



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

ANA ROSELI SILVA RIBEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DO EXTRATO
ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA *Caesalpinia
pyramidalis* Tul. EM RATOS**

SÃO CRISTÓVÃO

2013

ANA ROSELI SILVA RIBEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO
DA ENTRECASCA DA *Caesalpinia pyramidalis* Tul. EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi

SÃO CRISTÓVÃO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Saúde/UFS

	Ribeiro, Ana Roseli Silva
R484p	<p>Potencial gastropotetor do extrato etanólico da entrecasca da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. em ratos / Ana Roseli Silva Ribeiro; orientador Sara Maria Thomazzi – São Cristóvão, 2013. 62 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Caesalpinia pyramidalis</i>. 2. Fabaceae . 3. Antiúlceras. 4. Gastroproteção. 5. <i>Helicobacter pylori</i>. I. Thomazzi, Sara Maria, orient. II. Título. <p>CDU: 582.736.2</p>

ANA ROSELI SILVA RIBEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO
DA ENTRECASCA DA *Caesalpinia pyramidalis* Tul. EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Sara Maria Thomazzi

1º Examinador: Prof. Dr. Enilton Camargo

2º Examinador: Prof. Dra. Margarete Zanardo

DEDICATÓRIA

A minha mãe Rosilda, por nunca ter medido esforços em
minha educação.

Ao meu filho Davi, que fez e faz os meus dias serem melhores.

A minha amiga, companheira de experimentos, Poliana por
sempre estar disponível para me ajudar. Esse trabalho é
NOSSO!

AGRADECIMENTOS

Deus, por ter tornado esse sonho possível quando eu achava que tudo estava perdido...

Prof. Sara Maria Thomazzi, por ter me aceitado como aluna e confiado na realização deste trabalho que fugiu um pouco de sua linha de pesquisa e também pelos conselhos e momentos de descontração.

Prof. Ricardo Albuquerque, pela magistral colaboração no trabalho. Foi muito bom ter “voltado para casa” e estar com vocês novamente.

A todos do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural (LMBE) pelas amizades que fiz e em especial a Nely, por sempre que necessário ter gentilmente me ajudado e lembrado dos procedimentos histológicos.

Malone por também colaborar no trabalho e por ter me dado o prazer de ter conhecido e trabalhado na iniciação científica com gastroproteção.

Meus primeiros orientadores, Adriana Karla, Juliana Cordeiro, Francine Padilha, Francisco Prado Reis e Ricardo Albuquerque por permitirem minha entrada no universo da pesquisa científica que tanto amo.

Meus amigos catarinenses, Marivane e Zeca e Prof. Sérgio Faloni pelo ensinamento da metodologia de ligadura de piloro e ainda hoje por sanar algumas dúvidas.

A minha amada mãe Rosilda sempre abdicando de si para dá o melhor aos filhos. OBRIGADA por sempre me consolar, me ajudar e mostrar o caminho certo.

Meu filho Davi, minha benção que me acompanhou e sentiu minha falta enquanto estudava para seleção e para as disciplinas e realizava longos experimentos (oh ligadura de piloro!). Mamãe te ama muito!

Ao meu marido Thiago por aceitar minha ausência em casa e o meu jeito, e pelo seu amor.

A todos meus familiares por acreditarem no meu potencial e de alguma forma terem me ajudado nesta jornada.

A minha amiga Poliana pela sua ajuda nos experimentos, por tentar me ensinar a explicar os procedimentos e não somente fazer e você acompanhar, por ter me ensinado a descentralizar obrigações e sobre tudo entender esse meu jeito. Gosto muito de ti! Foi uma grande benção nos encontrarmos naquele corredor...

Aos amigos do LAFID pelos ensinamentos da rotina do laboratório e pelas gargalhadas.

Aos amigos da 1º turma do mestrado do PROCFIS e seus agregados, em especial Laiane, Elis, Diogo, Rangel, Dani e Poli, passamos por alguns problemas e juntos conseguimos soluções.

Aos coordenadores do PROCFIS, Enilton Carmargo e Daniel Badauê pelo esforço em fazer deste programa de pós-graduação excelente e conhecido nacionalmente e também pelas inúmeras dúvidas tiradas. Tenho muito orgulho em fazer parte deste programa!

Ao animais de experimentação que “doaram” suas vidas em prol da tentativa de se obter novos medicamentos, e aos seus cuidadores Galego, Aloisio e Oswaldo por se preocuparem com o bem estar dos animais.

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

E a todos que não foram citados, mas que possuem grande importância para mim.

“Para achar água, é preciso descer terra adentro, encharcar-se no lodo. Mas há os que preferem olhar os céus e esperar pelas chuvas.”
Oduvaldo Viana Filho.

RESUMO

Efeito gastroprotetor do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. em ratos, RIBEIRO, A.R.S., São Cristovão, 2013.

Caesalpinia pyramidalis Tul. (Fabaceae), conhecida popularmente como “catingueira”, tem sido usada pela medicina popular para tratamento de diversas desordens fisiológicas como gastrite, indigestão e dores estomacais. Entretanto, a ação gastroprotetora dessa espécie ainda não foi estudada. O extrato etanólico da entrecasca (EEE) da *Caesalpinia pyramidalis* foi administrado em ratos pela via oral, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. Para avaliação da atividade gastroprotetora foram utilizados os modelos de úlceras agudas induzidas por etanol e anti-inflamatório não esteroideal (AINE). Parâmetros da secreção gástrica (volume, pH e acidez total) e produção de muco gástrico também foram avaliados pela técnica de ligadura de piloro. A atividade antimicrobiana do EEE da *Caesalpinia pyramidalis* foi mensurada através da técnica de difusão em ágar e calculados os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) pela técnica de microdiluição em placa. O EEE da *Caesalpinia pyramidalis* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg inibiu de maneira dose dependente ($p < 0,01$) o índice de lesões ulcerativas no modelo de úlceras induzidas por etanol. No modelo de úlceras induzidas por AINE, o extrato em todas as doses utilizadas, também reduziu o índice de lesões ulcerativas ($p < 0,001$). No modelo de ligadura de piloro, o tratamento com o EEE da *Caesalpinia pyramidalis* não foi capaz de modificar os parâmetros da secreção gástrica. Entretanto, após tratamento com o EEE da *Caesalpinia pyramidalis* (30, 100 e 300 mg/kg) observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção do muco gástrico. O EEE da *Caesalpinia pyramidalis* possui atividade antimicrobiana contra o *Helicobacter pylori* com CIM de 625 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 10.000 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados deste estudo sugerem que o EEE da *Caesalpinia pyramidalis* possui ação gastroprotetora, desta forma validando a utilização popular desta planta no tratamento de distúrbios gastrointestinais.

Palavras-chave: antiúlcera; *Caesalpinia pyramidalis*; Fabaceae; gastroproteção; *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT

Gastroprotective effects of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats, RIBEIRO, A.R.S, São Cristovão, 2013.

Caesalpinia pyramidalis Tul. (Fabaceae), known as “catingueira”, have been used in folk medicine for the treatment of various disorders such as gastritis, heartburn, indigestion, and stomach ache. However, the gastroprotective properties of this species have not yet been studied. The ethanol extract of *C. pyramidalis* inner bark was used in rats via oral, at the doses of 30, 100, and 300 mg/kg. The antiulcer assays were performed using the ethanol- and nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced ulcer protocols. Gastric secretion parameters (volume, pH, and total acidity) were also evaluated by the pylorus ligated model, and the mucus in the gastric content was determined. The anti-*Helicobacter pylori* activity of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* was performed using the agar-well diffusion and broth microdilution methods to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) values. The ethanol extract (30, 100, and 300 mg/kg) produced dose dependent inhibition ($p < 0.01$) on the ulcer lesion index in the ethanol-induced ulcer model. The ethanol extract (30, 100, and 300 mg/kg) also reduced ($p < 0.001$) the ulcer index in the indomethacin-induced ulcer model. In the model ligature pylorus, the treatment with *C. pyramidalis* ethanol extract failed to significantly change the gastric secretion parameters. However, after treatment with the ethanol extract of *C. pyramidalis* (30, 100, and 300 mg/kg), there was a significant increase ($p < 0.05$) in mucus production. The ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* had an anti-*Helicobacter pylori* activity with a MIC of 625 $\mu\text{g/mL}$ and a MBC of 10.000 $\mu\text{g/mL}$. Collectively, the present results suggest that the ethanol extract of *C. pyramidalis* display gastroprotective actions, supporting the folkloric usage of the plant to treat various gastrointestinal disturbances.

Keywords: antiulcer; *Caesalpinia pyramidalis*; Fabaceae; gastroprotective; *Helicobacter pylori*.

Lista de figuras

Figura 1: A: Espécie arbórea <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. encontrada na região da caatinga; B: Caule da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.; C: folhas e flores da catingueira.....	12
Figura 2: Cromatogramas (254 nm) do EEE da <i>C. pyramidalis</i> (A) e dos padrões rutina (B), quercetina (C), apigenina (D) e baicaleina (E).....	21
Figura 3: Cromatogramas (254 nm) do EEE da <i>C. pyramidalis</i> (A) fortificado com os padrões rutina (B), quercetina (C), apigenina (D) e baicaleina (E).....	22
Figura 4: Secções histológicas coradas em HE.	24

Lista de tabelas

Tabela 1: Efeito do EEE da <i>C. pyramidalis</i> em úlceras induzidas por etanol.....	22
Tabela 2: Efeito do EEE da <i>C. pyramidalis</i> sobre a destruição microscópica da mucosa gástrica induzida por etanol absoluto.....	23
Tabela 3: Efeito do EEE da <i>C. pyramidalis</i> em úlceras induzidas por AINE.....	25
Tabela 4: Efeito do EEE da <i>C. pyramidalis</i> sobre a secreção do suco gástrico.....	25
Tabela 5: Efeito do extrato etanólico da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> na secreção de muco gástrico.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C	-----	Antes de Cristo
AINES	-----	Anti-inflamatório não esteroidal
ANOVA	-----	Análise de variância
CBM	-----	Concentração bactericida mínima
CCK -2	-----	Receptor 2 de colecistocinina
CEPA	-----	Comitê de ética em pesquisa animal
CIM	-----	Concentração inibitória mínima
Cm	-----	Camada muscular
DAG	-----	Diacilglicerol
Des.	-----	Desorganização
DPPH	-----	2,2-difenil-1-picrilidrazil
E.P.M	-----	Erro padrão da média
ECL	-----	Células enterocromafins
Ed1	-----	Edema tipo 1
Ed3	-----	Edema tipo 2
EEE	-----	Extrato etanólico da entrecasca
Egn	-----	Epitélio gástrico normal
EROS	-----	Espécies reativas de oxigênio
IC50	-----	Concentração inibitória mínima
IFN-6	-----	Interferon 6
IL-1	-----	Interleucina 1
IL-2	-----	interleucina 2
IL-6	-----	interleucina 6
IL-8	-----	interleucina 8
IL-9	-----	interleucina 9

ILU	índice de lesão ulcerativa
IP3	Fosfato de inositol
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	óxido nítrico
PG	prostaglandina
PGE	prostaglandina E
PGI	prostaciclina
PKA	proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
SBCAL	Sociedade Brasileira de Cuidados com Animais de Laboratório
SUS	Sistema único de saúde
Tcs	tecido conjuntivo submucoso
Teg	tecido epitelial gástrico
TSB	Trypic soy broth
UFC	unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Etiologia da úlcera gástrica.....	03
2.2 Regulação da secreção gástrica.....	04
2.2 Fatores protetores da mucosa gástrica.....	06
2.4 Modelos de ensaios biológicos para estudo da gastroproteção.....	08
2.5 <i>Helicobacter pylori</i>	09
2.6 Farmacoterapia para as úlceras gástricas.....	10
2.7 <i>Caesalpinia pyramidalis</i>	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Planta (Coleta e identificação)	14
4.2 Preparação do extrato etanólico.....	14
4.3 Animais	15
4.4 Micro-organismo	15
4.5 Avaliação da atividade gastroprotetora do EEE da <i>C. pyramidalis</i>	15
4.5.1 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol.....	15
4.5.2 Análise histopatológica do estômago dos animais submetidos à administração oral de etanol absoluto	17
4.5.3 Modelo de úlcera aguda induzida por AINE.....	17
4.5.4 Modelo para avaliação da secreção de ácido gástrico.....	18
4.5.5 Modelo para avaliação da secreção de muco na mucosa gástrica.....	18
4.6 Triagem antimicrobiana – técnica de difusão em ágar (poços).....	19
4.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)	19
4.8 Análise estatística	19
5 RESULTADOS	21
5.1 Caracterização do EEE da <i>C. pyramidalis</i>	21
5.2 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol.....	22
5.3 Análise histopatológica do estômago dos animais submetidos à administração oral de etanol absoluto	23
5.4 Modelo de úlcera aguda induzida por AINE.....	24
5.5 Avaliação da secreção de ácido gástrico.....	25
5.6 Avaliação da secreção do muco gástrico.....	25

5.7 Triagem antimicrobiana – técnica de difusão em ágar (poços).....	26
5.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).....	26
6 DISCUSSÃO.....	27
7 CONCLUSÃO.....	32
8 REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A ausência de equilíbrio entre os fatores agressores (ingesta de álcool e comidas apimentadas, fumo, estresse, utilização de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), infecção por *Helicobacter pylori*, distúrbios na secreção de ácido e pepsina) e os fatores defensores da mucosa gástrica (manutenção do fluxo sanguíneo, barreira de muco e enzimas antioxidantes) ocasiona o aparecimento de lesões agudas ou crônicas no tecido estomacal denominadas de “úlceras gástricas” (WALLACE, 2001; WOLFE et al., 1988).

Grande parte da população mundial, aproximadamente 10%, possuem úlceras gástricas, ocasionando perdas econômicas devido à falta ao emprego, consultas frequentes aos centros de saúde e compra de medicamentos para tratamento deste distúrbio fisiológico (SONE et al., 2008). A farmacoterapia para as úlceras gástricas consiste na utilização de drogas que inibem a secreção de ácido gástrico, erradiquem o agente etiológico *Helicobacter pylori* e/ou aumentam a proteção da mucosa, porém a utilização prolongada destes traz consigo alteração do pH gastrintestinal favorecendo a colonização de bactérias patogênicas, casos de ginecomastia e risco de câncer gástrico (BIGHETTI et al., 2005; SCHUBERT, 2011).

Espécies do gênero *Caesalpinia* demonstram ação sobre o trato gastrintestinal de ratos. Os extratos aquoso e etanólico da *Caesalpinia pulcherrima* possuem potente efeito gastroprotetor em úlceras induzidas por AINEs e efeito antissecretório de ácido gástrico (SHARMA et al., 2011). A *Caesalpinia ferrea* também possui ação inibitória sobre a secreção de ácido gástrico (BACCHI et al., 1994) e ação cicatrizante em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (BACCHI et al., 1995). Podemos citar ainda a *Caesalpinia echinata* e a *Caesalpinia microphylla*, as quais são utilizadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais (AGRA et al., 2007).

A *Caesalpinia pyramidalis* conhecida como “catingueira” é utilizada popularmente sob a forma de decocto ou “garrafadas” no tratamento de desordens gástricas, afecções respiratórias, quadros febris e como diurético. Esta planta medicinal encontrada no Nordeste brasileiro possui várias atividades farmacológicas comprovadas: anti-helmíntica (SANTOS et al., 2012), anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante (SANTANA et al., 2012; SANTOS et al., 2011; SILVA et al., 2011). Suas ações podem ser devido à presença dos constituintes químicos flavonóides, taninos e saponinas (BAHIA et al., 2005; MENDES et al.,

2000; SANTOS et al., 2011). Os flavonóides rutina, apigenina, baicaleína, lupeol e canferol estão presentes nas folhas e na entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* (BAHIA et al., 2005; MENDES et al., 2000; SANTANA et al., 2012), já tendo sido demonstrado cientificamente que estes previnem a formação das úlceras gástricas (BORRELLI et al., 2000; DI CARLO et al., 1994; LA CASA et al., 2000; SUMBUL et al., 2011).

Embasado na composição fitoquímica da espécie *Caesalpinia pyramidalis*, dados farmacológicos e incentivo de políticas nacionais para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas medicinais, além de evidências etnofarmacológicas, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito gastroprotetor da *Caesalpinia pyramidalis* em úlceras gástricas, induzidas por diferentes agente ulcerogênicos, em ratos.

2 Revisão da literatura

2.1 Etiologia da úlcera gástrica

A úlcera gástrica é uma doença que acomete grande parte da população mundial e sua chance de cura é elevada quando tratada (95%), porém casos de reincidência são recorrentes (65-80%) promovendo elevados gastos na saúde pública (SONE et al., 2008). A taxa de indivíduos que são acometidos por este distúrbio gástrico em países ocidentais é igual a dos países orientais; entretanto, os hábitos alimentares e o uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) podem agravar esta situação (LEONG, 2009).

A exposição da mucosa gástrica à ação agressiva do suco ácido-péptico promove a úlcera gástrica que é caracterizada pelo aparecimento de lesões ulcerosas agudas ou crônicas em qualquer porção do trato gastrointestinal. Inicialmente, se acreditava que as úlceras gástricas resultavam somente da ação do ácido clorídrico e da pepsina, naturalmente presentes no estômago. Com a evolução dos estudos foi observado que, além dos fatores agressores endógenos (ácido e pepsina), essa doença estava associada a outros fatores exógenos predisponentes relacionados às condições de vida tais como, estresse, fumo, álcool, uso contínuo de AINEs (60% dos casos), ingestão de determinados alimentos e presença do agente infeccioso *Helicobacter pylori*, os quais atuam conjuntamente reduzindo a defesa da mucosa gástrica (SANTIN et al., 2011; WALLACE, 2001; WOLFE et al., 1988).

Vários mecanismos estão implicados na patogênese das lesões gástricas, agindo sinergicamente ou não na produção das lesões. Assim, o aumento da secreção de ácido gástrico e pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão de prostaglandinas (PG) endógenas, inibição do crescimento e proliferação celular da mucosa, alteração da motilidade gástrica, presença de agentes infecciosos e presença de radicais livres são alguns dos mecanismos envolvidos na ulcerogênese e se constituem alvo de ação terapêutica (ANDREOLI, 2000; LEWIS, 1991; WALLACE, 2001; WOLFE et al., 1988).

2.2 Regulação da secreção gástrica

“Sem ácido, não há úlcera”, frase proferida pelo Sr. Karl Schwarz em 1910 demonstrando a relação da principal função do estômago (produção e secreção de ácido clorídrico) com o surgimento da ulceração gástrica. Situações como o estresse aumentam desproporcionalmente o volume e a acidez gástrica, superando as defesas da mucosa gástrica, levando a formação de úlcera duodenal, úlcera gástrica e doença do refluxo gastro - esofágico (SCHUBERT, 2011).

O ácido gástrico possui a função de facilitar a digestão de proteínas, facilitar a absorção de ferro, cálcio e vitamina B12 e impedir a colonização de bactérias no tecido estomacal, com exceção do *Helicobacter pylori* que consegue alcalinizar o pH gástrico (SCHUBERT, 2011; USTUN et al., 2006).

No tecido estomacal existem quatro tipos celulares importantes para regulação da secreção gástrica: (1) as células parietais que produzem ácido clorídrico; (2) as células enterocromafins (ECL), célula semelhante aos mastócitos que liberam histamina; (3) as células G que produzem a gastrina e (4) as células D que produzem a somatostatina (SCHUBERT, 2011).

A célula parietal é regulada por mecanismos neurais, hormonais e parácrinos, assim como por estímulos mecânicos e químicos para secreção de ácido gástrico. Histamina, gastrina e acetilcolina são as principais substâncias estimulantes da secreção ácida. A histamina liberada pelas células ECL estimula a célula parietal diretamente através da ligação aos receptores H_2 presentes na membrana basolateral destas células (via parácrina). As células G, presentes na região antral do estômago, durante o processo de digestão secretam o hormônio gastrina, o qual estimula as células parietais a secretarem ácido gástrico de maneira indireta, via receptor de colecistocinina2 (CCK-2) presente nas células ECL para síntese e liberação de histamina (via endócrina). A acetilcolina liberada dos neurônios pós-ganglionares estimula a secreção gástrica diretamente via receptor M_3 na célula parietal (SHUBERT, 2011) e indiretamente via receptor M_1 nas células ECL estimulando a secreção de histamina (YAMAJI et al., 2007) (via neuronal). Os receptores M_2 e M_4 também estimulam a secreção gástrica através da inibição da secreção de somatostatina (hormônio inibidor da secreção gástrica) (via neuronal) (SHUBERT, 2011; THANGARAJAH et al., 2002).

A somatostatina secretada das células D inibe a secreção de ácido gástrico diretamente nas células parietais e indiretamente pela inibição da liberação de histamina das células ECL e pela inibição da secreção de gastrina das células G (SHUBERT, 2011).

A ativação dos receptores M_3 (acetilcolina) e CCK-2 (gastrina) presentes na célula parietal estimula a secreção, por mecanismo intracelular que aumenta o cálcio citosólico livre na célula parietal. Esses receptores estão acoplados a fosfolipases que catalisam a quebra de fosfolípidos de membrana em trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a liberação de cálcio dos estoques intracelulares que, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC), levando à fosforilação de proteínas responsáveis pela ativação da bomba de prótons, $H^+K^+ATPase$. A histamina (receptor H_2 acoplado a proteína G) exerce sua ação estimulando a conversão do trifosfato de adenosina intracelular em adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que ativa a proteína quinase A (PKA), que também fosforila proteínas envolvidas na ativação da bomba de próton (UEDA et al., 1989).

Outras substâncias, como o glutamato e prostaglandinas E_2 interferem na regulação da secreção gástrica. O glutamato estimula a secreção de ácido gástrico através da inibição da secreção de somatostatina (FELDMAN, 2013). As PGE_2 possuem tanto ação inibitória quanto estimulante da secreção de ácido gástrico. Este prostanóide em altas concentrações na mucosa gástrica se liga ao receptor EP_4 presente nas células ECL estimulando à liberação de histamina e em baixas concentrações se liga ao receptor EP_3 nas células parietais exercendo efeito inibitório da secreção gástrica (TAKEUCHI et al., 2010).

A $H^+K^+ATPase$ é uma bomba de prótons estocada nas vesículas tubulares citoplasmáticas nas células parietais. Quando ocorre um estímulo, as vesículas tubulares se fundem com a membrana apical e a $H^+K^+ATPase$ se torna ativa para secretar o ácido. Quando o estímulo é cessado, as bombas são recicladas e voltam para o compartimento citoplasmático (THANGARAJAH et al., 2002).

2.3 Fatores protetores da mucosa gástrica

O estômago, órgão responsável pela digestão dos alimentos, possui mecanismos de proteção que impedem que a mucosa estomacal seja “digerida” pelo suco gástrico (TULASSAY et al., 2010). Estes mecanismos de proteção incluem secreção de muco gástrico e bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo, renovação das células epiteliais, geração de PGE₂, prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico (NO), e mecanismos antioxidantes (TULASSAY et al., 2010).

Barreira de muco e bicarbonato – O muco gástrico secretado pelas células superficiais da mucosa gástrica, é um gel transparente viscoso composto por 95% de água e 5% de glicoproteínas. A camada de muco e bicarbonato possui espessura entre 200 – 300 µm conferindo uma eficiente proteção pré-epitelial da mucosa gástrica. As glicoproteínas presentes no muco são responsáveis pelo sequestro das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), fornecendo ao muco efeito antioxidante e protetor da mucosa da ação deletéria de agentes citotóxicos, como o etanol e AINEs (MOJZIS et al., 2000; REPETTO et al., 2002;).

Fluxo sanguíneo – A manutenção do fluxo sanguíneo é um importante fator de proteção da mucosa gástrica. A diminuição do fluxo sanguíneo leva a necrose das células epiteliais, as quais são responsáveis pela secreção das PG para a mucosa gástrica e, conseqüentemente, a hipersecreção ácida. O fluxo sanguíneo contínuo fornece oxigênio, bicarbonato e nutrientes, além de remover o dióxido de carbono, íons hidrogênio e difundir toxinas do lúmen gástrico (GUTH et al., 1984).

Prostaglandina e prostaciclina – As PGE₂ e PGI₂ protegem a mucosa gástrica através da inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco e bicarbonato, manutenção do fluxo sanguíneo gástrico e controle da motilidade gástrica (ATAY et al., 2000; TULASSAY et al., 2010) e ativação dos canais de potássio (PESKAR et al., 2002). Acredita-se que o efeito gastroprotetor destes prostanóides dá-se devido à ativação dos canais de potássio (MEDEIROS et al., 2008; PESKAR et al., 2002; SILVA et al., 2009), os quais estão envolvidos em diversas funções no estômago, como regulação do fluxo sanguíneo, da secreção de ácido e da contratilidade gástrica (GARCIA et al., 1997). Os AINEs ao inibirem a

síntese destes prostanóides pela inibição do ácido araquidônico pela via ciclo-oxigenase, aumentam a motilidade gástrica levando ao desenvolvimento de lesões gástricas. A hipermotilidade gástrica provoca distúrbios na microvascularização promovendo a migração de neutrófilos (TAKEUCHI, 2012).

As prostaglandinas podem se ligar a diferentes receptores e exercer diversas ações sob a mucosa gástrica. A ligação das prostaglandinas ao receptor: EP1 diminui a motilidade gástrica e aumenta o fluxo sanguíneo gástrico e a secreção de bicarbonato; EP3 inibe a secreção de ácido gástrico em baixas concentrações de PGE₂; EP4 estimula a secreção de ácido indiretamente em altas concentrações de PGE₂ e estimula a secreção do muco gástrico (TAKEUCHI et al., 2010).

Óxido nítrico – O óxido nítrico (NO) é um importante mediador de proteção da mucosa gástrica através do aumento do fluxo sanguíneo, produção de muco e bicarbonato e de sua habilidade em inibir a aderência dos neutrófilos às células endoteliais (SHAH et al., 2004; TULASSAY et al., 2010). Este mediador gasoso está envolvido no mecanismo de secreção de bicarbonato em conjunto com as PGE₂. Quando há aumento da secreção ácida, o NO estimula a síntese de PGE₂, a qual é responsável pela inibição da secreção de ácido e aumento da secreção de bicarbonato (TAKEUCHI et al., 2011). Contudo, quantidades elevadas de NO promovem a perda da barreira de muco (SHAH et al., 2004).

Grupamentos sulfidrílicos – Os grupamentos sulfidrílicos agem como antioxidantes endógenos e produtores de muco. Estes se ligam aos radicais livres formados durante o processo inflamatório da úlcera gástrica, protegendo a mucosa gástrica dos efeitos deletérios dos radicais livres (AVILA et al., 1996).

2.4 Modelos de ensaios biológicos para estudo da gastroproteção

Para avaliação da atividade gastroprotetora de novas substâncias, vários modelos biológicos tem sido propostos. Estes modelos baseiam-se nos fatores etiológicos da úlcera gástrica, como ingestão de etanol, inibição da síntese de prostanóides, estresse, diminuição do fluxo sanguíneo e presença do bastonete *Helicobacter pylori*.

Modelo de úlcera por etanol - Os efeitos deletérios do etanol sobre a mucosa gástrica dá-se pelo contato tóxico direto deste com a mucosa gástrica. A patogênese do etanol sobre a mucosa gástrica ainda não é totalmente elucidada, mas sabe-se que os distúrbios à mucosa causados por este agente ulcerogênico é devido a uma reação inflamatória. O etanol promove a liberação de mediadores inflamatórios, os quais por sua vez induzem a ativação de granulócitos com a formação de proteases e radicais livres, e diminuição do fluxo sanguíneo que provoca isquemia, morte de células e dano à mucosa gástrica (OATES et al., 1988; SZABO et al., 1987).

Modelo de úlcera por AINE - Os AINEs apresentam como efeito adverso o desenvolvimento de úlceras gástricas pela diminuição da síntese de prostanóides, devido à inibição da enzima ciclo-oxigenase. Os AINEs também causam danos à mucosa pelo aumento da produção de citocinas inflamatórias (KOIZUMI et al., 2009), diminuição da expressão da eNOS (SLOMIANY et al., 2005) e por aumentar as Espécies Reativas de Oxigênio e a peroxidação lipídica (NAITO et al., 2006). As PGE₂ e PGI₂ são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato e pela inibição da secreção gástrica. Sua diminuição acarreta em perda da citoproteção e redução do fluxo sanguíneo local (ROBERT et al., 1979; TULASSAY et al., 2010).

Ligadura de piloro - A ligadura do piloro provoca alterações na liberação de alguns mediadores da secreção gástrica como acetilcolina, gastrina e histamina. A distensão da mucosa causada pela obstrução do piloro aumenta a liberação de acetilcolina pelo vago, que atuará diretamente sobre as células parietais e células G, liberando histamina e gastrina, respectivamente, induzindo por sua vez a formação de lesões ulcerativas pelo estímulo da

secreção do ácido clorídrico que se acumula no lúmen do estômago (LEWIS, 1991; SHAY et al., 1945).

2.5 Helicobacter pylori

O *Helicobacter pylori* é o principal fator causal da gastrite crônica, estando presente em 95% dos casos de úlceras duodenais e em 80% das úlceras gástricas. Sua forma de transmissão não é totalmente elucidada, mas acredita-se que se dá de maneira oral-fecal. Esta bactéria também está associada ao risco de desenvolvimento de linfomas do tipo MALT e câncer gástrico, sendo, portanto, a primeira bactéria classificada e definida como carcinogênica pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer e pela Organização Mundial de Saúde (AMIEVA et al., 2008).

Esta bactéria apresenta-se na forma de bastonete gram negativo, flagelado em forma de espiral, que exige atmosfera microaerófila para seu crescimento, e costuma colonizar o estômago e duodeno humano. Apesar do estômago ser um ambiente inóspito para a colonização bacteriana devido ao seu pH ácido, o *Helicobacter pylori* consegue se desenvolver através de uma intensa atividade da urease que eleva o pH desse local, tornando-se um microambiente adequado para o seu desenvolvimento (USTUN et al., 2006).

Uma vez que atinge a mucosa gástrica, o *Helicobacter pylori* causa lesão tecidual por um complexo mecanismo de eventos, os quais dependem do hospedeiro e da bactéria. Apesar da semelhança com outras bactérias gram negativas, os lipopolissacarídeos presentes na parede celular do gênero *Helicobacter* possuem características próprias, como baixa atividade imunológica, o que provavelmente contribui para a manutenção da infecção (MORAN, 1996).

Estas propriedades imunogênicas do *Helicobacter pylori* induzem uma reação inflamatória de caráter neutrofílico, a qual normalmente resulta em manifestações clínicas da infecção. Este processo é mediado por fatores do hospedeiro, como as interleucinas (IL)-1, -2, -6, -8 e -19, interferon (IFN)- δ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , linfócitos T e B, e células fagocitárias (SOUZA et al., 2009).

2.6 Farmacoterapia para as úlceras gástricas

O tratamento das desordens gástricas por anos baseou-se na supressão da secreção gástrica. No início do século XX o único tratamento para as úlceras gástricas consistia na remoção do nervo vago (vagotomia), com altas taxas de morbimortalidade, e a utilização dos antiácidos que neutralizam a acidez gástrica. Na década de 70 surgiram os antagonistas dos receptores H_2 que inibem a produção de ácido gástrico pela competição reversível com a histamina pelos receptores H_2 presentes nas células parietais. A cimetidina é o representante mais utilizado desta classe de fármacos e sua afinidade por receptores andrógenos ocasiona impotência sexual e ginecomastia como efeito colateral, além de náuseas e sonolência em idosos (SCHUBERT, 2011; TULASSAY et al., 2010).

Com a descoberta da bomba de prótons em 1967 (FORTE et al., 1967), a classe dos inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e esomeprazol) foi desenvolvida para melhoria do tratamento das úlceras gástricas, sendo considerados os mais eficazes na supressão da secreção ácida. Estes fármacos se acumulam nos canalículos secretórios da bomba de prótons onde são ativados por um processo de prótons catalisados resultando na formação de uma sulfonamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por ligação covalente com o grupo sulfidril da cisteína 813 de domínio extracelular da bomba de prótons ocorrendo à inibição da secreção do ácido clorídrico (SCHUBERT, 2011).

A farmacoterapia para as úlceras gástricas não se dá somente pela inibição da secreção do ácido gástrico, mas também pelo aumento dos fatores protetores da mucosa gástrica. O sulcrafato forma géis complexos com o muco inibindo a ação da pepsina e assim como o quelato de bismuto e a carbenoxolona aumentam a produção do muco gástrico. O misoprostol, análogo sintético da PGE_1 aumenta o fluxo sanguíneo, estimula a secreção de muco e bicarbonato e regula a motilidade gástrica. Contudo, todas as drogas utilizadas atualmente possuem alto custo e geram vários efeitos colaterais indesejados, sendo necessário o desenvolvimento de novas substâncias com propriedades antiulcerogênicas isentas ou com poucos efeitos colaterais. Nesse contexto, as plantas medicinais constituem-se como alternativas importantes para o tratamento das úlceras gástricas.

2.7 *Caesalpinia pyramidalis*

O gênero *Caesalpinia* (Fabaceae) é pantropical, com 150 espécies distribuídas na América do Sul, crescendo em matas, bosques e em semidesertos. As espécies da caesalpinoidae são bastante utilizadas popularmente para tratamento de vários distúrbios fisiológicos e algumas já possuem ações farmacológica comprovada. A *Caesalpinia bonducella* possui atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante (ARCHANA et al., 2005), a *Caesalpinia digyna* possui ação antioxidante in vivo e in vitro (SRINIVASAN et al., 2007), a *Caesalpinia ferrea* e a *Caesalpinia pulcherrima* possuem ação gastroprotetora (SHARMA et al., 2010; BACHI et al., 1994).

A espécie *Caesalpinia pyramidalis* Tul. é uma árvore que chega a atingir aproximadamente 10 metros de altura e é bastante encontrada no Nordeste brasileiro, sendo conhecida popularmente como “catingueira”, “catingueira-verdadeira”, “catingueira-das-folhas-largas”, “catinga de porco”, “pau-de-rato” e “massitaiba” (BRAGA, 1953; DANTAS et al., 2008). As folhas, flores e tronco desta planta são utilizados pela população para tratamento de afecções respiratórias (asma e bronquite), aumento da libido (afrodisíaco), cólicas, febre, diabetes e afecções do trato gastrintestinal (gastrite, disenterias, diarreias) e disenterias, e suas folhas usadas como antipirético, diurético e no tratamento de afecções digestivas (BAHIA et al., 2005; DANTAS et al., 2008; MATOS, 1997; MENDES et al., 2000).

Os metabólitos secundários, Caesalflavona, podocarpusflavona A, agatisflavona, apigenina, rutina, campferol, sitosterol, lupeol e chalconas foram encontrados nas folhas e cascas da *Caesalpinia pyramidalis*, confirmando seu uso popular, já que estes possuem papel importante na atividade anti-inflamatória e antibacteriana (BAHIA et al., 2005).

Em estudo realizado por Silva et al. (2011) foi observado que a *Caesalpinia pyramidalis* possui elevado teor de compostos fenólicos, tanto nas folhas como na casca e ação antioxidante superior ao flavonóide rutina.

O extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* possui atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, via inibição de mediadores periféricos e mecanismos centrais, e ação antioxidante comprovadas (SANTOS et al., 2011; SANTANA et al., 2012), possuindo o flavonóide rutina como possível metabólito responsável por esta ação (SANTANA et al., 2012).

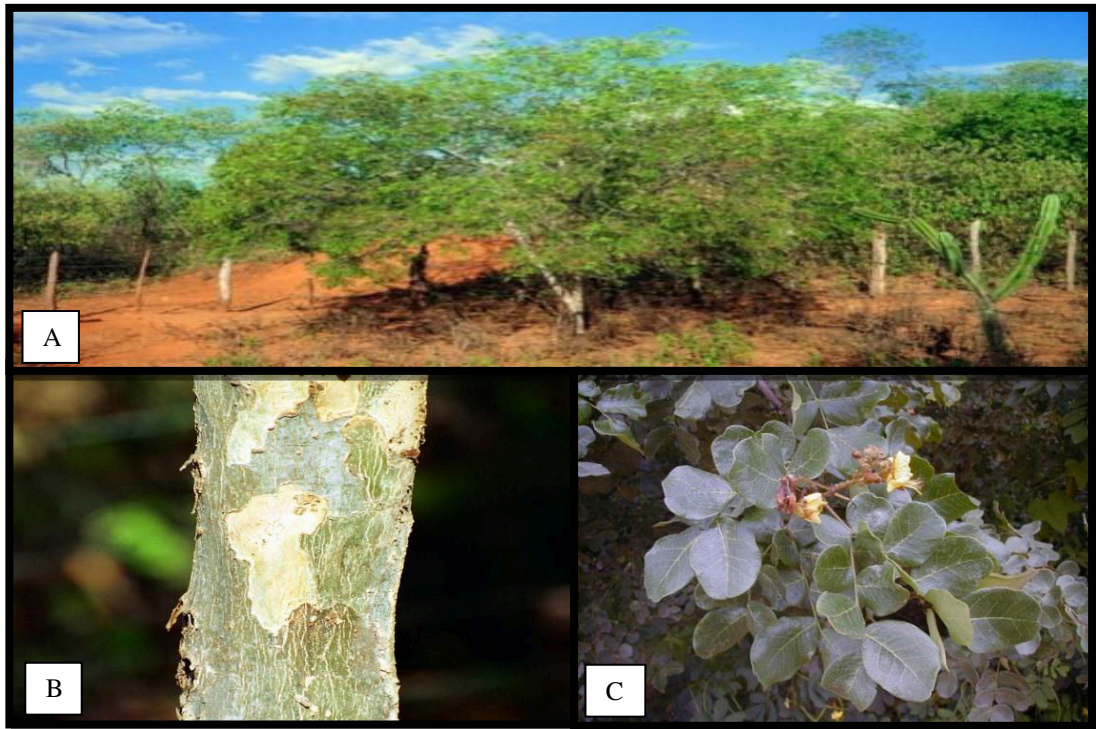


Figura 1: A: Espécie arbórea *Caesalpinia pyramidalis* Tul. encontrada na região da caatinga; B: Caule da *Caesalpinia pyramidalis* Tul.; C: folhas e flores da catingueira.
Fonte: CINP, 2011

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade gastroprotetora do extrato etanólico da entrecasca (EEE) da *Caesalpinia pyramidalis*.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar a atividade gastroprotetora do EEE da *C. pyramidalis* em úlceras induzidas por etanol absoluto.
- b. Avaliar a atividade gastroprotetora do EEE da *C. pyramidalis* em úlceras induzidas por AINE (indometacina).
- c. Avaliar a atividade do EEE da *C. pyramidalis* sobre a secreção de ácido e de muco ligando a região pilórica.
- d. Avaliar a atividade antimicrobiana do EEE da *C. pyramidalis* frente ao micro-organismo *Helicobacter pylori*.

4 Material e métodos

4.1 Planta (Coleta e identificação)

A entrecasca do tronco da *C. pyramidalis* foi coletada no povoado Xingó, município de Canindé do São Francisco, estado de Sergipe (09°66'00" S, 37°78'94" O) em setembro de 2008. Um espécime foi identificado pela botânica professora Ana Paula Prata do Departamento de Biologia da UFS e depositado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (Av. Marechal Rondon S/N, São Cristóvão - SE 49100-000, Brasil) sob o n° ASE 13.164. Antes da extração a entrecasca foi seca em estufa (Marconi MA 037) a 40°C, com renovação e circulação de ar, durante 48 h.

4.2 Preparação e caracterização do extrato etanólico

A entrecasca seca (2.840 g) da *C. pyramidalis* foi inicialmente moída até ser transformada em pó, e posteriormente submetida à extração com etanol a 90% em percolador de aço inoxidável durante cinco dias. Após concentração do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 45°C, obteve-se o extrato etanólico da entrecasca (EEE) bruto, que foi seco (rendimento de 2,62%) e submetido aos ensaios preliminares para avaliação da atividade gastroprotetora e antimicrobiana.

O EEE da *C. pyramidalis* (ASE 13.164) foi utilizado previamente por Santana et al. 2012, o qual foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Prominencemodel, Kyoto, Japan) para eluição gradiente, composto pelos seguintes módulos: duas bombas de alta pressão (LC-6A), modelo de vácuo desgaseificador (DGU-20A3), autoinjeter (SIL-10A) e sistema detector de UV com arranjos de diodo (SPD-M20Avp) conectado a uma interface (CBM 20A). A análise foi realizada em coluna C18 (Phenomenex LUNA® C18, 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm diâmetro de partícula, Torrance, CA, USA). A separação dos compostos foi feita por gradiente de eluição de modo reverso como previamente descrito (SANTANA et al., 2012).

4.3 Animais

Para avaliação da atividade gastroprotetora do EEE da *C. pyramidalis* foram utilizados 168 ratos Wistar de ambos sexos (180-300g), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Brasil) e trazidos para o biotério local do Departamento de Fisiologia antes do uso, onde permaneceram por pelo menos 02 dias até o manuseio. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos (n=8) e mantidos em caixas plásticas (5 ratos por caixa) em sala com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com água e ração ad libitum, sob ciclo claro/escuro de 12:12 h, e trocas intercaladas de serragem. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos durante o período das 7 as 17 h, e de acordo com as normas de procedimentos sobre cuidados com animais para uso em pesquisa, do Comitê de Ética da Universidade Federal de Sergipe e da Sociedade Brasileira de Cuidados com Animais de Laboratório (SBCAL). Os animais submetidos à administração oral do EEE da *C. pyramidalis* e dos controles foram aclimatados no laboratório e colocados em jejum 24 h antes do experimento. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe sob o protocolo nº 63/11.

4.4 Micro-organismo

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do EEE da *C. pyramidalis* utilizou-se a cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori*, mantida no caldo de enriquecimento (TSB – tryptic soy broth) e congelada à -20°C , doada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ.

4.5 Avaliação da atividade gastroprotetora do EEE da *C. pyramidalis*

4.5.1 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol

A metodologia utilizada para este experimento foi a descrita por Robert et al. (1979). Os animais (n = 8/grupo), em jejum de 24 h, foram pré-tratados com o EEE da *C. Pyramidalis* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.), omeprazol (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (Tween 80 a 0,2% em água, 10 mL/kg,v.o.). As úlceras gástricas agudas foram induzidas em todos os animais com a

administração de etanol absoluto (4mL/kg, v.o.) após 60 min dos tratamentos. Transcorridos 60 min da indução das úlceras, os animais foram anestesiados e eutanasiados por descolamento cervical e os estômagos retirados para análise do índice de lesões ulcerativas através do programa EARP (desenvolvido pelo Dr. Eros Comunello, Universidade do Vale do Itajaí, São José, SC, Brasil) em que foi determinada a área total de lesão (mm²) e a área relativa lesada (%), calculada com a seguinte fórmula:

$$\% = \frac{(\Sigma \text{área das lesões})}{\text{área total do estômago}} \times 100$$

A lesão ulcerativa foi calculada através da gravidade das lesões da mucosa gástrica, classificadas como:

- a) tipo 1 (T1): área da úlcera $\leq 1 \text{ mm}^2$;
- b) tipo 2 (T2): área da úlcera de $1-3 \text{ mm}^2$; e
- c) tipo 3 (T3): área da úlcera $\geq 3 \text{ mm}^2$.

O índice lesão ulcerativa (ILU) foi determinado como:

$$ILU = (1 \times T1) + (2 \times T2) + (3 \times T3)$$

E o índice de cura (%) foi determinado como:

$$IC = 100 - \frac{(ILU \text{ tratado} \times 100)}{ILU \text{ controle}}$$

Os resultados foram expressos em área total lesada (mm²), quantidade relativa de área lesada (%), índice de lesão ulcerativa (ILU) e índice de cura.

4.5.2 Análise histopatológica do estômago dos animais submetidos à administração oral de etanol absoluto

Os estômagos dos animais submetidos à administração de etanol absoluto para indução de úlceras gástricas agudas, pré-tratados com o EEE da *C. pyramidalis* (100 e 300 mg/kg), omeprazol (30mg/kg) e veículo foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por um período de 24 h. As amostras passaram por banhos em álcool, xilol e parafina. A última etapa foi conduzida por inclusão na parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram realizados e os espécimes processados de acordo com a técnica histológica da hematoxilina/eosina. Alterações da mucosa gástrica foram observadas e quantificadas (n=8/grupo, 4 cortes histológicos/estômago), como descamação e perda de vilosidades (desorganização) da superfície epitelial glandular, edema intersticial e infiltração de linfócitos na submucosa. Escores foram utilizados para quantificar as alterações morfológicas ocorridas no tecido estomacal. Escores: 0, sem alteração; 1, rara alteração; 2, moderada alteração; e 3, grave alteração. As alterações histológicas estão apresentadas como mediana (máximo - mínimo). Para análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o teste posterior de Dunn, sendo valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

4.5.3 Modelo de úlcera aguda induzida por AINE

A metodologia utilizada para este experimento foi a descrita por Djahanguiri et al. (1969). Os animais (n=8/grupo), em jejum de 24 h, foram inicialmente pré-tratados com o EEE da *C. pyramidalis* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.), cimetidina (droga padrão, 100 mg/kg, v.o.) e veículo (Tween 80 a 0,2% em água, 10 mL/kg, v.o.). Após 60 min, indometacina (100 mg/kg, v.o.) foi administrada para indução das lesões ulcerativas. Todos os animais, 6 h após a indução das úlceras gástricas, foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram o estômago retirado para determinação do índice de lesões ulcerativas segundo metodologia proposta por Gamberine et al. (1991): (i) escore 1 para cada sinal observado, perda das vilosidades da mucosa, descoloração da mucosa, edema, ou hemorragia; (ii) escore 2, menos de 10 petéquias; e (iii) escore 3, mais de 10 petéquias.

4.5.4 Modelo para avaliação da secreção de ácido gástrico

Este experimento foi realizado de acordo com o método descrito por Shay et al. (1945). Os animais (n=8/grupo), em jejum de 24 h, foram inicialmente anestesiados (tiopental de sódio, 10 mg/kg, i.p.) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo ao processo apófise xifóide, para amarração do piloro e administração intraduodenal dos diferentes tratamentos: cimetidina (droga padrão, 100 mg/kg), veículo (Tween 80 a 0,2 % em salina a 0,9%) e EEE da *C. pyramidalis* (30, 100 e 300 mg/kg). Todos os animais, 4 h após a ligadura do piloro foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical sendo o estômago retirado e pesado para determinação do conteúdo estomacal. O suco gástrico coletado foi pesado para determinação do volume de secreção gástrica (densidade do suco gástrico igual a 1) e em seguida adicionado 10 mL de água destilada para determinação do pH com pHmetro digital e determinação da concentração de íons hidrogênio através da técnica de titulação com solução de NaOH 0,01N, utilizando fenolftaleína como indicador ácido-base.

4.5.5 Modelo para avaliação da secreção de muco na mucosa gástrica

O modelo utilizado neste experimento foi descrito por Sun et al. (1991). Os animais (n=8/grupo), em jejum de 24 h, foram inicialmente anestesiados (cetamina / xilazina) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo ao processo apófise xifóide, para amarração do piloro e administração intraduodenal dos diferentes tratamentos: carbenoxolona (droga padrão, 200 mg/kg), indometacina (100 mg/kg), veículo (Tween 80 a 0,2% em salina a 0,9%, v.o.) e EEE da *C. pyramidalis* (30, 100 e 300 mg/kg). Todos os animais, 4 h após a ligadura do piloro, foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical, sendo o estômago retirado, pesado e, posteriormente, acondicionado em 10 mL de solução de Alcian blue (Alcian blue a 0,02%, sacarose a 0,16 M, acetato de sódio a 0,05 M; pH 5,8 a 20°C) por 24 h. Após este período, o tecido estomacal foi retirado, e o líquido foi submetido a centrifugação a 3000 rpm por 10 min. A leitura do sobrenadante foi realizada através de leitor de microplaca (no comprimento de onda a 620 nm), em triplicata. As leituras foram interpoladas em equação da curva padrão.

4.6 Triagem antimicrobiana – técnica de difusão em ágar (poços)

Para verificar a atividade antimicrobiana do EEE da *C. pyramidalis* frente ao *Helicobacter pylori* utilizou-se a técnica de difusão em ágar proposta por Okunji et al. (1990), com pequenas modificações. Em placa de petri com o meio de cultura Mueller Hinton suplementado com sangue de carneiro a 5% foi semeado por toda placa o *Helicobacter pylori* (6×10^8 UFC/mL). Posteriormente, poços de 8 mm de diâmetro foram confeccionados e adicionados à estes 60 µL do EEE da *C. pyramidalis* na concentração de 1.000 µg/mL e tetraciclina na concentração de 30 µg/mL. A placa foi incubada à 37°C por 24 h, e após este período foi determinado o halo de inibição do crescimento bacteriano com o auxílio de um paquímetro. Halos maiores que 8 mm foram considerados válidos. As análises foram realizadas em triplicata.

4.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

Sabendo que o EEE da *C. pyramidalis* possui atividade antimicrobiana, procurou-se determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima, para tanto foi utilizada a técnica de microdiluição em placas de 96 poços (NCCLS, 1993). Em cada poço da placa foram adicionados 100 µL de TSB (tryptic soy broth) inoculado com *Helicobacter pylori* (6×10^8 UFC/mL) e 100 µL do EEE da *C. pyramidalis* nas concentrações de 10.000; 5.000; 2.500; 1.250; 625; 312,5; 156,25; 78,125; 39,063; 19,531; 9,766; 4,883; 2,441; 1,221; 0,610 e 0,305 µg/mL. A placa foi incubada por 72 h à 37°C e, passado este período, foi observada visualmente a turvação dos poços e determinada a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, que equivale ao CIM. Cada poço da placa de 96 poços foi semeado em ágar Mueller Hinton suplementado com sangue de carneiro a 5% e incubados por 24 h para determinação da (CBM).

4.8 Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) e analisados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA) para dados paramétricos com teste posterior de Tukey e o teste de Kruskal – Wallis para dados não

paramétricos com teste posterior de Dunn através do programa estatístico GraphPad Prism (versão 5.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 Resultados

5.1 Caracterização do EEE da *C. pyramidalis*

A análise cromatográfica do EEE da *C. pyramidalis* em estudo foi previamente realizada por Santana et al. (2011) que demonstrou a possível presença do flavonóide rutina devido ao tempo de retenção do EEE da *C. pyramidalis* ser correspondente ao tempo de retenção da rutina.

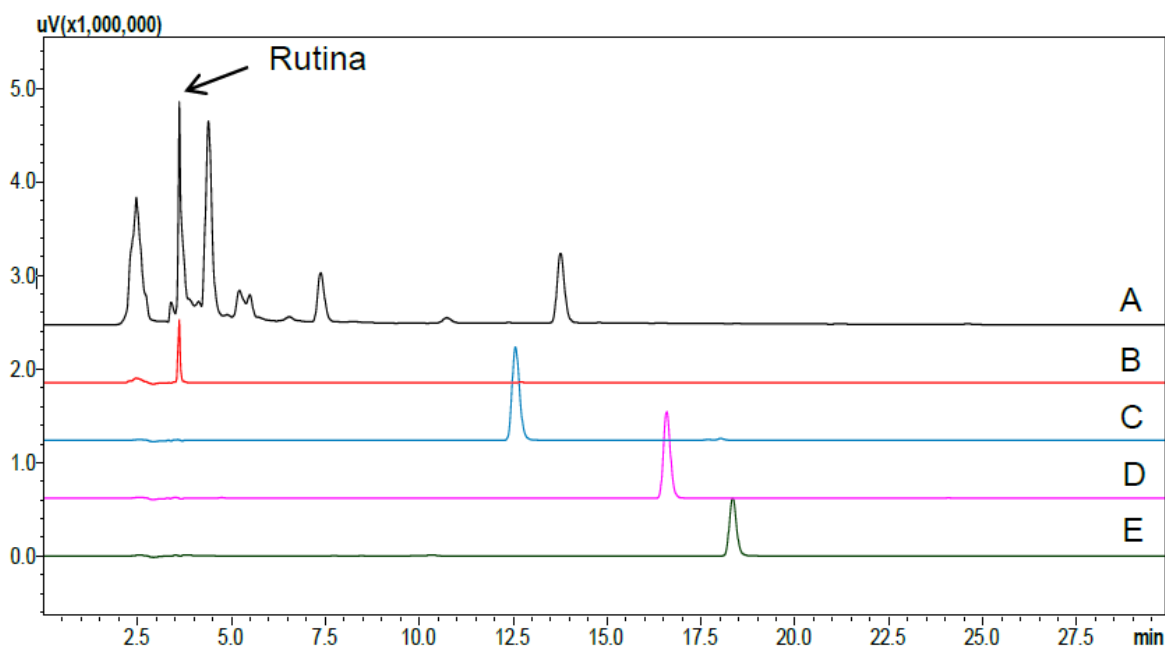


Figura 2: Cromatogramas (254 nm) do EEE da *C. pyramidalis* (A) e dos padrões rutina (B), quercetina (C), apigenina (D) e baicaleina (E).

Fonte: Santana et al. (2011)

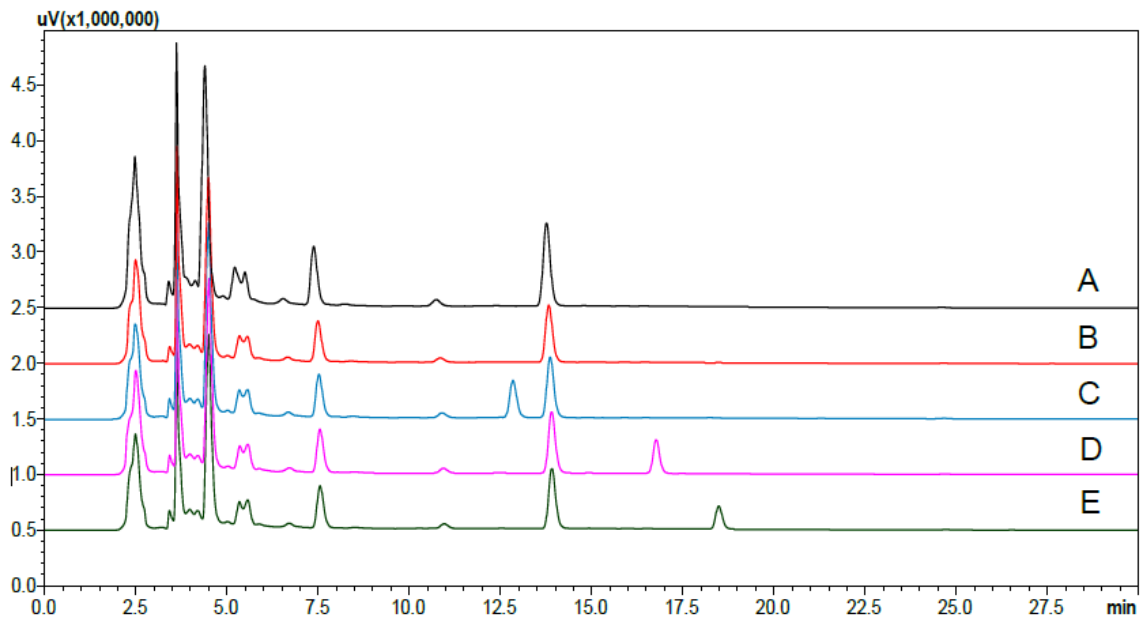


Figura 3: Cromatogramas (254 nm) do EEE da *C. pyramidalis* (A) fortificado com os padrões rutina (B), quercetina (C), apigenina (D) e baicaleína (E).

Fonte: Santana et al. (2011)

5.2 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol

No modelo de úlceras agudas induzidas por etanol observou-se que o pré-tratamento dos animais com o EEE da *C. pyramidalis* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg foi capaz de prevenir de forma significativa e dose dependente, o índice de lesões ulcerativas, a área total de lesão e a área relativa de lesão quando comparadas ao veículo ($p < 0,01$, Tabela 1). De forma similar, os animais pré-tratados com omeprazol (30 mg/kg), também tiveram menor índice de lesões ulcerativas ($p < 0,001$, Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do EEE da *C. pyramidalis* em úlceras induzidas por etanol.

Tratamento (v.o.)	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm ²)	Área relativa de lesão (%)	Índice de lesão ulcerativa (ILU)	Índice de cura (%)
Veículo	-	111,84 ± 13,37	11,33 ± 1,56	25,50 ± 1,84	-
Omeprazol	30	0,27 ± 0,27**	0,04 ± 0,04**	0,33 ± 0,33**	98,70 ± 1,31
EEE	30	45,47 ± 6,38**	4,38 ± 0,63**	18,20 ± 1,52*#	28,62 ± 4,09
	100	36,41 ± 4,37**	4,08 ± 0,83**	11,90 ± 1,23***#	53,33 ± 3,32
	300	0,93 ± 0,46**	0,16 ± 0,08**	0,92 ± 0,40**	96,39 ± 1,56

Resultados apresentados como média ± erro padrão da média de 8 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ comparado com o veículo. # $p < 0,01$ comparado com EEE 300 mg/kg.

5.3 Análise histopatológica do estômago dos animais submetidos à administração oral de etanol absoluto

Em todos os grupos foram observadas alterações histopatológicas compatíveis com lesão gástrica leve, expressas morfológicamente como descamação e perda de vilosidades (desorganização) da superfície epitelial glandular, ocasionais figuras apoptóticas, edema intersticial e discreta infiltração linfocitária submucosa (Figura 1).

A análise quantitativa destas alterações morfológicas revelou que o grupo pré-tratado somente com veículo apresentou escores de desorganização da superfície glandular significativamente mais intensos que o grupo tratado com omeprazol (30 mg/kg) e com o EEE da *C. pyramidalis* nas doses de 100 e 300 mg/kg ($p < 0,001$, Tabela 2). Resultado semelhante foi observado na análise do edema intersticial e presença de células inflamatórias (linfócitos) na submucosa gástrica ($p < 0,001$, Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do EEE da *C. pyramidalis* sobre a destruição microscópica da mucosa gástrica induzida por etanol absoluto.

Tratamento (v.o.)	Dose (mg/kg)	Desorganização (escore 0-3)	Edema (escore 0-3)	Células inflamatórias (escore 0-3)
Veículo	-	3,0 (2,0-3,0)	3,0(2,0-3,0)	1,0(0,0-1,0)
Omeprazol	30	1,0(1,0-2,0)*	1,0(0,0-2,0)*	0,5(0,0-1,0)
EEE	100	1,0(0,0-3,0)*	1,0(0,0-2,0)*	00(0,0-2,0)*
	300	1,0(0,0-2,0)*	1,0(0,0-2,0)*	0,0(0,0-0,0)*

Resultados expressos como mediana dos escores com mínimo e máximo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. * $p < 0,001$ comparado ao veículo. Secções histológicas em quaduplicata ($n=8$ /grupo).

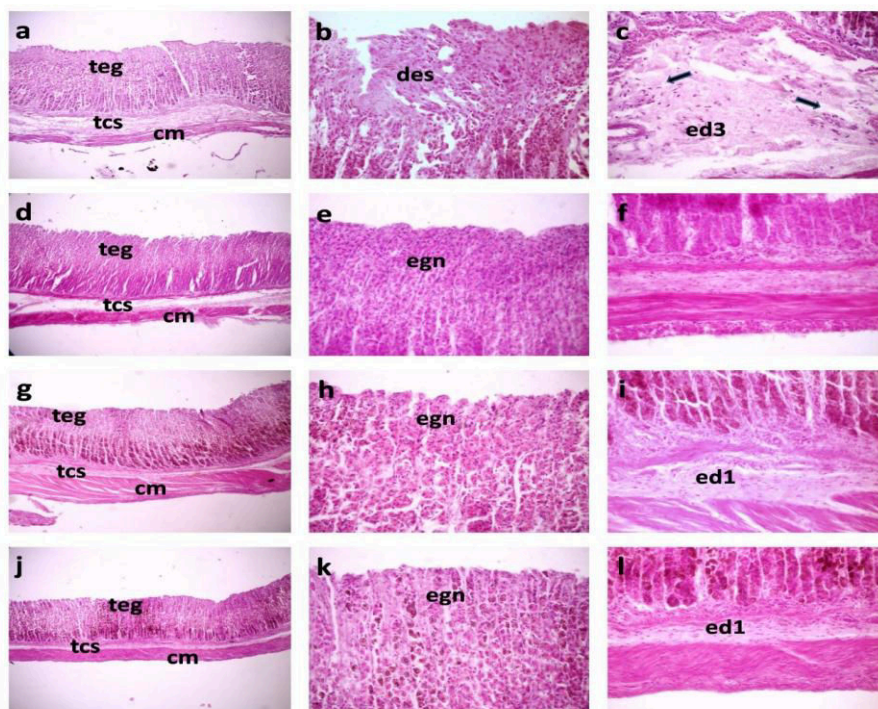


Figura 4. Secções histológicas coradas em HE. (a/d/g/j, representam respectivamente grupo veículo, omeprazol, EEE 100mg/kg e EEE 300 mg/kg)(100x) Visão panorâmica dos tecidos gástricos, destacando o tecido epitelial de revestimento gástrico (teg), tecido conjuntivo da submucosa (tcs) e camada muscular periférica (cm). No grupo veículo (b/c, 400x), observa-se desorganização da estrutura epitelial (des), edema intersticial pronunciado da submucosa (ed3) e infiltrado inflamatório mononuclear (setas). No grupo omeprazol (e/f, 400x), observa-se epitélio gástrico com características de normalidade (egn) e submucosa sem alterações edematosas. Nos grupos EEE100 mg/kg (h/i, 400x) e EEE300 mg/kg (k/l, 400x) o epitélio gástrico está bem preservado (egn) e a submucosa apresenta discreto edema intersticial (ed1).

5.4 Modelo de úlcera aguda induzida por AINE

No modelo de úlcera aguda induzida por indometacina foi possível observar que o pré-tratamento dos animais com o EEE da *C. pyramidalis* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg foi capaz de prevenir de forma significativa ($p < 0,001$, Tabela 3), o índice de lesões ulcerativas, quando comparadas ao veículo. De forma similar, os animais pré-tratados com cimetidina, tiveram menor índice de lesões ulcerativas ($p < 0,001$, Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do EEE da *C. pyramidalis* em úlceras induzidas por AINE.

Tratamento (v.o.)	Dose (mg/kg)	Índice de lesão ulcerativa (ILU)	Índice de cura (%)
Veículo	-	3,07 ± 0,25	-
Cimetidina	100	0,40 ± 0,21*	86,97
EEE	30	0,67 ± 0,28*	78,18
	100	0,40 ± 0,27*	86,97
	300	0,73 ± 0,30*	76,22

Resultados apresentados como média ± erro padrão da média de 8 animais/grupo. Kruskal - Wallis seguido de Dunn. *p < 0,001 comparado com o veículo.

5.5 Avaliação da secreção de ácido gástrico

O pré-tratamento com o EEE da *C. pyramidalis* não reduziu a secreção de ácido gástrico e nem a acidez total do suco gástrico em relação ao grupo controle (Tabela 4). Entretanto, a cimetidina (100 mg/kg) diminuiu significativamente (p < 0,01) os parâmetros do suco gástrico (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito do EEE da *C. pyramidalis* sobre a secreção do suco gástrico.

Tratamento (v.o.)	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	pH	[H ⁺]mEq/L/4 h
Veículo	-	1,04 ± 0,19	3,60 ± 0,18	48,86 ± 2,82
Cimetidina	100	0,42 ± 0,05*	4,96 ± 0,33**	28,09 ± 2,45*
EEE	30	0,73 ± 0,07	3,50 ± 0,13	49,10 ± 3,76
	100	0,68 ± 0,09	3,48 ± 0,18	45,09 ± 3,50
	300	0,70 ± 0,07	3,25 ± 0,14	51,12 ± 3,57

Resultados apresentados como média ± erro padrão da média de 8 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey. *p < 0,01 e **p < 0,001 comparado com o veículo.

5.6 Avaliação da secreção do muco gástrico

Neste modelo experimental o pré-tratamento dos animais com o EEE da *C. pyramidalis* (30, 100 e 300 mg/kg) aumentou a produção do muco gástrico (p < 0,05) comparado com o veículo (Tabela 5). A carbenoxolona (200 mg/kg) também aumentou a produção do muco gástrico (p < 0,05, Tabela 5).

Tabela 5: Efeito do EEE da *C. pyramidalis* na secreção de muco gástrico.

Tratamento (v.o.)	Dose (mg/kg)	Quantidade de Alcian blue ligado (mg/g de tecido)
Veículo	-	1,00 ± 0,13
Carbenoxolona	200	1,43 ± 0,07*
Indometacina	100	0,91 ± 0,07
EEE	30	1,44 ± 0,05*
	100	1,44 ± 0,11*
	300	1,61 ± 0,09**

Resultados apresentados como média ± erro padrão da média de 8 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey. *p < 0,05 e **p < 0,001 comparado com o veículo.

5.7 Triagem antimicrobiana – técnica de difusão em ágar (poços)

O EEE da *C. pyramidalis* (10.000 µg/mL) apresentou halos de inibição de crescimento bacteriano do *Helicobacter pylori* de 12,0 ± 1,7 mm e a droga padrão (tetraciclina 30 µg/mL) apresentou halos de inibição de crescimento bacteriano do *Helicobacter pylori* de 40,0 ± 0,5mm.

5.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

O EEE da *C.pyramidalis* apresentou CIM de 625µg/mL e CBM de 10.000µg/mL frente ao bastonete gram negativo *Helicobacter pylori*.

6 Discussão

Neste trabalho, demonstramos, pela primeira vez, o efeito gastroprotetor da *C. pyramidalis*, utilizando modelos de úlcera gástrica induzida por diferentes agentes, em ratos.

A atividade gastroprotetora do EEE da *C. pyramidalis* foi inicialmente avaliada nos modelos de úlceras agudas induzidas por etanol, que é um agente tóxico direto sobre as células epiteliais da mucosa gástrica, e por AINE (indometacina), que inibe a proteção normal do estômago (diminuição de síntese de prostanóides constitutivos). Estes modelos não representam integralmente a patologia humana (úlceras crônicas), mas são clássicos no screening de novas substâncias com atividade gastroprotetora. Eles fornecem importantes indicativos de possíveis mecanismos de ação das substâncias, que podem estar associados a fatores antioxidantes e/ou fatores anti-inflamatórios. O uso de substâncias como álcool e AINE está entre as principais causas envolvidas na etiologia de úlceras gástricas no homem (MOFLEH, 2010; ROBERT et al., 1979).

O EEE da *C. pyramidalis* no modelo de úlceras induzidas por etanol diminuiu significativamente e de maneira dose-dependente as lesões ulcerativas em comparação com o veículo. Através da análise histopatológica foi possível observar que o EEE da *C. pyramidalis* protegeu a mucosa dos efeitos tóxicos do etanol quando comparado ao veículo. O tecido estomacal dos animais que foram pré-tratados com o EEE da *C. pyramidalis* na dose de 300 mg/kg não apresentou nenhuma alteração morfológica como desorganização e morte das células epiteliais, e edema intersticial. Desta forma, o efeito gastroprotetor do EEE da *C. pyramidalis* pode ser devido a sua atuação em vários mecanismos de proteção, como agente antioxidante, visto que este possui potente ação antioxidante in vivo (SANTANA et al., 2012) e como protetor da mucosa gástrica impedindo a morte das células epiteliais e desta forma mantendo a secreção das PG e secreção de muco através destas (MONFORTE et al., 2012).

A indução de úlceras gástricas em ratos pela administração oral de etanol absoluto é caracterizada por provocar alterações nos mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica (camada de muco, motilidade gástrica, fluxo sanguíneo, enzimas antioxidantes e PG). Essas alterações ocorrem devido ao efeito tóxico direto do etanol à mucosa gástrica, poucos minutos após sua administração oral. Neste modelo de indução de úlceras gástricas, o suco gástrico

não é responsável pelos danos à mucosa, este somente acelera o processo de injúria ao tecido e intensifica as lesões (LAINE et al., 1988; SZABO, 1987;).

A manutenção da microcirculação da mucosa gástrica é considerada um dos mais importantes mecanismos de gastroproteção (TULASSAY et al, 2011). O etanol interfere neste sistema de defesa, promovendo uma forte constrição das vênulas seguida de dilatação das arteríolas, gerando um processo de isquemia-reperfusão que aumenta a concentração de radicais livres e causa necrose das células epiteliais. Desta forma, os níveis de PG encontram-se diminuídos ocasionando redução da secreção de bicarbonato e da produção de muco. Os radicais livres possuem um importante papel na diminuição dos níveis de PG, sendo as células epiteliais responsáveis pela secreção de PG no tecido gástrico (PINÂ, 2010). Essas ações resultam no aumento do fluxo de Na^+ e K^+ , aumento da secreção de pepsina e perda de H^+ e histamina para o lúmen (HALLIWELL et al., 1995; SZABO, 1987;). Portanto, o estresse oxidativo está intimamente relacionado à etiopatologia das úlceras gástricas e substâncias com atividade antioxidante podem desempenhar ação gastroprotetora.

A atividade antiulcerogênica do EEE da *C. pyramidalis* também foi avaliada em úlceras induzidas por indometacina. A indometacina é um fármaco anti-inflamatório da classe dos AINEs que inibem a enzima ciclo-oxigenase que é responsável pela síntese de PGs e PGI_2 endógenas. As PGs e PGI_2 são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato na mucosa gástrica. Sua diminuição acarreta em perda da citoproteção e redução do fluxo sanguíneo local (ROBERT et al., 1979).

Neste modelo, as doses de 30, 100 e 300 mg/kg diminuíram significativamente as lesões ulcerativas na mucosa gástrica. Isto indica que, provavelmente, o EEE da *C. pyramidalis* esteja promovendo um efeito protetor sobre a mucosa, podendo estar relacionado com o aumento de síntese de PG ou de NO, que assim como a prostaglandina, estimula a secreção de muco e bicarbonato e promove a manutenção do fluxo sanguíneo.

Os constituintes químicos, flavonóides, taninos e saponinas identificados nas folhas (BAHIA et al., 2005) e na entrecasca (SANTOS et al., 2011) da *Caesalpinia pyramidalis* e a possível presença do flavonóide rutina (SANTANA et al., 2012) na entrecasca do extrato etanólico em estudo conferiram a este uma potente ação gastroprotetora, comprovando a utilização popular desta planta medicinal no tratamento de afecções gástricas.

Os flavonóides possuem atividade antiulcerogênica e previnem lesões da mucosa gástrica produzidas por vários métodos de indução de úlcera. Entre os inúmeros flavonóides

já estudados, alguns são descritos como capazes de exercer atividade antiulcerogênica; entre eles destacam-se a rutina, narigina, quercetina, canferol, sofaradina e luteolina (BORRELLI et al., 2000; DI CARLO et al., 1999; HARBONE et al., 2000; LEWIS, 1991). A ação gastroprotetora dos flavonoides pode ser mediada através da estimulação da secreção de muco e bicarbonato (CRISTONI et al., 1989; GRACIOSO et al., 2002). Santana et al. (2012) verificaram a possível presença do flavonóide rutina no EEE da *C. pyramidalis* e atribuem a este flavonóide a ação anti-inflamatória demonstrada no modelo de pancreatite aguda. O extrato utilizado no presente estudo foi o mesmo avaliado por Santana et al. (2012); portanto, podemos atribuir, ao menos em parte, que o efeito gastroprotetor do extrato etanólico da entrecasca da *C. pyramidalis* se deve ao efeito gastroprotetor da rutina em úlceras gástricas. A rutina possui ação gastroprotetora em úlceras agudas induzidas por etanol (LA CASA et al., 2000) e AINE (RABEEM, 2010) através de mecanismos antioxidantes (diminuição da peroxidação lipídica e aumento da enzima antioxidante glutationaperoxidase) (LA CASA et al., 2000).

As plantas do gênero *Caesalpinia* são ricas em constituintes químicos com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiulcerogênicas (AGRA et al., 2007). Sharma et al. (2011) demonstraram que tanto o extrato aquoso quanto o extrato etanólico das folhas da *Caesalpinia pulcherrima* possuem ações anti-inflamatória e antiúlcera. A menor dose dos extratos (100 mg/kg) preveniu a formação de úlceras gástricas por AINE, assim como inibiu a secreção de ácido gástrico e alterou o pH e acidez total da secreção (SHARMA et al., 2011). Nas folhas da *Caesalpinia pulcherrima* foi encontrado a presença do flavonóide rutina, que é um potente agente antiulcerogênico (CHIANG et al., 2003; LA CASA et al., 2000).

Outro estudo demonstrou que o extrato etanólico do caule da *Caesalpinia ferrea* possui efeito cicatrizante em úlceras induzidas por ácido acético (BACCHI et al., 1995) e inibidor da secreção de ácido gástrico (BACCHI et al., 1994). Portanto, com o intuito de avaliar o envolvimento do EEE da *C. pyramidalis* na secreção de ácido gástrico e na síntese e secreção de muco foi realizado o experimento de ligadura de piloro onde foram avaliados a quantidade (mL), o pH, a acidez total do suco gástrico e a síntese e secreção de muco.

A via de administração no modelo de ligadura de piloro é a via intraduodenal, que permite investigar as ações do extrato por via sistêmica, excluindo as interações do contato direto com a mucosa gástrica. O EEE da *C. pyramidalis* em nenhuma das doses administradas

diminuiu o volume gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio, demonstrando que o EEE da *C. pyramidalis* não age na bomba de prótons ou se ligando aos receptores H_2 impedindo a ligação da histamina, desta forma, não possuindo ação anti-secretória. Resultado semelhante foi observado por Santin et al. (2011) na investigação da ação gastroprotetora do óleo essencial da *Syzygium aromaticum* em que o óleo essencial protegeu a mucosa gástrica dos agentes tóxicos etanol e indometacina, porém não foi capaz de alterar o pH e a acidez da secreção gástrica, assim como inibir a secreção de ácido pelas células parietais. Outro trabalho, avaliando a ação gastroprotetora da *Mouriri elliptica*, observou que esta espécie não age inibindo a secreção de ácido gástrico, mas sim agindo nos fatores de proteção da mucosa (MOLEIRO et al., 2012).

O experimento de ligadura de piloro também permitiu avaliar o envolvimento do EEE da *C. pyramidalis* na síntese e secreção de muco gástrico. O EEE da *C. pyramidalis* aumentou significativamente, em todas as doses utilizadas, a síntese e secreção de muco gástrico. A proteção criada pelo muco ligado ao tecido pode ser observada devido à formação de mucopolissacarídeos solúveis. Estes mucopolissacarídeos são quantificados de acordo com sua ligação ao Alcian blue, um corante específico para mucinas ácidas (LAPA et al., 2008).

O muco apresenta importante relação com o processo de cura em casos de injúrias agudas pela formação de uma capa mucoide que permite a re-epitelização do local lesionado (WALLACE et al., 1986). O EEE da *C. pyramidalis* além de possuir efeito citoprotetor em úlceras agudas induzidas por etanol e AINE devido a sua ação antioxidante, também apresenta importante papel no processo de cura através do aumento da produção de muco que pode estar relacionada com o aumento da síntese de prostaglandinas.

Substâncias utilizadas para o tratamento das úlceras gástricas podem proteger a mucosa gástrica inibindo os fatores agressores e/ou aumentando os fatores de proteção da mucosa gástrica. Os resultados deste trabalho fornecem indícios de que o EEE da *C. pyramidalis* está agindo através do aumento dos fatores protetores da mucosa gástrica.

A literatura relata que a *Caesalpinia pyramidalis* possui atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas gengivalis* (ALVIANO et al., 2008). Com base nesse conhecimento e da participação do bastonete gram negativo *Helicobacter pylori* no desenvolvimento das úlceras gástricas, avaliamos a ação antimicrobiana do EEE da *C. pyramidalis* frente ao *Helicobacter pylori*. Através da técnica de difusão em ágar (técnica dos poços), em que se avalia o halo de inibição do crescimento bacteriano, foi possível observar que o EEE da *C.*

pyramidalis possui atividade antimicrobiana para o *Helicobacter pylori*, com valor de CIM de 625 µg/ml e CBM de 10.000 µg/ml. As doses utilizadas nos experimentos in vivo (30, 100 e 300 mg/kg) possivelmente também apresentam atividade antimicrobiana frente ao *Helicobacter pylori*, visto que estas são respectivamente 3, 10 e 30 vezes maiores que o valor de CBM in vitro. Para comprovação da ação bactericida in vivo do EEE da *C. pyramidalis* faz-se necessário novos experimentos, assim como, para determinação de efeitos tóxicos relacionados a utilização do EEE da *C. pyramidalis*.

7 Conclusão

O extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* possui ação gastroprotetora, confirmando o uso popular desta planta no tratamento das afecções digestivas.

Os achados desse trabalho indicam que o extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* pode ser um coadjuvante no tratamento das úlceras gástricas e, após estudos de toxicidade, poderá ser de grande interesse pela indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas substâncias para tratamento de distúrbios gástricos.

8 Referências

ABDELWAHAB, S. I.; S, MOHAN, S.; ABDULLA, M. A.; SUKARI, M. A.; ABDUL, A. B.; TAHA, M. M. E.; SYAM, S.; AHMAD, S.; LEE, K. H., 2011. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: Possible involvement of indirect antioxidant action. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 963– 970.

AGRA, M. F., FREITAS, P. F., BARBOSA-FILHO, J. M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, 114-140.

AKHTAR, M. S.; MUNIR, M., 1989. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea*, and *Ocimum basilicum* in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 27, 163-176.

ALMEIDA, C. F. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIS, M. B., 2006. Medicinal plants popularly used in the Xingo region a semiarid location in the northeast Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 15, 1-7.

ALVIANO, W.S; ALVIANO, D.S; DINIZ, C.G; ANTONIOLLI, A.R; ALVIANO, C.S; FARIAS, L.M; CARVALHO, M.A.R; SOUZA, M.M.G; BOLOGNESE, A.M., 2008. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of oral biology*, 53, 545 – 552.

AMIEVA, M. R.; EL-OMAR E. M., 2008. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*, 134, 306–323.

ANDREOLI T. E., 2000. Physiology in medicine: Free Radicals and oxidative stress. *American Journal Medicine*, 108, 650-51.

ARCHANA, P.; TANDAN, S. K.; CHANDRA, S.; LAL, J., 2005. Antipyretic and analgesic activities of *Caesalpinia bonducella* seed kernel extract. *Phytotherapy Research*, 19, 376-381.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S. & DUBOIS, A., 2000. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins & other Lipids Mediators*, 61,105-124.

AVILA, J. R.; DE LA LASTRA, C. A.; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.,1996. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats.*Inflammatory Research*, 45, 83-88.

BACCHI, E.M., SERTIÉ, J.A., VILLA, N., KATZ, H., 1995. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Medica*, 61, 204-207.

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

BAHIA, M.V.; BATISTA, J. S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P., 2005. Outros biflavonóides da *Caesalpinia pyramidalis*. *Journal Brazilian Chemical Society*, 16, 14-22.

BIGHETTI, A.E., ANTÔNIO, M.A., KOHN, L.K., REHDER, V.L.G., FOGGIO, M.A., POSSENTI, A., VILELA, L., CARVALHO, J.E., 2005. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania evigata* Schultz Bip. *Phytomedicine*, 12, 72-77.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A., 2000.The plant Kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*, 14, 581-591.

BRAGA, R., 1953. Plantas do Nordeste - Especialmente do Ceará, Coleção Mossoroense, 4 ed. Universitária da UFRN, Natal.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

CHIANG LC, CHIANG W, LIU MC, LIN CC., 2003. In vitro antiviral activities of Caesalpinia pulcherrima and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 194-198.

CRISTONI, A.; MALANDRINO, S.; MAGISTRETTI, M.J, 1989. Effect of a natural flavonoid on gastric mucosal barrier. *Drug Research*, 39, 590-592.

CRYER, B. NSAID., 2000. Gastrointestinal toxicity. *Current Opinion in gastroenterology*, 16, 495-502.

DANTAS, B.F; CORREIA, J.S; MARINHO, L.B; ARAGÃO, C.A., 2008. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* L.) *Revista Brasileira de Sementes*, 30, 221-227.

DI CARLO G, MASCOLO N, IZZO AA, CAPASSO F., 1994. Effect of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. *Phytotherapy Research*, 8, 42-45.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F., 1999. Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, 65, 337- 353.

DJAHANGUIRI, B., 1969. The production of acute ulceration by indomethacin in the rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 4, 265–267.

FELDMAN, H., 2013. Gastric acid secretion: still relevant? *The American journal of gastroenterology*. DOI: 10.1038/ajg.2012.478

FESHARAKI, M., NASIMI, A., MOKHTARI, S., MOKHTARI, R., MORADIAN, R., AMIRPOOR, N., 2006. Reactive oxygen metabolites and anti-oxidative defenses in aspirin-induced gastric damage in rats: gastroprotection by vitamin E. *Pathophysiology*, 13, 237–243.

FORTE JG , FORTE GM , SALTMAN P., 1967. K + -stimulated phosphatase of microsomes from gastric mucosa .*Journal of Cellular Physiology*, 69, 293- 304.

GAMBERINI, M.T., SKORUPA, L.A., SOUCCAR, C., LAPA, A.J., 1991. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis striptera*, Mart. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, 137-139.

GARCIA, M.L., HANNER, M., KNAUS, H.G., 1997. Pharmacology of potassium channels. *Advances in Pharmacology*, 39, 425–471.

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUSA BRITO, A. R. M., 2002. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25, 487-491.

GURIB, F. A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday. *Molecular Aspect of Medicine*, 27, 1-93,

HALLIWELL B., AESCHBACH R., LOLIGER J., ARUOMA O.I., 1995. The characterization of antioxidants. *Chemical Toxicology*, 33, 601-617.

HARBONE, J. F.; WILLIAMS, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

KOIZUMI S, ODASHIMA M, OTAKA M, JIN M, LINDEN J, WATANABE S ., 2009. Attenuation of gastric mucosal inflammation induced by indomethacin through activation of the A2A adenosine receptor in rats. *Journal of Gastroenterology*, 44, 419–425.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWISKI, T.; KONTUREK, J.W.; PAWLIK, W.W., 2005. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56, 507-30.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; LA LASTRA, C.A.; MOTILVA, V.; CALERO, M.J.M., 2002. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 45 – 53.

LAINE, L., WEINSTEIN, W.M., 1988. Histology of alcoholic hemorrhagic “gastritis” a prospective evaluation. *Journal of Gastroenterology* 94, 1254 – 1260.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M S. A.; LIMA, T. C. M., 2008. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Campinas: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais – SBPM, UNIFESP-SP 7,43.

LEONG, R.W., 2009. Differences in peptic ulcer between the East and the West. *Gastroenterology. Clinics North America*, 38, 363-379.

LEWIS, D. A.; HANSON, P. J., 1991. *Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin*. Elsevier Science Publishers 28, 201-231.

MATOS, F.J.A., 1997. *O Formulário Fitoterápico do Professor Dias da Rocha*, 2nd ed. Universitária da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MEDEIROS, J.V., GADELHA, G.G., LIMA, S.J., GARCIA, J.A., SOARES, P.M., SANTOS, A.A., BRITO, G.A., RIBEIRO, R.A., SOUZA, M.H., 2008. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. *British Journal of Pharmacology*, 153, 721–727.

MENDES, C.C., BAHIA, M. V., DAVID, J. M., DAVID, J.P., 2000. Plantas forrageiras das caatingas. *Fitoterapia* 71, 205-207.

MOFLEH, I.A.A. Spices, herbal xenobiotics and the stomach: Friends or foes? 2010. World journal of Gastroenterology 22, 2710-2719.

MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.;MIROSSAY, L., 2000. Role of mucus in ischemia/reperfusion induced gastric mucosal injury in rats. Physiology Research., 49, 441-446.

MOLEIRO,F.C; ANDREO, M.A.; SANTOS, R.C.;MORAES, T.M.;MARTINS, C.M.;CARLI, C.B.A.;LOPES, F.C.M.;PELLIZZON, C.H.;BAUAB, T.M.; VILEGAS, W.;HIRUMA-LIMA, C.A., 2012. Mouririelliptica: Validation of gastroprotective, healing and anti-Helicobacter pylori effects. Journal of Ethnopharmacology doi:10.1016/j.jep.2009.03.04.

MONFORTE, M.T.; LANUZZO, F.; PERGOLIZZI, S.; MONDELLO, F.; TZAKOU, O.; GALATI, E.M., 2012. Protective effect of Calaminthaofficinalismoench leaves against alcohol – induced gastric mucosa injury in rats. Macroscopic, histologic and phytochemical analysis.Phytotherapy Research. 26, 839–844.

MORAN, A.P., 1996.The role of lipopolysaccharide in Helicobacter pylori pathogenesis.Aliment.Pharmacol. 1, 39-50.

NAITO Y, YOSHIKAWA T., 2006.Oxidative stress involvement and gene expression in indomethacin-induced gastropathy.Redox Report, 11, 243–53.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993.Methods for Dilution in Antimicrobial Susceptibility Tests.Approved Standard M2-A5.National Committee for Clinical Laboratory Standard, Villanova, PA.

OATES, P.J, HAKKINEN, J.P., 1988. Studies on the mechanismof ethanol induced of human monocyte functions by acute ethanol treatment: decreased tumor necrosis factor-R, interleukin-1 β and elevated interleukin-10, and transforming growth factor- β production. Alcoholism, Clinical. Experimental Research, 20, 900–907

OKUNJI, C.O., OKEKE, C.N., GUGNANI, H.C., IWU, M.M., 1990. An antifungal saponin from fruit pulp of *Dracaena manni*. *International Journal of Crude Drug Research* 28, 193–199.

PESKAR, B.M., EHRLICH, K., PESKAR, B.A., 2002. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 969–974.

PINÂ, A.E.C.; ALVAREZ, G.R.T.; NAVARRETE, A. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis by PAG protects against ethanol-induced gastric damage in the rat 2010. *European Journal of Pharmacology* 630, 131–136.

QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; DIAS, T. L. M. F.; SOUZA, E. T.; MATTA, C. B. B.; AQUINO, A. B.; SILVA, L. N. A. C.; SILVA, D. J. C.; MELLA, E. A. C.; AGRA, M. F.; FILHO, J. M. B.; ARAUJO-JUNIOR, J. X.; SANTOS, B. V. O., 2010. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadeniastipulacea Benth* (Fabaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 128, 377-383.

RAHEEM, I.T.A., 2010. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin ulcers in rats. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 107, 742-750.

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

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

ROCHA, N.F.M.; OLIVEIRA, G.V.; ARAUJO, F.Y.R.; RIOS, E.R.V.; CARVALHO, A.M.R.; SOARES, P.M.G.; SOUSA, D.P.; SOUSA, F.C.F. Bisabolol-induced

gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration 2011. *European journal of Pharmaceutical Sciences*. doi:10.1016/j.ejps.2011.08.020.

SALIM, A. S., 1992. Sulphydryl-containing agents: a new approach to the problem of refractory peptic ulceration. *Pharmacology*, 45, 301-306.

SANTANA, D.G.; SANTOS, C.A.; SANTOS, A.D.C.; NOGUEIRA, P.C.L.; THOMAZZI, S.M.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; CAMARGO, E.A. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis 2012. *Journal of ethnopharmacology* 142, 445-455.

SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; KLEIN, L.C.; MACHADO, I.D; COSTA, P.; OLIVEIRA, A.P.; TILIA, C.; SOUZA, J.P.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models 2011. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 383,149–158.

SANTOS, C.A.; PASSOS, A.M.P.R.; ANDRADE, F.C.; CAMARGO, E.A.; ESTEVAM, C.S.; SANTOS, M.R.V.; THOMAZZI, S.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents 2011. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 1077-1083.

SANTOS, R.R.B.; LOPEZ, J.A.; SANTOS, L.C.; ZACHARIAS, F.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; LIMA, F.W.H., 2012. Biological effect of leaf aqueous extract of *caesalpinia pyramidalis* in goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *evidence-based complementary and alternative medicine*. Doi:10.1155/2012/510391

SCHUBERT, M.L., 2011. Gastric secretion. *Current opinion in gastroenterology*, 27, 536-542.

SELHORST, A.M.; BESERRA, S.; CALEGARI, P.I.; SOUZA, M.C.; SANTOS, R.A.N.; LIMA, J.C.S.; SILVA, R.M.; BALOGUN, S.O.; MARTINS, D.T.O. Gastroprotective and

Ulcer-Healing Mechanisms of Ellagic Acid in Experimental Rats 2011. *Journal of agricultural and Food Chemistry* , 59, 6957–6965.

SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G., 2004. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology* 126, 903-913.

SHARMA, V., RAJANI, G.P., 2011. Evaluation of *Caesalpinia pulcherrima* Linn. for anti-inflammatory and antiulcer activities. *Indian Journal of Pharmacology*. 43, 168-171.

SHAY, H. 1945. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. *Gastroenterol.* 5, 43-61.

SHINE, V.J.; LATHA, P.G.; SHYAMAL, S.; SUJA, S.R.; ANUJA, G.I.; SINI, S.; PRADEEP, S.; RAJASEKHARAN, S. Gastric antisecretory and antiulcer activities of *Cycleapeltata* (Lam.) Hook. f. & Thoms. in rats. *J. Ethnopharmacol.* (2009). doi:10.1016/j.jep.2009.04.039.

SILVA, H.; SOBRINHO, T.J.; CASTRO, V.T.; LIMA, D.; AMORIM, E.L., 2011. Antioxidant capacity and phenolic content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. *Molecules* 16, 4728–4739.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D., 2008. Farmacovigilância e reações adversas as plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 618-626.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., 2003. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS.

SLOMIANY BL, SLOMIANY A., 2000. Role of endothelin-converting enzyme-1 in the suppression of constitutive nitric oxide synthase in rat gastric mucosal injury by indomethacin. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35:1131–1136.

SONE, Y.; KUMADA, T.; TOYODA, H.; YOKOYAMA, M.; KATO, M.; ASAKA, M., 2008. Eradicating *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease reduces medical costs in the community. *Helicobacter* 13, 346-351.

SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; VILLA-REAL, V.; SANTOS, R. A. N.; RAO, V. S.; SILVA, R. M. MARTINS, D. T. O., 2009. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pulori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 452-458.

SRINIVASAN, R.; CHANDRASEKAR, M. J. N.; NANJAN, M. J.; SURESH, B., 2007. Antioxidant activity of *Caeslapiniadigyna* root. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 284-291.

SUMBUL, S., AHMAD, M.A., MOHD, A., MOHD, A., 2011. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 3, 361-367.

SUN, S.B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H., 1991. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurumfolcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43, 699-704.

SZABO S., 1987. Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional biochemical and histochemical studies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 22, 21-28.

TAKEUCHI, K., 2012. Pathogenesis of NSAID induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World journal of gastroenterology*, 18, 2147-2160.

TAKEUCHI, K.; KATO, S.; AMAGASI, K., 2010. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *Journal of pharmacological sciences*, 114, 248-261.

TAKEUCHI, K.; KITA, K.; HAYASHI, S.; AIHARA, E., 2011. Regulatory mechanism of duodenal bicarbonate secretion: roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide. *Pharmacology and therapeutics*, 130, 59-70.

THANGARAJAH, H.; WONG, A.; CHOW, D.C., 2002. Gastric H-K-ATPase and acidresistant surface proteins. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal: Liver Physiology*, 282, 953–961.

TULASSAY, Z.; HERSZENYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection, 2010. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 24, 99–108.

UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; OYAMADA, H.; TANIGAWA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M., 1989. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 162, 55-58.

USTUN, O.; ELIK, B. O.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E., 2006. Flavonoids with anti- *Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 457–46.

WALLACE, J. L., 2001. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 15, 691-703.

WALLACE, J. L.; WHITTLE, B. J., 1986. Role of mucus in the repair of gastric epithelial damage in the rat. Inhibition of epithelial recovery by mucolytic agents. *Gastroenterology*, 91, 603-611.

WOLFE, M.M., SOLL, A.H., 1988. The physiology of gastric acid secretion. *N. Engl. J. Med.* 319,1707-1715.

YAMAJI N, YOKOO Y, IWASHITA T., 2007. Structural determination of two active compounds that bind to the muscarinic M-3 receptor in beer. *Alcoholism, Clinical Experimental Research*, 31, 9–14.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C., 2001. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. Química Nova, 24, 147-152.

