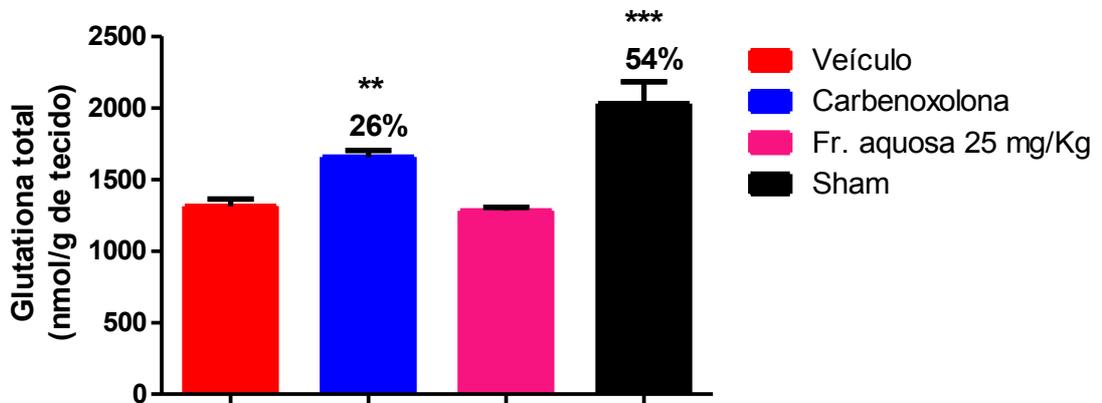
Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=7-8). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

#### 4.3.1. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL (GSH)

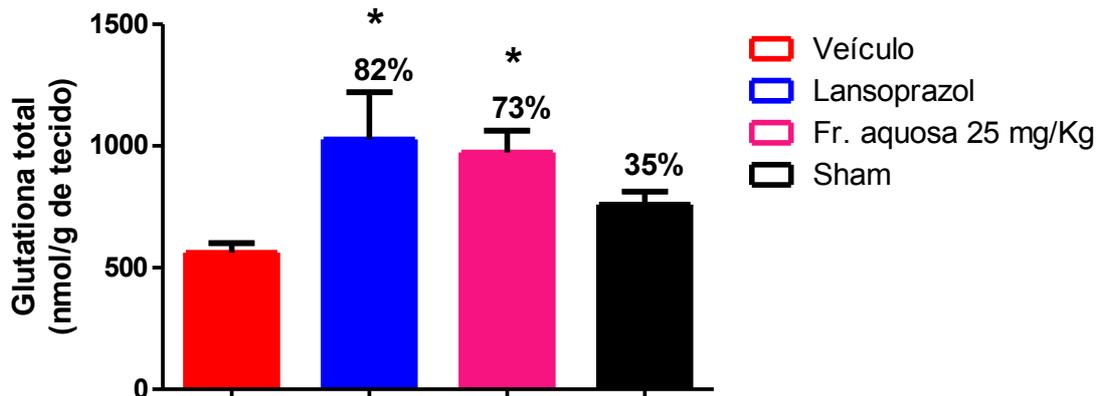
No modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, observou-se que a fração aquosa não é capaz de evitar a depleção dos níveis de glutathiona total encontrados no tecido, em relação ao grupo veículo (Gráfico 13), porém esses níveis são diferenciados no modelo de úlcera induzida por isquemia-reperfusão onde pode se verificar uma maior concentração dessa defesa antioxidante nos animais tratados com a fração, sendo estatisticamente significativa a diferença com o grupo controle negativo (Gráfico 14).

**GRÁFICO 13. Quantificação dos níveis de Glutathiona total na mucosa gástrica de animais submetidos a lesão induzida por etanol**



Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média (n=5). Os números em porcentagem indicam aumento nos níveis de glutathiona em relação ao grupo tratado com o controle negativo. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

**GRÁFICO 14. Quantificação dos níveis de Glutathiona total na mucosa gástrica de animais submetidos a lesão induzida por isquemia-reperfusão**

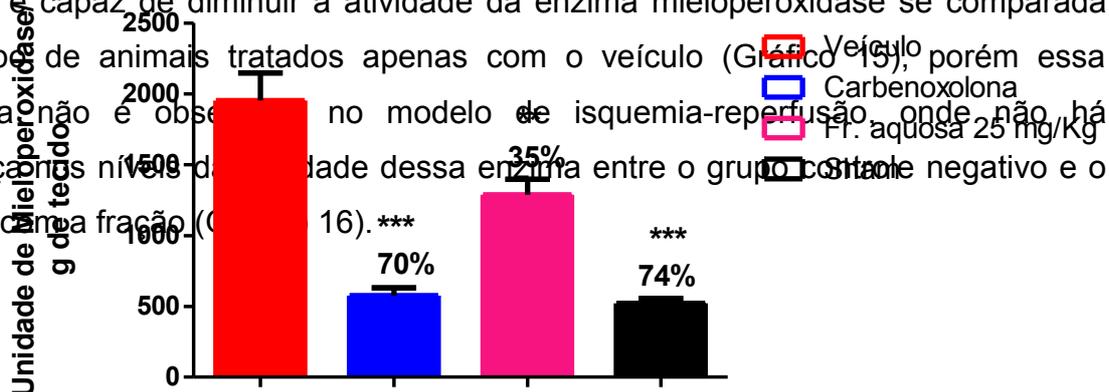


Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média (n=7-8). Os números em porcentagem indicam aumento nos níveis de glutathiona em relação ao grupo tratado com o controle negativo. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*p<0,05.

**4.3.2. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)**

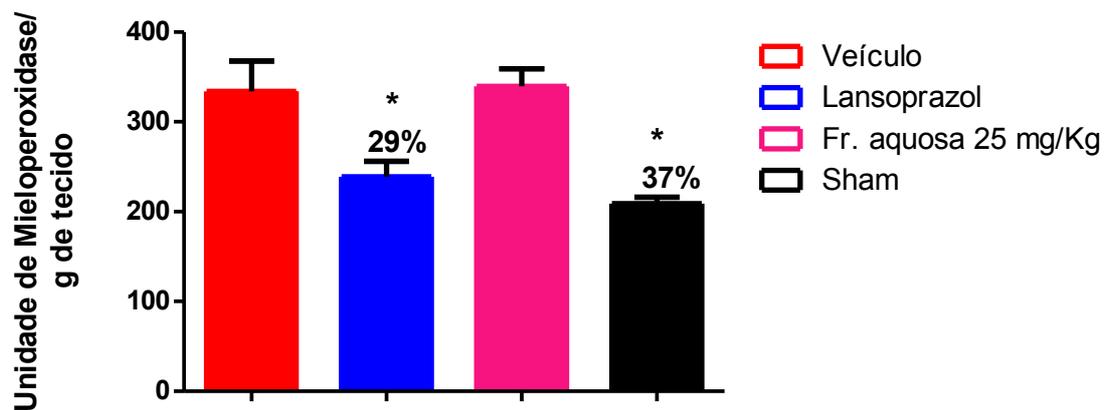
**GRÁFICO 15. Quantificação de Mieloperoxidase no Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol**

No modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, observou-se que a fração aquosa é capaz de diminuir a atividade da enzima mieloperoxidase se comparada ao grupo de animais tratados apenas com o veículo (Gráfico 15), porém essa resposta não é observada no modelo de isquemia-reperfusão, onde não há diferenças nos níveis de atividade dessa enzima entre o grupo controle negativo e o tratado com a fração (Gráfico 16). \*\*\*



Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média (n=5). Os números em porcentagem indicam a diminuição nos níveis de MPO em relação ao grupo tratado com o controle negativo. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

**GRÁFICO 16. Quantificação de Mieloperoxidase no Modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão**



Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (n=7-8). Os números em porcentagem indicam a diminuição nos níveis de MPO em relação ao grupo tratado com o controle negativo. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*p<0,05.

#### 4.3.3. QUANTIFICAÇÃO DE COLECISTOCININA (CCK) E SOMATOSTATINA SÉRICA

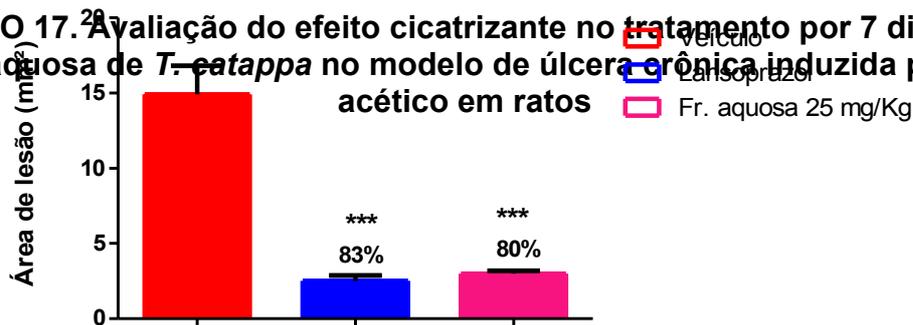
Não houve diferença estatística na dosagem dos níveis hormonais de CCK e somatostatina dos animais tratados com a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg, submetidos à ligadura do piloro, em relação aos animais tratado com o veículo.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE

##### 4.4.1. ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

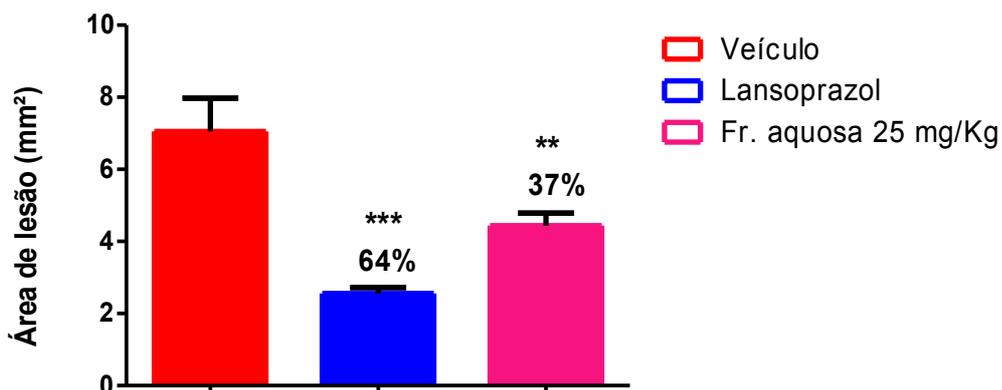
No gráfico 17, observa-se o efeito cicatrizante na úlcera induzida por ácido acético dos animais submetidos a 7 dias de tratamento consecutivo com a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg. Os resultados expressam a redução significativa da lesão gástrica dos animais tratados com o lansoprazol (83% de redução), assim como da fração aquosa, com a diminuição de 80% na área de lesão, em relação ao grupo tratado com o veículo. Esse resultado também foi encontrado no mesmo modelo, porém com tratamento por 14 dias, onde o controle positivo e a fração mostraram uma inibição das lesões, respectivamente, de 64% e 37%, em relação ao grupo tratado com o veículo. (Gráfico 18).

**GRÁFICO 17. Avaliação do efeito cicatrizante no tratamento por 7 dias com a fração aquosa de *T. catappa* no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos**

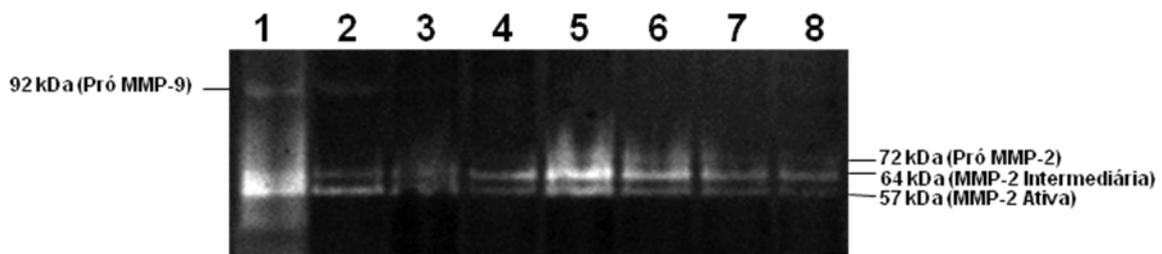


Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=5-6). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*\*\*p<0,001.

**GRÁFICO 18. Avaliação do efeito cicatrizante no tratamento por 14 dias com a fração aquosa de *T. catappa* no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos**



Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média, os números em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=5-6). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.



**Figura 1:** Gel de Zimografia ilustrando a atividade gelatinolítica das MMPs - 2 e -9: Grupo Veículo 7 Dias (linha 1); Lansoprazol 7 Dias (linha 2); Fr. Aquosa 25mg/Kg 7 Dias (linha 3); Sham 7 Dias (linha 4); Grupo Veículo 14 Dias (linha 5); Lansoprazol 14 Dias (linha 6); Fração Aquosa 25mg/Kg 14 Dias (linha 7); Sham 14 Dias (linha 8).

#### 4.4.2. DETERMINAÇÃO DE MPP-2 E MPP-9 POR ZIMOGRAFIA

A Figura 1 ilustra o Gel de Zimografia de diferentes grupos experimentais no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético sobre a ação gelatinolítica de MMPs. O gráfico 19 mostra que no tratamento durante 7 dias foi encontrada a atividade da MPP-9 apenas nos grupos veículo e lansoprazol, sendo que nesse último, esse valor foi 42% menor, em relação ao controle negativo. Quanto à MPP-2, a sua atividade foi encontrada em todos os grupos, sendo que, em relação à atividade máxima, vista no grupo veículo, houve uma diminuição nos grupos tratados com lansoprazol, fração aquosa e sham, respectivamente, de 40%, 26% e 50%.

No tratamento durante 14 dias (Gráfico 20), não foi vista a presença da MPP-9 em nenhum grupo. O padrão máximo de atividade da MPP-2 foi observado no grupo veículo, e foi evidenciada uma redução na atividade dos outros grupos, 54% para o controle positivo, 73% para a fração aquosa e 84% para o Sham.

GRÁFICO 19. Efeito do tratamento por 7 dias da Fração aquosa 25 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por ácido acético sobre a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9

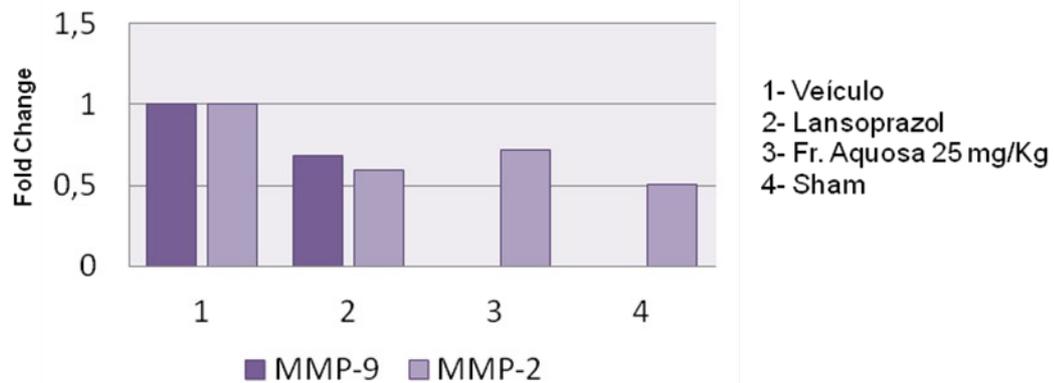
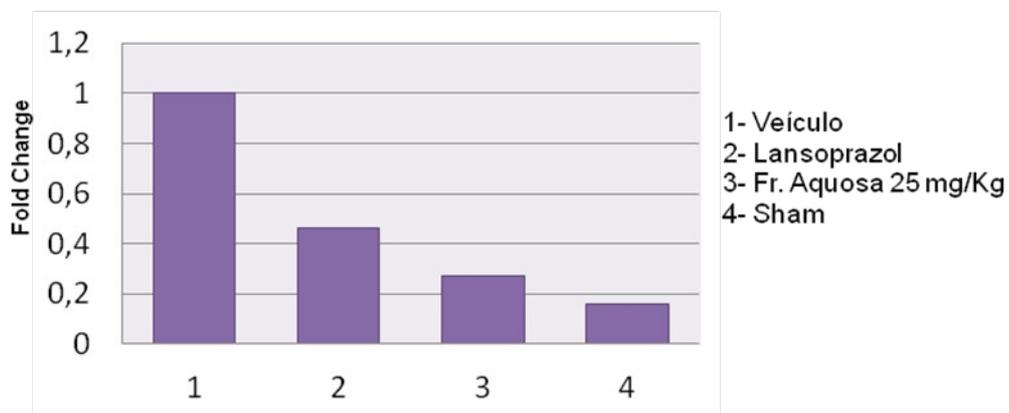


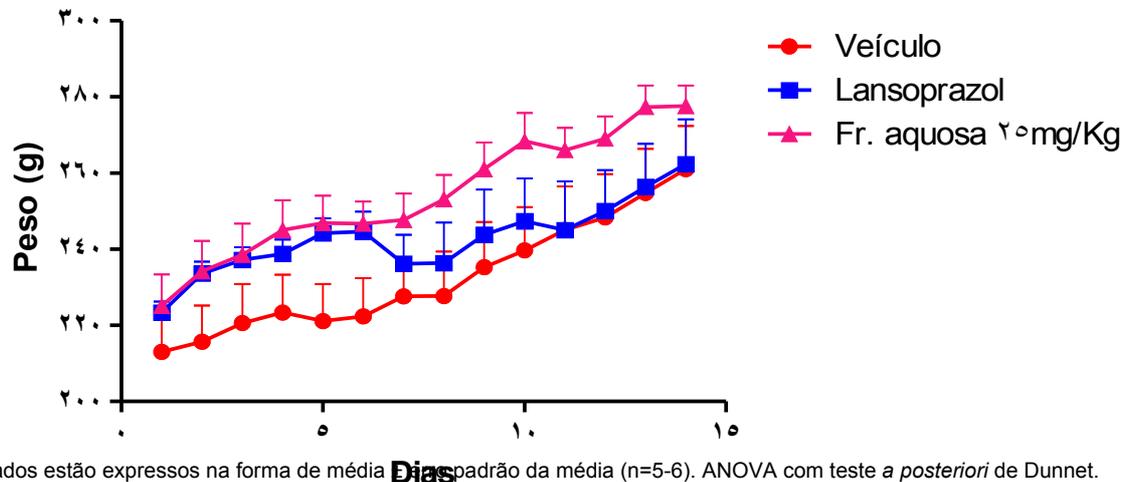
GRÁFICO 20. Efeito do tratamento por 14 dias da Fração aquosa 25 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por ácido acético sobre a atividade gelatinolítica da MMPs -2



#### 4.4.3. TOXICIDADE SUBAGUDA

A administração da fração aquosa na dose de 25mg/Kg durante 14 dias, nos animais que foram submetidos ao modelo de úlcera induzida por ácido acético, não provocou alterações significativas no peso dos animais em relação ao grupo veículo (Gráfico 21). Outro parâmetro analisado foi o peso dos órgãos (Tabela 3), onde não teve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, assim como na análise de parâmetros bioquímicos séricos, não foi encontrada nenhuma alteração nestes parâmetros (Tabela 4).

**GRÁFICO 21. Evolução do peso corporal (g) de ratos tratados durante 14 dias com a fração aquosa de *T. catappa***



Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (n=5-6). ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet.

**TABELA 4. Efeito da administração subcrônica da Fração aquosa de *T. catappa* sobre parâmetros bioquímicos de toxicidade em ratos**

Tratamentos/ Parâmetros	Veículo	Lansoprazol	Fr. Aquosa 25 mg/Kg	Sham
<b>Glicose (mg/dL)</b>	136,90 $\pm$ 7,00	136,40 $\pm$ 5,80	151,00 $\pm$ 8,50	149,00 $\pm$ 4,80
<b>ALT (U/L)</b>	44,30 $\pm$ 2,50	48,00 $\pm$ 5,04	43,10 $\pm$ 3,10	46,50 $\pm$ 6,40
<b>AST (U/L)</b>	157,10 $\pm$ 13,40	181,20 $\pm$ 17,50	190,60 $\pm$ 14,50	172,70 $\pm$ 20,90
<b>Gama GT (U/L)</b>	0,96 $\pm$ 0,17	2,02 $\pm$ 0,55	1,24 $\pm$ 0,25	0,70 $\pm$ 0,12
<b>Uréia (mg/dL)</b>	38,10 $\pm$ 1,12	39,40 $\pm$ 5,35	39,60 $\pm$ 4,23	30,00 $\pm$ 1,73
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,56 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,04

Média  $\pm$  erro padrão dos parâmetros bioquímicos obtidos dos diferentes grupos experimentais (n=5-6) após 14 dias de tratamento diário. ANOVA seguida por teste *a posteriori* de Tukey.

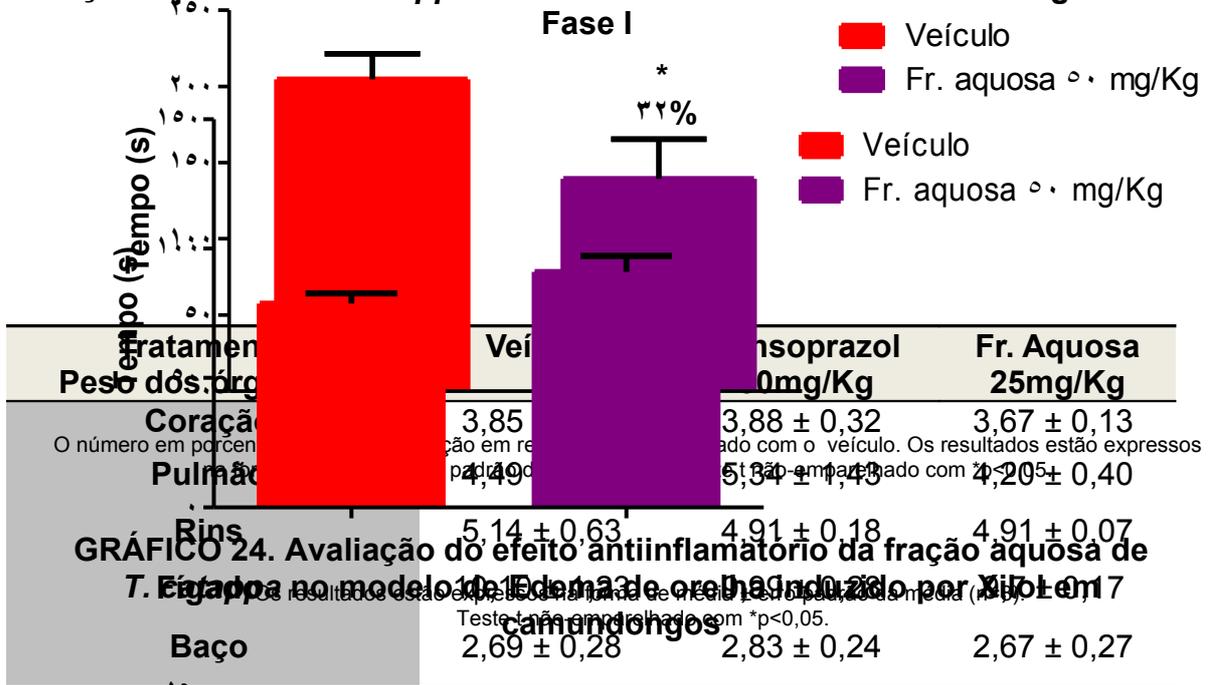
**TABELA 5. Efeito da administração subaguda da Fração aquosa de *T. catappa* sobre o peso dos órgãos de ratos**

**4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA**

**4.5.1. TESTE DE FORMALINA**

Como descrito anteriormente, devido ao envolvimento da via da COX na atuação da fração aquosa foi avaliada sua possível atividade antiinflamatória. Para isso foi realizado o modelo de Formalina, onde a dose de 50 mg/Kg foi escolhida para ser testada. Esse modelo experimental é constituído de duas fases, na Fase I (Gráfico 22), a fração não demonstrou atividade analgésica, e a Fase II (Gráfico 23),

**GRÁFICO 23. Avaliação do efeito analgésico e/ou antiinflamatório da fração aquosa de *T. catappa* no Teste de Formalina em camundongos – Fase II**  
**GRÁFICO 22. Avaliação do efeito analgésico e/ou antiinflamatório da fração aquosa de *T. catappa* no Teste de Formalina em camundongos – Fase I**



de caráter inflamatório, houve uma inibição de 32% no tempo de lambida dos animais em relação ao grupo veículo.

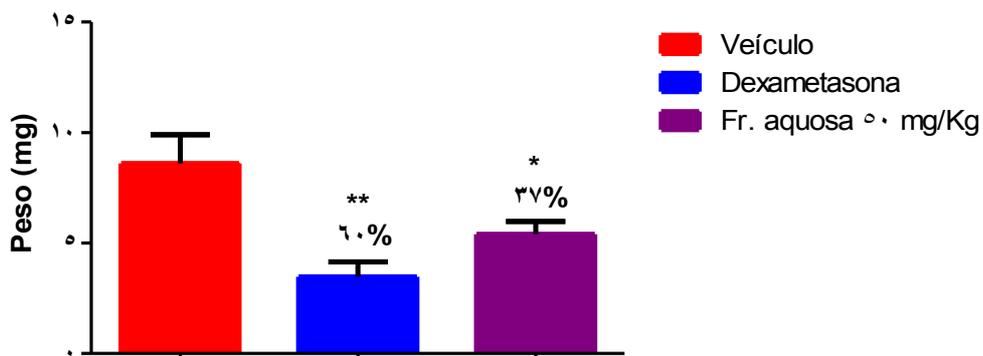
**4.5.2. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR XILOLOL**

No gráfico 24, observamos o efeito da fração aquosa nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg. Os resultados são expressos na forma de média ± erro padrão da média (n=8-10). Teste t não controlado com \*p<0,05.

Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=8-10). Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \*\*p<0,01.

animais tratados somente com a dexametasona, em relação ao grupo tratado com o veículo. A redução da inflamação nos animais tratados com a fração aquosa na dose 50 mg/Kg (37% de redução) é notada, porém não é significativa. Para melhor caracterizar esse efeito foi realizado novo experimento, resultado mostrado no gráfico 25. Foi observada significativa atividade antiinflamatória nos animais tratados com a dexametasona e também com a fração aquosa na dose de 50 mg/Kg, sendo a porcentagem de redução do edema do grupo controle positivo de 60% e da fração de 37%, em relação aos animados tratados com o veículo.

**GRÁFICO 25. Avaliação do efeito antiinflamatório da fração aquosa de *T. catappa* no modelo de Edema de orelha induzido por Xilol em camundongos**

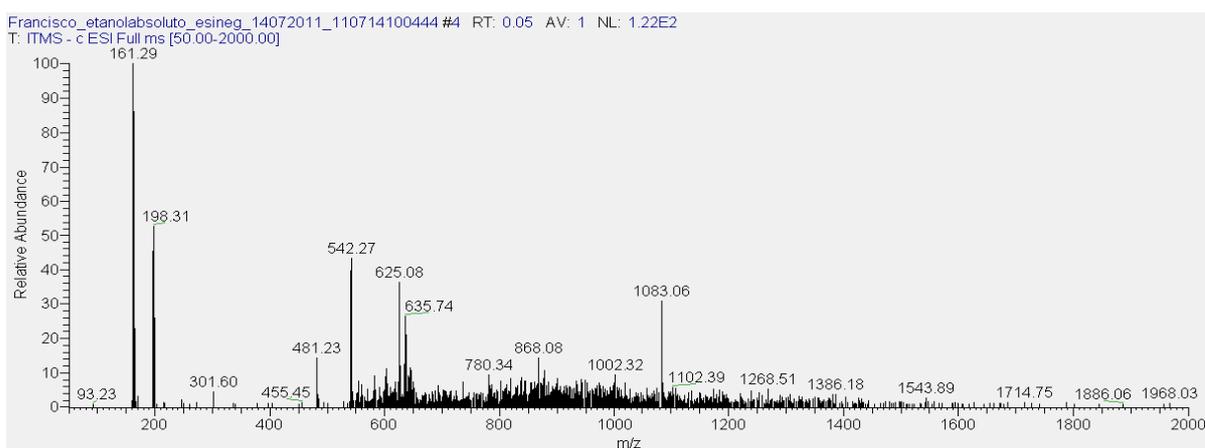


Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo tratado com o veículo (n=8-10). Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO

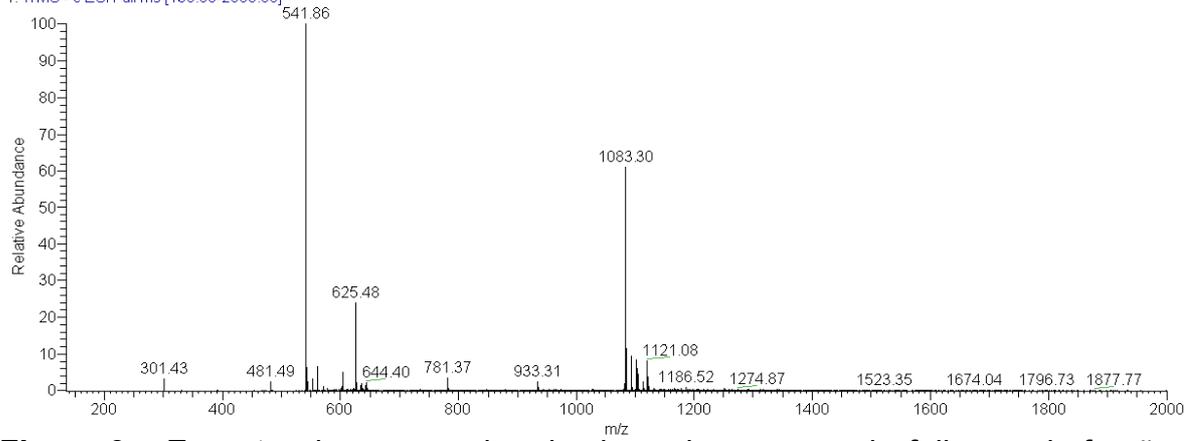
#### 4.6.1. ANÁLISES POR FIA-ESI-IT-MS

Na análise dos espectros de massas em *full-scan* do extrato etanólico absoluto destaca-se os íons precursores  $m/z$  1083 (Punicalagina),  $m/z$  (Punicalina),  $m/z$  (Ácido galágico) e  $m/z$  201 (Ácido elágico). A fração aquosa tem um perfil muito similar ao do extrato etanólico, o íon precursor em  $m/z$  1083 corresponde a molécula de punicalagina. MS/MS deste íon levou ao íon produto de  $m/z$  781 da punicalina a partir da perda do fragmento HDDP. Perda de um resíduo de açúcar leva ao fragmento em  $m/z$  601, correspondente ao ácido galágico. A Figura 2 mostra o espectro de massas em *full-scan* apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas ( $[M - H]^-$ ) do extrato etanólico absoluto das folhas de *Terminalia catappa* L e a Figura 3 mostra o espectro da fração aquosa.



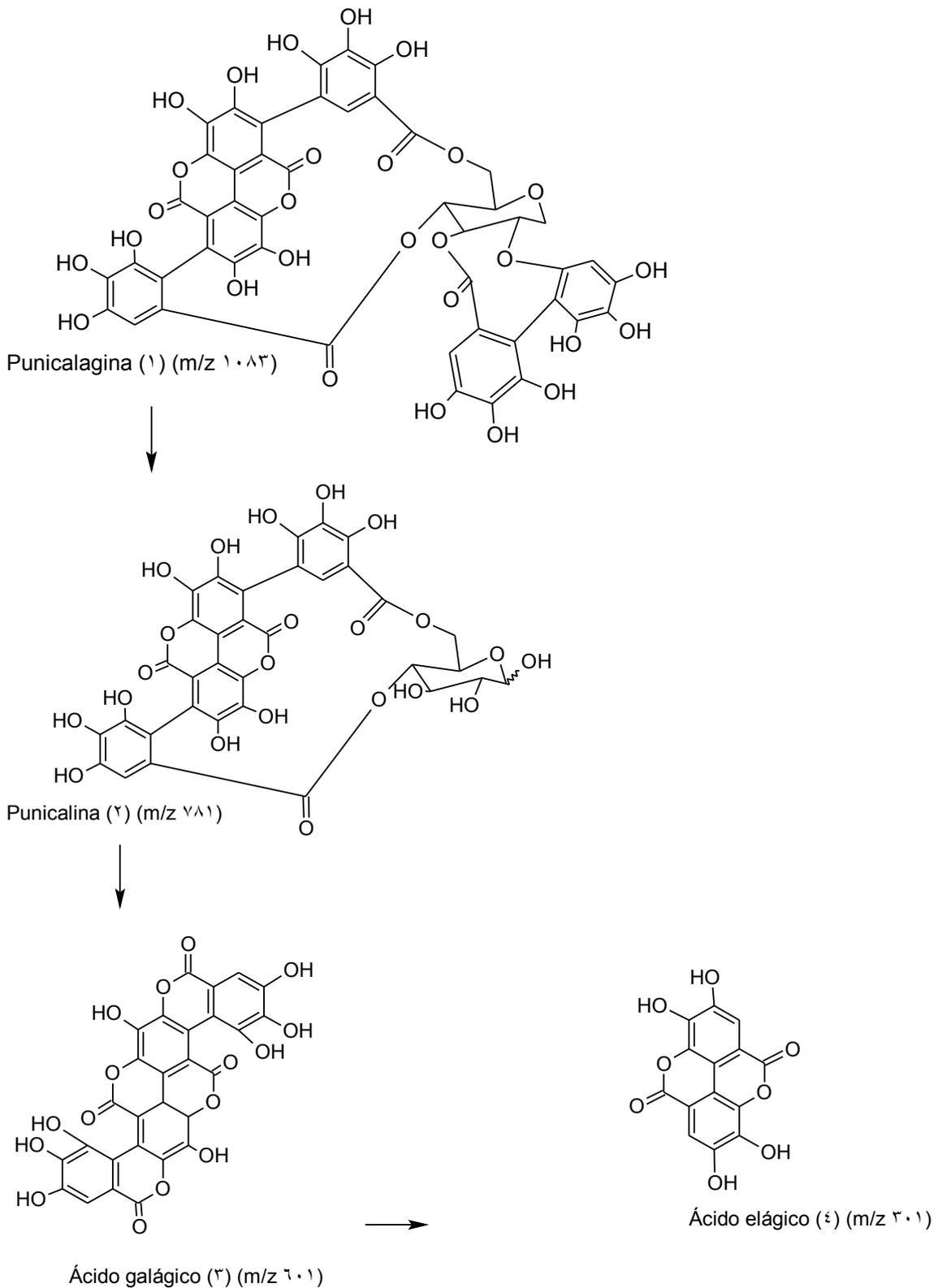
**Figura 2** – Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* do extrato etanólico das folhas de *Terminalia catappa* L. em modo negativo, faixa de íons com  $m/z$  de 50-2000 Da.

Franciscocampaner\_Tcatapaaquoso\_esineg\_2911201101\_111128110906 #1-17 RT: 0.00-0.27 AV: 17 NL: 2.60E2  
T: ITMS - c ESI Full ms [135.00-2000.00]



**Figura 3** – Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* da fração aquosa de *Terminalia catappa* L. em modo negativo, faixa de íons com  $m/z$  de 50-2000 Da.

A Figura 4 mostra as estruturas químicas das moléculas principais encontradas e sua relação com as massas espectrais.



**Figura 4** – Esquema mostrando as estruturas químicas de punicalagina (1), punicalina (2), ácido galágico (3) e ácido elágico (4).

# *Díscussão*

Segundo Cabrera (2005), nas folhas de *Terminalia catappa* estão presentes compostos fenólicos, tais como: terpenóides, flavonóides, ácido chebulágico, quercetol e kaempferol, diterpenos livres, triterpenos e taninos catéquicos. Para esta espécie Angel *et al.*, (2003) relata a presença de taninos hidrolisáveis como compostos majoritários. Considerando a diversidade de compostos fitoquímicos já relatados para a espécie, foi realizado o fracionamento do extrato bruto das folhas de *T. catappa* com três solventes de diferentes polaridades: hexano (apolar), acetato de etila (polaridade intermediária) e uma mistura de metanol/água 80% (polar). Assim, cada fração pode conter os componentes de polaridade correspondente, ocorrendo a separação de distintos componentes para a realização dos ensaios farmacológicos.

Para iniciar a avaliação da atividade antiulcerogênica das três diferentes frações obtidas, utilizou-se o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto. Resultados anteriormente obtidos com o extrato bruto das folhas de *Terminalia catappa* indicaram uma ação gastroprotetora deste extrato. Com o intuito de observar se o fracionamento do extrato desta espécie manteve as mesmas características farmacológicas do extrato bruto ou se o fracionamento foi capaz de separar os compostos responsáveis pela ação antiulcerogênica e conseqüentemente perder sua ação gastroprotetora, realizamos a avaliação das frações neste modelo experimental.

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 sangüíneos, 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 dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células que são fatores importantes na proteção da mucosa gástrica (Repetto & Llesuy, 2002).

Devido ao fato do modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto causar lesões severas, quando administrado agudamente, em geral este modelo experimental, é utilizado para a caracterização inicial de substâncias com propriedades farmacológicas gastroprotetora. Neste trabalho, as três frações de *T.*

*catappa*, em diferentes níveis de doses (25, 50 e 100 mg/Kg) foram avaliadas para estabelecer a fração mais ativa e a melhor dose efetiva para a continuidade dos estudos.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, as três frações possuem ação gastroprotetora. A fração hexânica (52% de proteção) e a fração acetato (50% de proteção), ambas na dose de 100 mg/Kg, e a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg (43% de proteção).

Os mecanismos gastroprotetores evidenciados nos modelos de indução de úlcera por etanol são variados. As drogas antiulcerogênicas que possuam propriedade antioxidante tendem a proteger a mucosa dos 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 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).

O fato das três frações terem apresentado significativo efeito gastroprotetor indica que o fracionamento não foi capaz de separar os compostos com ação antiulcerogênica, inicialmente caracterizados no extrato bruto. Porém, se destaca entre o conjunto de resultados aqueles obtidos pela fração aquosa que exerceu elevada gastroproteção (redução de 42,61%, em relação ao grupo tratado com o veículo) na dose de 25 mg/Kg. Então, a partir deste resultado, esta fração, nesta dose, foi selecionada para dar continuidade a investigação dos mecanismos de ação gastroprotetora da espécie medicinal através de outros modelos experimentais *in vivo*.

Para caracterizar de modo mais preciso o mecanismo de ação da fração aquosa, foi realizada uma curva dose resposta (25, 50 e 100 mg/Kg) no modelo de úlcera gástrica induzida por um DAINÉ, no caso, a indometacina. As DAINÉs são reconhecidamente indutores de úlcera, e diversos mecanismos estão envolvidos nesse processo. Sua ação pode ser local, principalmente aqueles que possuem um caráter ácido, que danificam as células epiteliais, bem como uma ação sistêmica. Esses fármacos são capazes de reduzir a secreção de muco e bicarbonato, e assim alterar o pH da mucosa gástrica. Estas alterações tornam a barreira mucosa mais susceptível a danos, bem como destroem a camada de fosfolípidios que a recobre, facilitando a ação do suco gástrico na mucosa. Contudo, o efeito sistêmico mais

importante, é a capacidade dos DAINEs de inibir a síntese de PGs, que são responsáveis pela modulação de vários componentes envolvidos na defesa da mucosa. Estudos correlacionaram de forma direta a capacidade de diversos DAINEs em suprimir a síntese dessas substâncias bem como de sua habilidade em causar danos gástricos. Outro efeito dessa classe medicamentosa é a diminuição do fluxo sanguíneo, que é conseqüência da supressão da atividade da COX-1. Esta redução do fluxo sanguíneo na mucosa por si só não causa danos. Entretanto, somado a outros fatores que tornam a mucosa sensível, pode inclusive, prejudicar a reestruturação da mucosa após uma injúria (Wallace, 2008).

Além de todas essas ações já citadas, os antiinflamatórios não-esteroidais causam a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, esse processo é mediado, principalmente via leucotrieno B<sub>4</sub>. Essas células induzem dano celular por liberar uma série de enzimas proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio. Estas respostas da ação das DAINEs também caracteriza o envolvimento de estresse oxidativo, no surgimento das lesões gástricas. O efeito inibitório dos antiinflamatórios não-esteroidais sobre a agregação plaquetária também é importante para o aparecimento de lesões gástricas, e é resultante da inibição da COX-1. Ocorre como conseqüência deste evento uma diminuição na liberação de tromboxano A<sub>2</sub>, que produz como efeito final a ocorrência de hemorragias (Wallace, 2008). E, por fim, outro componente desse processo de lesão gástrica mediado pelas DAINEs é o aumento da secreção ácida. Foi demonstrado em estudos que o tratamento concomitante de um DAINE com um inibidor de bomba protônica (agente antissecretor) reduz para cerca de 5% a incidência de ulceração, comparado com pacientes que receberam placebo associado a um DAINE ou a um inibidor seletivo de COX-2, onde esse índice foi de 20% (Scheiman *et al.*, 2006). Portanto, o processo de agressão à mucosa gástrica que leva a úlcera causada pelos DAINEs é multifatorial, e várias vias complexas e interligadas estão envolvidas. Contudo a via da COX se destaca em todo o processo, sendo muitas vezes o fator chave desencadeante de outras ações.

A indometacina é uma droga antiinflamatória 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, à sua capacidade de inibição da COX-1. Porém, diversos estudos demonstram que, na realidade, ambas isoformas estão envolvidas no processo de citoproteção (Suleyman *et al.*, 2010). A enzima COX é responsável por catalisar a primeira etapa da reação de síntese do ácido aracônico em seus metabólitos: PG, tromboxano A<sub>2</sub>, 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 a formação de lesão na mucosa gástrica (Suleyman *et al.*, 2010).

Conforme descrito anteriormente, no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina a fração aquosa mostrou um efeito dose-resposta bastante semelhante ao obtido no modelo de indução de úlcera por etanol, com redução na área de lesão nas doses de 25 e 100 mg/Kg, e aumento da lesão na dose de 50 mg/Kg. Porém, apenas a dose de 100 mg/Kg da fração aquosa foi capaz de reduzir de forma significativa as lesões (70% de inibição). Como a dose de 25 mg/Kg não se mostrou gastroprotetora nesse modelo (embora tenha sido a que melhor respondeu no modelo de etanol) concluiu-se que possivelmente houve o envolvimento da via da COX no mecanismo gastroprotetor. Com a indometacina bloqueando essa via e diminuindo a produção de PGs, qualquer substância que necessite dessa via para ter ação, perderia sua efeito. De maneira oposta, a dose de 50 mg/Kg da fração aquosa, aumentou a área de lesão em relação ao grupo tratado com o veículo (embora não significativa). Essa tendência de ulcerogênese também observada no modelo de etanol dá indícios de que de alguma forma a fração poderia estar potencializando a lesão. Este resultado observado conjuntamente com a administração de indometacina, levou-nos a concluir que nessa dose a fração aquosa de *T. catappa* pode causar a inibição da via da COX, o que levaria a uma diminuição ainda maior dos fatores protetores da mucosa, e justificaria o aumento das lesões.

Para que essas hipóteses envolvendo as doses de 25 e 50 mg/Kg da fração aquosa pudessem ser comprovadas, buscou-se um modelo onde esses dois fatores poderiam ser testados. Para isso animais foram pré-tratados com indometacina, e então, tratados posteriormente com o agente lesivo etanol. Foi visto que quando os

animais foram pré-tratados com indometacina, a dose de 25 mg/Kg da fração aquosa perdeu sua ação gastroprotetora. Entretanto, a dose de 50 mg/Kg, promoveu aumento na área de lesão, demonstrando então que ambas as doses possuem envolvimento na via da COX, mas de diferentes maneiras. Porém, como visto anteriormente, a indometacina é um inibidor não-seletivo das duas isoformas da COX, assim sendo para melhor definição do papel de cada isoenzima no mecanismo de ação das duas doses da fração aquosa, o mesmo experimento foi realizado, utilizando-se como pré-tratamento o etoricoxibe (um inibidor seletivo da COX-2).

Nesse modelo experimental, a dose de 25 mg/Kg manteve o mesmo padrão de comportamento tanto no pré-tratamento com salina, como com o etoricoxibe. No qual, manteve sua gastroproteção. Assim sendo a inibição da enzima COX-2 não está envolvida diretamente no mecanismo de ação da fração nesta dose, estando nesse processo apenas a ação da enzima COX-1. Embora a PG derivada de ambas as isoenzimas são importantes na manutenção da defesa da mucosa gástrica, elas desempenham funções diferentes. Os prostanóides derivados da COX-1 são responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo da mucosa e a secreção epitelial de muco e bicarbonato, enquanto os da COX-2 têm o papel de influenciar a proliferação epitelial e a aderência endotelial de leucócitos (Wallace & Devchand, 2005). Entretanto a dose de 50 mg/Kg da fração aquosa, promoveu um aumento expressivo na área de lesão. Esse resultado é um claro indicativo de que a fração nesta dose está potencializando a inibição da via da COX, provavelmente por inibição das duas isoformas, assim sendo ela teria uma potencial atividade antiinflamatória, dados que serão melhor discutidos posteriormente.

Visto que as PGs estimulam a ação de outros fatores protetores da mucosa buscou-se neste trabalho saber qual o envolvimento desses fatores na gastroproteção. Assim foi avaliado o papel do NO na gastroproteção da fração aquosa de *T. catappa*. Quando os animais foram pré-tratados com L-NAME (um inibidor da NO sintase, enzima responsável pela produção de NO), e tratados com a fração aquosa, a proteção anteriormente observada foi revertida, demonstrando portanto que o NO está envolvido na resposta protetora da fração. Isso se deve porque o principal papel do NO envolve a manutenção do fluxo, isso a partir de sua liberação do endotélio, também atua mantendo a integridade do epitélio gástrico e estimulando a secreção e síntese de muco e bicarbonato (Brzozowski *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2011).

O muco também é um dos componentes envolvidos na gastroproteção da fração aquosa, na quantificação de muco feita a partir do modelo de ligadura de piloro, observou-se que os animais tratados com *Terminalia catappa* tiveram 42% de aumento nessa barreira protetora. O muco é um componente importante e é basicamente um gel formado por glicoproteínas e água, possui uma consistência viscosa, elástica e aderente, e para exercer sua ação depende não apenas de suas características estruturais, mas também da sua espessura (Laine, 2008). Assim sendo o aumento desse fator protetor, diminui os danos causados pelos fatores agressores, tanto pela neutralização do pH, como por evitar que, por exemplo, o ácido clorídrico entre em contato com as células epiteliais.

Os grupamentos sulfidrilas também são responsáveis pela manutenção da integridade gástrica por estimular a produção de muco e mantê-lo, assim como desempenham papel antioxidante por evitar que espécies reativas de oxigênio causem dano a mucosa (Hiruma-Lima *et al.*, 2009; Natale *et al.*, 2004). Quando os animais foram pré-tratados com NEM (um bloqueador dos grupamentos sulfidrilas) a fração aquosa, não teve alterada sua atividade gastroprotetora. Dessa forma o aumento na produção de muco se deve pela atividade do NO, envolvendo a via das PGs. No entanto, uma possível atividade antioxidante da fração não pode ser descartada.

O surgimento de lesão gástrica no modelo de isquemia-reperfusão se deve majoritariamente pela produção excessiva de EROS, que juntamente com uma ativação de neutrófilos e alteração no fluxo sanguíneo induz a formação de lesões gástricas. Além disso, a isquemia enfraquece a barreira da mucosa gástrica, tornando-a susceptível ao ataque pelo suco gástrico, ocorrendo conjuntamente a peroxidação lipídica (induzida pelos radicais livres) mais agressão à mucosa (Brzozowski *et al.*, 1999). Nesse modelo, a *Terminalia catappa* também demonstrou atividade gastroprotetora, que pode ser por uma ação antioxidante. Dados na literatura mostram que a exposição à isquemia-reperfusão produz uma significativa diminuição na geração de PG, mas esses níveis são restaurados durante a recuperação da mucosa, podendo também ser esse um dos mecanismos pelos quais a fração aquosa atue, através da já caracterizada manutenção dos níveis de PGs (Brzozowski *et al.*, 1999).

O aumento da secreção ácida é um dos fatores lesivos à mucosa e para verificar se a fração atua via este componente foi feito o modelo de ligadura de

piloro, onde ocorre acúmulo da secreção gástrica e lesão na mucosa (Almeida *et al.*, 2012). Tanto com a administração da fração aquosa por via oral, como por via intraduodenal, não houve alteração na concentração de íons  $H^+$ , o que indica uma ausência de atividade antissecreatória para a fração. Porém, o tratamento dos animais com a fração aquosa promoveu o aumento no volume gástrico, porém isso pode ser decorrente do aumento da secreção de muco, já caracterizado anteriormente. Embora as PGs tenham uma atuação inibitória sobre a secreção de ácido, em roedores isso ocorre apenas com doses bem mais elevadas do que as necessárias para seu efeito citoprotetor (Wallace, 2008).

Para caracterizar a participação da atividade antioxidante no mecanismo de ação da *Terminalia catappa* foi feita a quantificação dos níveis de glutatona e de mieloperoxidase, sendo escolhidos para essa avaliação os modelos de úlcera induzida por etanol e por isquemia-reperfusão.

A glutatona é um tripeptídeo encontrado em todos os tipos de tecido de mamíferos, porém em maior quantidade no fígado. Sua forma predominante é na forma reduzida (GSH) e sua localização é intracelular por ser resistente ao processo de degradação. A glutatona possui várias funções tais como, a detoxificação de eletrófilos, sequestro de radicais livres, manutenção do grupamento tiol nas proteínas, prover um reservatório de cisteína e modular processos celulares críticos, como, por exemplo, a síntese de DNA e processos relacionados aos microtúbulos e função imune. O excesso de EROs pode levar à peroxidação lipídica e como consequência o dano celular, processo que ocorre na isquemia-reperfusão, e pela ação do etanol na mucosa gástrica. A GSH é capaz de reduzir essas espécies reativas, e oxidando-as na forma de GSSG, neutralizando-as. Essa atuação da glutatona é extremamente importante, principalmente na mitocôndria, onde não há a presença de catalase. Um estresse oxidativo severo, porém, pode superar a capacidade da célula em reduzir GSSG à GSH, ocorrendo um acúmulo intracelular da forma oxidada. Para que esse acúmulo não altere o equilíbrio, o GSSG pode ser transferido para fora da célula, o que gera a depleção dos níveis de GSH (Lu, 2009).

No modelo de etanol, a fração aquosa não foi capaz de evitar a depleção da glutatona, não sendo então esse um dos mecanismos de sua ação protetora. Todavia, na isquemia-reperfusão, a fração aquosa foi capaz de aumentar essa defesa antioxidante, o que contribuiu para a neutralização das espécies reativas geradas no processo, e dessa forma diminuir as lesões.

A enzima mieloperoxidase é um importante marcador para a infiltração de neutrófilos, estando presente no tecido gástrico lesado, e relacionada ao processo inflamatório agudo (Dengiz *et al.*, 2007; Guha *et al.*, 2009). No modelo de etanol, a fração aquosa de *Terminalia catappa* foi capaz de diminuir a atividade dessa enzima, mostrando que o processo inflamatório está diminuído, e em consequência o estresse oxidativo gerado pela liberação de EROs pelos neutrófilos também é menor. Mas esse padrão de atividade não se mantém na isquemia-reperfusão, onde ela não é capaz de diminuir a atividade dessa enzima, o que sugere que sua ação antioxidante varia de acordo com o indutor da ulcerogênese.

Outro parâmetro bioquímico analisado foi a dosagem hormonal de CCK e Somatostatina. A CCK é um hormônio intestinal e sua função fisiológica é a regulação das secreções gástrica e pancreática, assim como está envolvida na motilidade do TGI. Estudos demonstraram que esse hormônio também atua na manutenção da integridade da mucosa gástrica e do fluxo sanguíneo. Em parte, essa ação de manutenção se deve a liberação de NO e de CGRP, assim como por uma atuação parácrina via receptor CCK-A nas células D, que resulta na liberação de somatostatina, que por sua vez é o principal inibidor da secreção de ácido, atuando diretamente nas células parietais, ou indiretamente, inibindo a secreção de histamina pelas células enterocromafins e de gastrina pelas células G antrais. Esse papel dos dois hormônios está bem elucidado no modelo de úlcera induzida por etanol, onde a atuação de ambos produz citoproteção, sendo componentes importantes nesse processo também o NO e as PGs (Almeida *et al.*, 2012; Konturek *et al.*, 1998). Contudo, o objetivo da dosagem desses hormônios neste trabalho foi verificar sua atuação no modelo de ligadura de piloro. Embora a *Terminalia catappa* não tenha apresentado atividade antissecreatória, ela causou um aumento expressivo no volume gástrico, o que pode ser justificado com o aumento na produção de muco. Mas buscou-se avaliar se a fração poderia ter alguma atuação sobre níveis hormonais que poderiam justificar essa atividade. O resultado encontrado nas duas dosagens foi que não houve alteração em nenhum dos grupos, o que pode sugerir que não há alteração desses hormônios nesse processo experimental, porém esse resultado deve ser mais bem investigado.

Além da atividade gastroprotetora da fração e os mecanismos de ação envolvidos, foi avaliado neste trabalho, a atividade cicatrizante, sendo escolhido para isso o modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético. Este modelo

experimental é o que mais se aproxima da doença ulcerosa humana, e o dano causado pelo ácido não se restringe a camada de muco e a submucosa, mas ele se estende até a camada muscular (Bonamin *et al.*, 2011). Os resultados obtidos com 7 e 14 dias de tratamento com a fração aquosa na dose de 25 mg/Kg foi uma diminuição significativa na área de lesão, sendo essa mais expressiva na primeira semana de tratamento (80% de inibição). Porém, pode se observar que com 14 dias a área de lesão, mesmo do grupo veículo já é reduzida, devido ao processo de cura espontânea, portanto a *Terminalia catappa* além do mecanismo gastroprotetor já evidenciado, possui atividade cicatrizante sobre a mucosa gástrica.

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. Nesse processo, é especialmente 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 das 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 (Konturek *et al.*, 2005). Como nos modelos agudos a fração aquosa mostrou atuação sobre a regulação de PGs, pode se esperar que ela também atue sobre essa via na cicatrização, o que justificaria a sua atividade tão expressiva.

O processo de cicatrização também envolve a expressão local de diversos fatores de crescimento na área da úlcera, como o: EGF, TGF $\alpha$ , HGF e bFGF, além da gastrina (Konturek *et al.*, 2005). Nesse evento também se encontram as metaloproteinases, que são enzimas responsáveis pela degradação e remodelagem da matriz extracelular do tecido, na área lesada. As MMPs podem ser divididas em quatro grupos de acordo com sua especificidade a determinado substrato. As colagenases que degradam colágeno intersticial, as gelatinases A e B (MPP-2 e MPP-9), que quebram gelatina, colágeno do tipo IV, V, VII e IX, elastina e fibronectina, stromelisin 1-3, quem tem uma ampla especificidade e, por fim, as MMP do tipo membrana (Shahin *et al.*, 2001). Essas enzimas são sintetizadas e secretadas por células epiteliais gástricas, macrófagos e neutrófilos, e sua ativação é dependente de vários fatores como proteases celulares e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Singh, 2007).

A MPP-2 está envolvida no processo de ulceração e remodelagem da matriz extracelular, enquanto a MPP-9 está relacionada principalmente ao processo inflamatório. Shahin e colaboradores (2001) mostraram que a primeira observação da expressão do RNA-MPP-2 ocorre 24 horas após a indução da lesão, o que coincide com a remoção do tecido necrosado, e que com 48 horas ocorre um aumento na expressão, que ocorre conjuntamente com a ampliação do diâmetro da lesão, após a retirada total do tecido necrosado. Esses dados mostram que a MPP-2 tem um potencial de destruição, promovendo o processo de ulceração através da degradação local da matriz e de proteólise tecidual. Existe uma correlação entre o aparecimento da MPP-2 com o surgimento do infiltrado inflamatório, pois são principalmente as células presentes nesse que dão origem a essas enzimas. E a presença dela é constatada na parede gástrica até 3 semanas após a indução da lesão. Parte disso se dá porque elas são necessárias para que ocorra a migração de fibroblastos, neutrófilos e macrófagos para a área lesada, e assim esses efetuem o reparo. No 30º dia, a atividade enzimática diminui, mesmo tempo em que a síntese de colágeno é neutralizada, o que indica um equilíbrio entre a degradação tecidual e o processo de reconstrução, prevenindo uma deposição excessiva de colágeno, que levaria a formação de uma cicatriz.

Os dados obtidos na zimografia estão de acordo com a literatura, há a presença de MPP-2 tanto no tratamento por 7 como por 14 dias. E, o tratamento com a fração aquosa, nos dois períodos, leva a diminuição da atividade dessa enzima, o que corrobora com os dados reduzidos de área de lesão dessas. O que torna interessante em relação a esse dado é que pode ser observada uma melhora não apenas quantitativa nas lesões, mas também qualitativa, quando se observa uma menor atividade da MPP-2 evidencia de uma menor presença de células inflamatórias, e também de menor liberação de colágeno, garantindo assim uma melhor reestruturação do tecido. Srikanta (2010), em seu estudo sugere uma correlação recíproca entre a ativação de PGs e a down-regulation de MPPs durante o processo de cicatrização, o que pode ser um indício de que a fração aquosa poderia não estar atuando diretamente sobre a atividade da MPP-2, mas fazendo isso de modo indireto, através da PG que irá participar no processo de cicatrização. Nos grupos de animais tratados com o veículo e com lansoprazol, durante 7 dias, foi observada a atividade da MPP-9, bem mais evidente no primeiro grupo. Como essa

MPP está relacionada a um processo inflamatório, isso dá indicativo de um pior quadro de lesão, mas que com 14 dias já não é mais observado.

Em vista do tratamento prolongado por 14 dias foi possível avaliar também alguns parâmetros de toxicidade com doses repetidas. Os resultados obtidos indicam que não houve nenhuma alteração no ganho de peso dos animais, no peso dos órgãos, e nos parâmetros bioquímicos sanguíneos. Assim sendo, a fração aquosa não apresenta indícios de toxicidade quando tratados com a dose de 25 mg/Kg, porém isso não descarta um potencial tóxico para essa planta em doses maiores.

Como discutido anteriormente, a fração aquosa na dose de 50 mg/Kg, apresentou um potencial efeito sobre a inibição da COX-2, o que pode ser correlacionada a uma atividade antiinflamatória. No processo inflamatório, há a presença da COX-2, e essa é a responsável pelo aumento da produção de PGs, que vai ter seu papel como mediador da resposta inflamatória. Para desvendar este processo, pesquisadores desenvolveram novas drogas que atuassem diretamente na inibição dessa enzima, e diminuindo os efeitos colaterais. O aumento da produção de PGs no local onde há lesão gera a sensibilização de nociceptores, levando a hiperalgesia, portanto o bloqueio da via da COX-2 gera como resultado um efeito antiinflamatório e analgésico (Turini & DuBois, 2002).

Para a verificação da atividade antiinflamatória da fração aquosa foi feito o Teste de Formalina, que consiste em duas fases, a primeira fase (dor inicial) é decorrente da estimulação direta dos nociceptores, e a fase tardia (secundária às reações inflamatórias), vários mediadores químicos são liberados pelas células lesadas e estão envolvidos como a histamina, cininas, serotonina e PGs. Todos esses mediadores contribuem para o processo inflamatório, estimulam nociceptores e induzem a dor, portanto, drogas capazes de reduzir essa resposta inflamatória, mostram atividade nessa segunda fase (Esfahani *et al.*, 2011). E foi exatamente sobre esta fase o resultado obtido com a dose de 50 mg/Kg da fração aquosa possui efeito. Embora a fração aquosa não tenha demonstrado atividade na primeira fase, causou a redução de 32% na resposta ao estímulo doloroso, o que comprova sua atividade antiinflamatória.

Para melhor caracterizar essa atividade sobre o processo inflamatório foi escolhido também o modelo de edema de orelha induzido por xilol, e nesse foi feita uma curva dose-resposta. Em um primeiro experimento foram utilizadas as doses de

25, 50 e 100 mg/Kg, embora nenhuma das três tenha apresentado uma inibição estatisticamente significativa do edema, em relação ao controle negativo, a dose da fração aquosa que mostrou maior potencial de diminuição foi a dose de 50 mg/Kg, (inibição de 37%). Para validar esse resultado, foi feito um novo experimento, onde essa última dose da fração continuou mostrando a mesma porcentagem de inibição, corroborando então com os dados obtidos no modelo de úlcera induzida por indometacina, e também com a atividade antiinflamatória anteriormente descrita no Teste de Formalina.

No modelo experimental de edema de orelha induzido por xilol há o envolvimento de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, bradicinina e PG, e esses atuam promovendo vasodilatação e aumentando a permeabilidade vascular (Li *et al.*, 2011). Assim sendo a inibição da COX-2 pela fração aquosa na dose de 50 mg/Kg levaria a diminuição de PG o que levaria ao efeito antiinflamatório encontrado.

Após avaliado todo o potencial farmacológico da fração aquosa, gastroprotetor, cicatrizante e antiinflamatório, buscou-se traçar seu perfil fitoquímico para que fosse determinado os principais constituintes e ser feita correlação com as atividades biológicas encontradas. A análise por espectrometria mostrou que os componentes majoritários da fração aquosa são a punicalagina, punicalina, ácido elágico e ácido galágico, e todos são taninos hidrolisáveis. Isso está de acordo com a literatura onde outros estudos com extratos obtidos a partir da *Terminalia catappa* demonstraram o mesmo perfil. Chen *et al.* (2000), descreve a punicalagina como principal componente e descreve sua atividade contra genotoxicidade induzida por bleomicina. Kinoshita *et al.* (2007) também correlaciona os taninos como constituintes principais e descreve a atividade antioxidante e hepatoprotetora.

Vários compostos polifenólicos, incluindo os taninos, possuem efeitos antissecretório e antiulcerogênico e, tradicionalmente, diversos extratos de plantas que são ricos em taninos são utilizados para distúrbios gástricos. Alguns autores já demonstraram a atividade antiulcerogênica de taninos hidrolisáveis, como Khennouf *et al.* (2003) que relatou a ação de pedunculagina, phyllyraeoidina e castalagina, como antissecretores e antioxidantes, sendo que ele destaca que os elagitaninos possuem uma maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica do que outros taninos. Também Beserra *et al.* (2011) mostrou a atividade gastroprotetora do ácido elágico, tendo ação antissecretória e antioxidante. Embora, os resultados obtidos com

a *Terminalia catappa* não evidenciaram atividade antissecreatória, ela possui ação antiulcerogênica, antioxidante, cicatrizante e antiinflamatória, isso provavelmente devido a uma interação entre todos os componentes presentes no extrato.

# *Conclusão*

As três frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto das folhas de *Terminalia catappa* possuem atividade gastroprotetora, porém a que possui atividade significativa, e com menor dose, foi a fração aquosa. Sua ação gastroprotetora foi evidenciada frente a fatores ulcerogênicos, tais como: etanol absoluto, indometacina e isquemia-reeperusão. A gastroproteção se deve principalmente ao aumento de fatores protetores como PG, NO e muco, e a ação antioxidante. Também possui atividade cicatrizante e antiinflamatória, sendo todas essas atribuídas aos taninos hidrolisáveis que são seus componentes majoritários.

# *Referências Bibliográficas*

- ALMEIDA, A.B. A.; *et al.* Anti-Ulcerogenic Mechanisms of the Sesquiterpene Lactone Onopordopicrin-Enriched Fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): Role of Somatostatin, Gastrin, and Endogenous Sulfhydryls and Nitric Oxide. **J Med Food.**, 2012.
- ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Meth. Enzymol.**, 113: 548-555, 1985.
- ÁNGEL, M.H.; *et al.* Almendro de La India: potencial biológico valioso. **Rev. Cub. de Invest. Biomed.** 22: 41-47, 2003.
- BESERRA, A.M.S.S.; *et al.* Gastroprotective and Ulcer-Healing Mechanisms of Ellagic Acid in Experimental Rat. **J. Agri. Food Chem.** 59: 6957-6965, 2011.
- 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.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72:248-54, 1976.
- BRZOZOWSKI, T. *et al.* Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **J. Physiol. Pharmacol.**, 56 (5): 33-55, 2005.
- BRZOZOWSKI, T.; *et al.* Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. **Europ. J. Pharmacol.**, 385: 47-61, 1999.
- CABRERA, I.R. Las Plantas y sus usos en las Islas de Providencia y Santa Catalina. Primeira edição. Programa editorial Universidad del Valle, Cali, 2005.
- CHEN, P.S.; LI, J.H. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH373 cells. **Toxicol. Letters** 163(1): 44-53, 2006.
- CHEN, P.S.; LI, J.H.; LIU, T.Y.; LIN, T.C. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Letters** 152: 115-122, 2000.
- CHYAU, C.C.; KO, P.T.; MAU, J.L. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. **LWT – Food Sc. and Techn.** 39(10): 1099-1108, 2006.

- CHYAU, C.C.; TSAI, S.Y.; KO, P.T.; MAU, J.L. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Chem.** 78: 483-488, 2002.
- CORNE, S.J.; MORRISSEY, S.M.; WOODS, R.J. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol.**, 242(2):116-117.
- CURTIS, G. H.; et al. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 73: 130-134, 1995.
- D'ACAMPORA, A. J. Perfil Epidemiológico Dos Pacientes Portadores De Úlcera Péptica Perfurada Atendidos No Centro Cirúrgico Do Hospital Florianópolis. **Rev. Med. Res. Vol.** 10 (4): 138, 2008.
- DELELLA, F.K.; JUSTULIN, L.A.J.; FELISBINO; S.L. Finasteride treatment alters MMP-2 and -9 gene expression and activity in the rat ventral prostate. **Inter. J. Andrology.**, 33:114-122, 2010.
- DENGIZ, G.O.; et al. Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. **Arch. Pharm. Res.**, 30: 1426-1434, 2007.
- DHAR, U.; et al. Current status and future strategy for development of medicinal plants sector in Uttaranchal. **India. Current Science.** 83: 957-964, 2002.
- ESFAHANI, H.M.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Alkanna frigida* and *Alkanna orientalis*. **J. Nat. Med.**, 2011.
- FAN, Y.M.; et al. Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. **Fitoterapia** 75: 253-260, 2004.
- FREITAS, F.F.B.P.; et al. Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **J. Ethnopharmacol.**, 137:700-708, 2011.
- FYHRQUIST, P.; et al. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzânia. **J. Ethnopharmacol.** 79: 169-177, 2002.
- GUHA, P.; et al. Improved antiulcer and anticancer properties of trans-resveratrol analog im mine. **J. Pharmacol. Exper. Therap.**, 323: 829-839, 2009.
- GUIDOBONO, F.; et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **Br. J. Pharmacology**, 120: 581-586, 1997.
- HIRUMA-LIMA, C.A.; et al. The anti-ulcerogenic effects of *Curatella Americana* L. **J. Ethnopharmacol.**, 121: 425-432, 2009.

- HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** 30(1): 103-104, 1987.
- KHENNOUF, S.; *et al.* Effect of Tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* Leaves on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice. **J. Agric. Food Chem.** 51: 1469-1473, 2003.
- KINOSHITA, S.; INOUE, Y.; NAKAMA, S.; ICHIBA, T.; ANIYA, Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. **Phytomedicine** 14: 755-762, 2007.
- KONTUREK, J.W.; *et al.* Physiological Role of Cholecystinin in Gastroprotection in Humans. **Amer. J. Gastroenterol.**, 93:12, 1998.
- KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **J. Physiol. Pharmacol.**, 56 (5): 5-31, 2005.
- KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. **Gastroenterology**, 87: 1344-1350, 1984.
- LAINE, L., TAKEUCHI, K., TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterol.**, 35: 41–60, 2008.
- LI, Y.; *et al.* Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from *Pogostemonis Herba* in animals models. **Fitoterapia**, 82: 1295-1301, 2011.
- LIMA, Z.P. ; *et al.* Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? **J. Ethnopharmacol.**, 106(1):29-37, 2006.
- LIMA, Z.P.; *et al.* *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **J. of Ethnopharmacol.** 120(2):149-60, 2008.
- LIN, C.C.; CHEN, Y.L.; LIN, J.M.; UJIE, T. Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Terminalia catappa*. **Am. J. of Chinese Med.** 25: 153-161, 1997.
- LIN, C.C.; HSU, Y.F.; LIN, T.C. Effects of punicalagin and punicalin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Am. J. of Chinese Med.** 27: 371-376, 1999.
- LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molec. Aspec. Med.**, 30:42-59, 2009.

- MACIEL, M.A.M.; ANGELO, C.P; VEIGA, V.F.J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, 25 (3): 429-438, 2002.
- MASUDA, T.; *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. **J. Agric. And Food Chem.** 47: 1749-1754, 1999.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotection Of escins Ia, Ib, Iia, And Iib on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Eur. J. Pharmacology**, 373: 63-70, 1999.
- MINCIS, M.; *et al.* Etanol e o trato gastrointestinal. **Arquivos de gastroenterologia**. 32: 131-139, 1995.
- MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. **Jap. J. Pharmacol.** 44: 43-50, 1987.
- MONTEIRO, J.M.; *et al.* Taninos: uma abordagem química à ecologia. **Quim. Nova**, 28(5): 892-896, 2005.
- MORIMOTO, Y.; *et al.* Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. **Jap. J. Pharmacol.**, 57: 495-505, 1991.
- NAGAPPA, A.N.; THAKURDESAI, P.A.; VENKAT, N.R.; SINGH, J. Antidiabetic effect of *Terminalia catappa* Linn fruits. **J. Ethnopharm.** 88:45-40, 2002.
- NATALE, G.; *et al.* Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicol. Appl.Pharmacol.**, 195: 62– 72, 2004.
- NOGUEIRA, L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Rev. Virtual Quim.** 1 (3): 227-240, 2009.
- PRISTA, L.N. **Tecnologia farmacêutica**. V I e II, 5° ed. Fundação Calouste Gulbenkian<[http://www.hocuspocus.estantevirtual.com.br/mod\\_perl/busca.cgi?alvo=editora&pchave=Fundação%20Calouste%20Gulbenkian](http://www.hocuspocus.estantevirtual.com.br/mod_perl/busca.cgi?alvo=editora&pchave=Fundação%20Calouste%20Gulbenkian)>, 1995.
- RAO, CHI.V.; VERMA, A.R.; VIJAYAKUMAR, M.; RASTOGI, S. Gastroprotective effect of standardized extract of *Ficus glomerata* fruit on experimental gastric ulcer in rats. **J. of Ethnopharmacol.** 115: 323-326, 2008.

- RATNASOORIYA, W.D.; DHARMASIRI, M.G. Effects of *Terminalia catappa* seeds on sexual behaviour and fertility of male rats. **Asian J. of Andrology** 2: 213-219, 2000.
- REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Bra. J. Med. Biol. Res.** 35: 523-534, 2002.
- SCHEIMAN, J.M.; *et al.* Prevention of ulcers by esomeprazol in at-risk patients using non-selective NSAIDs and COX-2-inhibitors. **Am. J. Gastroenterol.** 101: 701-710, 2006.
- SCHOROETER, G.; *et al.* Estudo de utilização de anti-ulcerosos na população idosa de Porto Alegre, RS, Brasil. **Rev. HCPA** 28(2):89-95, 2008.
- SHAHIN, M.; *et al.* Remodeling of extracellular matrix in gastric ulceration. **Micros. Res. Technique**, 53: 396-408, 2001.
- SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterol.**, 5: 43-61, 1945.
- SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Bra. J. Pharmaco.** 18(4): 618-626, 2008.
- SINGH, L.P.; *et al.* Novel role of famotidine in downregulation of matrix metalloproteinase-9 during protection of ethanol-induced acute gastric ulcer. **Free Rad. Biol. Med.**, 43:289-299, 2007.
- SOSTRES, C.; *et al.* Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Prac. Res. Clin. Gastro.** 24:121–132, 2010.
- SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Bra. J. Pharmaco.** 20(3): 435-440, 2010.
- SRIKANTA, B. M.; SATHISHA, U.V.; DHARMESH, S. M. Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E2 levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. **Biochimie.**, 92: 194-203, 2010.
- SULEYMAN, H.; *et al.* Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. **Inflamm.**, 33(4): 224-234, 2010.
- SWINGLE, K.F.; REITER, M.J.; SCHAWARTZMILLER, D.H. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 254: 168–176, 1981.

- TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Jap. J. Pharmacol.**, 19: 418–426, 1969.
- TAN, G.T.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D.; HUGHUES, S.H. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus in type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. **J. Nat. Products** 54: 143-154, 1991.
- TANG, X.; *et al* Effective protection of *Terminalia catappa* L. leaves from damage induced by] carbon tetrachloride in liver mitochondria. **J. Nutritional Biochemistry** 17(3): 177-182, 2005.
- THOMSON, L.A.J.; EVANS, B. *Terminalia catappa* (tropical almond), ver. 2.2. In: ELEVITCH, C.R. (Ed.). Species profiles for pacific Island agroforestry: permanent agriculture resources (PAR). Disponível em: <http://www.traditionaltree.org>, 2006.
- TOMA, W.; *et al*. Preliminary studies of *Mammea americana* L. (Guttiferae) bark/latex extract point to an effective antiulcer effect on gastric ulcer models in mice. **Phytomed.** 12(5):345-350, 2005.
- TUNDIS, R.; *et al*. Natural Products as Gastroprotective and Antiulcer Agents: Recent Developments. **Natural products communication** 13(12): 2129-2144, 2008.
- TURINI, M.E.; DuBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. **Annu. Rev. Med.** 53:35–57, 2002.
- 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.
- UEDA, S.; *et al*. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia–reperfusion in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, 162: 55–58, 1989.
- VILLAS BOAS, G.K.; GADELHA, C.A.B. Oportunidades na indústria de medicamentos e alógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cad. Saúde Pública.** 23(6): 2007.
- WALLACE, J. L.; DEVCHAND, P.R. Emerging role for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **Brit. J. Pharmacol.**, 145: 275-282, 2005.
- WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Amer. J. Med.**, 110 (1A): 19S-23S, 2001.

- WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiol. Rev.** 88: 1547–1565, 2008.
- YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nat. Prac. Gastr. Hep.** 3(2): 80, 2006.