UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Mecanismos de atividade antiúlcera de *Phyllanthus tenellus* Roxb.
(Phyllanthaceae) e isolamento dos principais constituintes

Guilherme Carvalho Sobreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Mecanismos de atividade antiúlcera de *Phyllanthus tenellus* Roxb.
(Phyllanthaceae) e isolamento dos principais constituintes

Guilherme Carvalho Sobreira

Versão Original

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sobreira, Guilherme Carvalho
S677m Mecanismos de atividade antiúlcera de *Phyllanthus tenellus*
Roxb. (*Phyllanthaceae*) e isolamento dos principais constituintes /
Guilherme Carvalho Sobreira. -- São Paulo, 2016.
103p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo. Departamento Farmácia.
Orientador: Bacchi, Elfriede Marianne

1. Produtos naturais : Farmacognosia I. T. II. Bacchi, Elfriede
Marianne, orientador.

615.321 CDD

Guilherme Carvalho Sobreira

Mecanismos de atividade antiúlcera de *Phyllanthus tenellus* Roxb.
(Phyllanthaceae) e isolamento dos principais constituintes

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Manoel Luis e Helenice,
pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

A Deus por iluminar o meu caminho e confortar nos momentos difíceis.

À Profa. Doutora Elfriede Marianne Bacchi pelo acolhimento no seu laboratório e ter depositado a confiança em mim, mesmo durante nos momentos de distância, para a realização deste trabalho. Além disso, pela amizade, pela orientação, pelas soluções das dúvidas e contribuição para meu desenvolvimento intelectual.

Aos Professores Doutores Edna Tomiko Myiake Kato, Dominique Corinne Hermine Fischer, Paulo Chanel Deodato de Freitas e Gabriel Lima Barros de Araújo.

Ao Doutor Ílio Montanari Júnior, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp, por fazer a coleta do material vegetal utilizado.

À Doutora Ingrid Elida Collantes Díaz, pela atenção e elucidação da substância isolada neste trabalho.

À professora Doutora Silvia Berlanga de Moraes Barros e aos seus alunos, por ceder equipamento de seu laboratório para a realização de análises de quantificação.

À minha namorada Natália pelo carinho, sempre me apoiando nos momentos difíceis, compartilhando os momentos de alegria e descontração.

À minha querida irmã Flávia e o meu cunhado Cleber, pelos momentos de descontração e moradia, além de sua ajuda que foi fundamental neste trabalho.

À toda minha família pelo incentivo.

Aos meus amigos de Assis, Rodrigo Pedrão, Eduardo, Rodolfo, Germano, Bruno, Fernando, Luis Felipe e tantos outros pelos momentos de descontração, alegria e boas risadas.

Aos meus amigos do laboratório Leandro, Alberto e Alexandra pela amizade e contribuição durante o trabalho.

Ao técnico Roberto de Jesus Honório, pela amizade e prontidão durante os experimentos.

À Capes pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a concretização deste trabalho.

Muito Obrigado!

“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades”

Luis de Camões

Resumo

SOBREIRA, G.C. **Mecanismos de atividade antiúlcera de *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Phyllanthaceae) e isolamento dos principais constituintes.** 2016. 103.p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Tradicionalmente plantas medicinais são utilizadas pela população para a prevenção e tratamento da úlcera gástrica. A úlcera gástrica é uma patologia heterogênea de etiologia multifatorial, que acomete aproximadamente de 8 a 10% da população mundial. Entretanto, os tratamentos terapêuticos disponíveis são muito dispendiosos, possuem limitada eficácia e com vários efeitos colaterais. Extrato de folhas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. é utilizado pela população para o tratamento de problemas gástricos. Esta espécie está incluída na Relação Nacional de Plantas com Interesse ao SUS (ANVISA). Com a finalidade de investigar a atividade antiúlcera foram ensaiados dois modelos de lesões gástricas em animais. No modelo de indução por etanol acidificado, após administração do extrato bruto (extrato hidroetanólico 70% liofilizado) de *P. tenellus*, verificou-se redução de 3.44% e 4.25% da área de lesão gástrica nas doses 200mg/kg e 400mg/kg, porém não houve diferença significativa entre os resultados. Já no ensaio, utilizando extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa, nas doses de 200mg/kg, assim como no ensaio anterior, verificou-se redução da área de lesão gástrica de 0.7%, 1.1% e 0.7% respectivamente, porém não houve diferença significativa entre controle e tratado. No teste, utilizando a fração acetato de etila das folhas de *P. tenellus* (Phyllanthaceae), houve redução de 9,46 e 22,80% das lesões gástricas nas doses de 100mg/kg e 400mg/kg, porém não houve diferença significativa. No modelo de úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com etoricoxibe, indometacina e L-NAME, verificou-se uma tendência de redução da lesão gástrica, porém não houve diferença significativa. Já no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com NEM, houve diminuição das lesões gástricas em 90% no grupo Salina+FA ($p<0,05$), comparando-o com o grupo NEM+FA. Em modelo de úlcera subaguda induzida por ácido acético, após 7 dias de tratamento com o extrato hidroetanólico de *P. tenellus* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, houve redução significativa nas lesões gástricas em 60% na dose de 100 mg/kg ($p<0.01$), 47% na dose de 200 mg/kg ($p<0,01$) e 69% na dose de 400 mg/kg ($p<0,001$). Realizando avaliação histológica, foi verificado aumento regenerativo do epitélio da mucosa e reparação com cicatrização da lamina própria da mucosa com proliferação fibroblástica e neoformação de vasos sanguíneos, e grande deposição de colágeno, evidenciando que o processo de cicatrização e regeneração está ocorrendo após o tratamento com o extrato hidroetanólico a 70% de *P. tenellus*. Paralelamente aos estudos farmacológicos, foi determinado o perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato hidroetanólico e frações (clorofórmica, acetato de etila e aquosa). No ensaio de quantificação de flavonoides e de compostos fenólicos foi observado que a fração acetato de etila possui maior concentração de substâncias fenólicas, incluindo flavonoides, seguida do extrato bruto e por último, pela fração aquosa. No experimento de determinação de capacidade antiradicalar observou-se que a fração acetato de etila ($CE_{50}=13,09 \mu\text{g/ml}$) apresentou uma melhor capacidade de redução do radical DPPH, seguida do extrato hidroetanólico ($CE_{50}=19,86 \mu\text{g/ml}$) e fração aquosa ($CE_{50}=45,76 \mu\text{g/ml}$). Estes resultados estão em consonância com a gastroproteção observada no experimento de atividade antiulcera, sugerindo uma possível relação do flavonoide, di-hidromiricetina presente no extrato, com a atividade gastroprotetora e com a facilitação da cicatrização das úlceras gástricas.

Palavras Chave: *Phyllanthus tenellus*, úlcera gástrica, perfil cromatográfico.

Abstract

SOBREIRA, G.C. **Antiulcer activity from mechanism of *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Phyllanthaceae) and isolation of the major constituents.** 2016. 103.p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Traditionally medicinal plants have been used to prevent and to treat gastric ulcer. Gastric ulcer is a heterogeneous disease of multifactorial etiology, which affects about 8-10% people in the world. However, these pharmaceutical products are not completely effective and produce many adverse effects. Extracts of leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. is often used for treating gastric disease by the population. This species is included in RENISUS. In order to investigate antiulcer activity, for this were realized two distinct ulcer models in rats. In acidified ethanol model, the crude extract (hydroethanol extract 70% lyophilized) from leaves of *P. tenellus* showed a reduction for 3.44% and 4.25% from gastric lesion area at the dose 200mg/kg and 400mg/kg, however there was not difference significant between the results. The assay using hydroethanol extract, ethyl acetate fraction and aqueous fraction at the dose 200mg/kg as in the previous test showed a reduction from gastric lesion area respectively in 0.7%, 1.1% and 0.7% however there was not significant difference between control and treated. The assay using ethyl acetate fraction from the leaves *P. tenellus* (Phyllanthaceae), showed a reduction in 9,46% and 22,80% of gastric lesion area at the dose 100mg/kg and 400mg/kg however there was not significant difference. In gastric ulcer model induced by acidified ethanol in pre-treated animals in ethoricoxib, indomethacin and L-NAME, showed a tendency of reduction from gastric lesion area however there was not significant difference. In gastric ulcer model induced by acidified ethanol in pre-treated animals with NEM showed a reduction from gastric lesion in 90% in the group Salina+FA ($p<0,05$), comparing with the group NEM+FA. In subacute ulcer model induced by acid acetic, after 7 days of treatment with hydroethanol extract of *P. tenellus* at the dose 100, 200 and 400 mg/kg showed significant reduction from gastric lesion in 60% at the dose 100 mg/kg ($p<0.01$), 47% at the dose 200 mg/kg ($p<0,01$) and 69% at the dose 400 mg/kg ($p<0,001$). With histological evaluation it was possible to see regenerative increased of the mucosal epithelium and reparation with healing mucosal lamina propria with fibroblast proliferation and blood vessels neoformation, and large collagen deposition showing healing process and regeneration occurring after treatment hydroethanol extract 70% of *P. tenellus*. At the same time the pharmacological studies it was made the chromatographic profile by Thin Layer Chromatography (TLC), hydroethanol extract and fractions (chloroform, ethyl acetate and aqueous). The assay of quantitation of flavonoids and phenolic compounds it was observed that the ethyl acetate fraction has a higher concentration of phenolic substances including flavonoides, then the crude extract and lastly the aqueous fraction. In the experiment to determine antiradical capacity it was noted that the ethyl acetate fraction ($CE_{50}=13,09 \mu\text{g/ml}$) showed a better radical DPPH reduction capacity, followed by hydroethanol extract ($CE_{50}=19,86 \mu\text{g/ml}$) and aqueous fraction ($CE_{50}=45,76 \mu\text{g/ml}$). These results are in line with the gastroprotection observed in gastric ulcer experiment, suggesting a possible relation of the flavonoid, di - hidromiricetina present in the extract, with the gastroprotective activity and facilitating healing of gastric ulcers.

Keywords: *Phyllanthus tenellus*, gastric ulcer, chromatographic profile

Lista de Figuras

Figura 1. Folhas (1) e exsicata (2) de <i>Phyllanthus tenellus</i>	25
Figura 2. Divisões anatômicas do estômago.	33
Figura 3. Partes aéreas de <i>Phyllanthus tenellus</i>	40
Figura 4. Preparação do extrato hidroetanólico de <i>Phyllanthus tenellus</i> e seu fracionamento.	42
Figura 5. Reação de complexação de flavonoides com cloreto de alumínio.....	44
Figura 6. Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	45
Figura 7. Esquema de ensaio de atividade antiúlcera aguda do extrato hidroetanólico e frações de <i>Phyllanthus tenellus</i>	48
Figura 8. Esquema do ensaio de atividade antiúlcera subaguda do extrato hidroetanólico de <i>Phyllanthus tenellus</i>	52
Figura 9. Cromatoplaça do extrato hidroetanólico e frações das partes aéreas de <i>P. tenellus</i> . 1. Rutina; 2. Quercetina; 3. Extrato hidroetanólico; 4. Fração acetato de etila; 5. Fração aquosa; 6. Fração clorofórmica. Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H ₂ O (100:11:11:26). Revelação com NP. Distância percorrida pela FM 15 cm. Visualização sob luz UV 366 nm.....	56
Figura 10. Cromatograma da fração de etila (1mg/mL) de <i>P. tenellus</i> . Equipamento Shimadzu com bombas LC-20 ^a , loop de 20µl, detector PDA (Photodiode Array), fluxo de 1mL/min e coluna Thermo Scientific® C18ODS Hypersil de 250mm x 4.6mm, tamanho de partícula de 5µm. Gradiente de ACN em H ₂ O + TFA a 0,1%, 5-100% em 60 min. Cromatograma DAD (λ=254nm) da fração de acetato de etila de <i>P. tenellus</i> , com dihidromiricetina.	57
Figura 11. Cromatograma de íons no modo positivo da fração de etila (1mg/mL) de <i>P. tenellus</i> . Equipamento Shimadzu com bombas LC-20 ^a , loop de 20µl, detector PDA (Photodiode Array), fluxo de 1mL/min e coluna Thermo Scientific® C18ODS Hypersil de 250mm x 4.6mm, tamanho de partícula de 5µm. Gradiente de ACN em H ₂ O + TFA a 0,1%, 5-100% em 60 min.	57
Figura 12. Espectro de Massa. Equipamento Esquire 3000 plus. Capilaridade: 4000V. Nebulizador: 27 psi. Dry Gas: 9 l/min. Dry Temperature: 300 °C. Espectro no modo positivo MS ² de [M+H] ⁺ m/z 321,3 em 19.3 min (fragmentos de di-hidromiricetina). Espectro ESI ⁺ de di-hidromiricetina em 19.3-19.9 min.....	58
Figura 13. Espectro de Massa. Equipamento Esquire 3000 plus. Capilaridade: 4000V. Nebulizador: 27 psi. Dry Gas: 9 l/min. Dry Temperature: 300 °C. Espectro no modo positivo MS ² de [M+H] ⁺ m/z 321,3 em 19.3 min (fragmentos de di-hidromiricetina). Espectro ESI ⁺ de di-hidromiricetina em 19.3-19.9 min.....	58

Figura 14: Estrutura química de (a) quercetina (b) di-hidromirecetina.....60

Figura 15. Curva de calibração da quercetina, utilizada para a quantificação de flavonoides totais contidos no extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *Phyllanthus tenellus*. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de $AlCl_3$ a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm. 61

Figura 16. Curva de calibração do ácido gálico utilizada para determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus*. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de $AlCl_3$ a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm. 62

Figura 17. Curva de calibração do Trolox utilizado como padrão externo para determinação da capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico e frações de *Phyllanthus tenellus*. Neste experimento foi utilizado como substância de referência o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®). Foram ensaiados o extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 μM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ C$). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm. 64

Figura 18. Curva Curva de calibração da porcentagem da redução do DPPH radical referente à concentração do padrão externo Trolox. Neste experimento foi utilizado como substância de referência o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm..... 64

Figura 19. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração do extrato hidroetanólico de *Phyllanthus tenellus*. Foi ensaiado o extrato hidroetanólico de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 μM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm..... 65

Figura 20. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração da fração acetato de etila de *Phyllanthus tenellus*. Foi ensaiado a fração acetato de etila de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 μM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ C$). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm 65

Figura 21. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração da fração aquosa de *Phyllanthus tenellus*. Foi ensaiado a fração aquosa de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 μM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente ($24,0 \pm$

2,0°C). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm.....66

Figura 22. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda de extrato hidroetanólico de *P. tenellus* em doses de 100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; ** p<0,01 em relação ao controle negativo (água). Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg 68

Figura 23. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda comparativa do extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus* na dosagem de 200mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; * P<0,05 em relação ao controle negativo (Água). Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg..... 69

Figura 24. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 100, 200 e 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; * P<0,05 em relação ao controle negativo (Água). Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg 70

Figura 25. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dose de 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com indometacina por via sub-cutânea (30 mg/Kg); n=7 para cada grupo. Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. FA: fração acetato de etila. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem indometacina, referentes do mesmo tratamento. Teste t. 72

Figura 26. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com etoricoxibe por via sub-cutânea (90 mg/Kg); n=7 para cada grupo. Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem etoricoxibe, referentes ao mesmo tratamento. Teste t. 73

Figura 27. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM) por via intraperitoneal (10 mg/Kg); n=7 para cada grupo; *p<0,05. Controle negativo (Salina+água). Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem N-etilmaleimida, referentes do mesmo tratamento. Teste t. 75

Figura 28. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME) por via intraperitoneal (70 mg/Kg); n=7 para cada grupo. Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem N-nitro-L-argininametilester, referentes do mesmo tratamento. Teste t. 77

Figura 29. Atividade antiúlcera subaguda do extrato hidroetanólico de *Phyllanthus tenellus* em diferentes doses em modelo de indução por ácido acético 100%; Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/Kg; n=5-8; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação ao controle negativo (água). ANOVA seguido de Teste Dunnett`s..... 79

Figura 30. Fotomicrografia de corte histológico de parede gástrica de rato, com lesão ulcerada experimentalmente induzida por ácido acético a 100%. Dois dias após a cirurgia, foi administrado por via oral (contenção manual) o volume de 10 mL/kg do extrato hidroetanólico nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg de *P. tenellus* em suspensão aquosa, durante 7 dias. Para os animais do grupo controle negativo foi administrada, por via oral, água destilada (1mL/100g de animal). O fármaco de referência utilizado foi o lansoprazol (30 mg/kg) administrado ao grupo controle positivo. Nesse período houve regeneração do epitélio da mucosa e reparação com cicatrização da lamina própria da mucosa com proliferação fibroblástica e neoformação (tecido de granulação. A) Área de lesão sem regeneração do epitélio da mucosa, indicado pela seta. B) Área de cicatrização, tecido de fibroblasto, vaso neoformado, indicado pela seta. C e D) Área de lesão com muito colágeno (cicatrização bem avançada), indicado pela seta. D) reparação com cicatrização da lamina própria da mucosa com proliferação fibroblástica e neoformação (tecido de granulação), indicado pela seta. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 2x (figura A), 4x (figura B). 79

Lista de tabelas

Tabela 1. Classes de substâncias, descritas para <i>Phyllanthus tenellus</i>	27
Tabela 2. Rendimento do extrato hidroetanólico de folhas de <i>Phyllanthus tenellus</i>	41
Tabela 3. Rendimento das frações preparadas a partir de 100g de extrato hidroetanólico de <i>Phyllanthus tenellus</i>	41
Tabela 4. Teor de flavonoides do extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa das partes aéreas de <i>Phyllanthus tenellus</i> , obtido por reação com $AlCl_3$ como agente complexante após leitura em espectrofotômetro. Os resultados de flavonoides totais estão expressos como média seguido do erro padrão em triplicata. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de $AlCl_3$ a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm.	61
Tabela 5. Teor de compostos fenólicos nos extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa das folhas de <i>Phyllanthus tenellus</i> utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP em triplicata. Conteúdo fenólico total expresso como média $\pm$ DP mg de ácido gálico/g de peso seco. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de $AlCl_3$ a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm.	62
Tabela 7. Concentração efetiva (CE_{50}) do extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de <i>Phyllanthus tenellus</i> obtida no ensaio de determinação de atividade antioxidante. Neste experimento foi utilizado como substância de referência o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®). Foram ensaiados o extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de <i>P. tenellus</i> na presença da solução de 100,0 μ M do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ C$). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm.....	66
Tabela 8. Média $\pm$ Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda do Extrato Hidroetanólico de <i>P. tenellus</i> na dosagem de 100, 200 e 400 mg/kg; n=7 para cada grupo; Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 μ g/kg, EH: Extrato Hidroetanólico. ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo (água).....	68
Tabela 9. Média $\pm$ Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda do Extrato Hidroetanólico, Fração Acetato de Etila e Fração Aquosa de <i>P. tenellus</i> na dosagem de 200 mg/kg; n=7 para cada grupo; Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 μ g/kg. EH: Extrato Hidroetanólico. FA: Fração Acetato de Etila. Faq: Fração Aquosa. Clo: Cloprostenol.....	69
Tabela 10. Média $\pm$ Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de <i>P. tenellus</i> na dosagem de 100, 200 e 400 mg/kg; =7	

para cada grupo; Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. FA: Fração Acetato de Etila. Clo: Cloprostenol..... 70

Tabela 11. Média ± Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com indometacina (**Indo+Clo:** Indometacina+Cloprostenol. **Indo+FA:** Indometacina+Fração Acetato de Etila. **Indo+Água:** Indometacina+Água. **Salina+Clo:** Salina+Cloprostenol. **Salina+FA:** Salina+Fração acetato de Etila) 72

Tabela 12. Média ± Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com etoricoxibe (**Etori+Clo:** Etoricoxibe+Cloprostenol. **Etori+FA:** Etoricoxibe +Fração Acetato de Etila. **Etori+Água:** Etoricoxibe +Água. **Salina+Clo:** Salina+Cloprostenol. **Salina+FA:** Salina+Fração acetato de Etila) 73

Tabela 13. Média ± Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-etilmaleimida (**NEM+Clo** N-etilmaleimida +Cloprostenol. **NEM+FA:** N-etilmaleimida+Fração Acetato de Etila. **NEM+Água:** N-etilmaleimida+Água. **Sal+Clo:** Salina+Cloprostenol. **Sal+FA:** Salina+Fração acetato de Etila. **Sal+Água:** Salina+Água); n=7 para cada grupo; Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem N-etilmaleimida, referentes do mesmo tratamento. 75

Tabela 14. Média ± Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-nitro-L-arginina metilester (**L-NA+Clo:** N-nitro-L-argininametiléster+Cloprostenol. **L-NA+FA:** N-nitro-L-argininametiléster +Fração Acetato de Etila. **L-NA+Água:** N-nitro-L-argininametiléster+Água. **Sal+Clo:** Salina+Cloprostenol. **Sal+FA:** Salina+Fração acetato de Etila) 77

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

AlCl₃: Cloreto de alumínio

AINES: Anti-inflamatórios não esteroidais

CCD: Cromatografia em camada delgada

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

COX: Ciclooxygenase

COX-1: Ciclooxygenase-1

COX-2: Ciclooxygenase-2

DPPH: 2,2'-difenil-1-picril-hidrazila

DL₅₀: Dose letal 50%

EM: Espectro de massa

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

L-NAME: N-nitro-L-arginina metilester

NEM: N-etilmaleimida

NO: óxido nítrico

NOs: óxido nítrico sintase

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PG: Prostaglandina

ROS: Espécie reativas de oxigênio

t-BH: Toxina botulínica

TGF-β: Fator de crescimento beta

TGI: Trato gastrointestinal

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta-visível

Sumário

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	21
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Phyllanthus tenellus.....	23
2.1.1 Composição Química	26
2.1.1.2 Flavonoides e Compostos Fenólicos	27
2.1.2 Principais Investigações Farmacológicas e <i>in vitro</i>	28
2.2 Noção sobre fisiologia da secreção gástrica	32
2.2.1 O estômago.....	32
2.2.2 Úlceras Pépticas.....	33
2.2.3 O processo de cicatrização.	34
2.2.4 Terapêutica da úlcera péptica	35
3.OBJETIVOS	38
4.MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Coleta do material vegetal.	40
4.2 Elaboração do Extrato hidroetanólico e Fracionamento.....	40
4.3 Determinação do perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico e frações de <i>P. tenellus</i>	42
4.3.1Cromatografia em Camada Delgada.....	42
4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
4.3.3 Identificação de compostos.	43
4.4 Quantificação de flavonoides.	43
4.5 Quantificação de substâncias fenólicas.	44
4.6 Determinação da capacidade antioxidante	45
4.7 Ensaio biológicos.	46
4.7.1 Animais.....	46
4.7.2 Atividade Antiúlcera Aguda-Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico.....	47

4.7.3 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com indometacina.....	48
4.7.4 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com etoricoxibe.	49
4.7.5 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-etillmaleimida (NEM).	49
4.7.6 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME)	50
4.7.7Atividade Antiúlcera Subaguda – Modelo de indução por Ácido Acético.	51
4.7.8 Análise Histológica	52
5. Forma de Análise de Resultados	53
6. Resultados e Discussão	55
7. Conclusão	84
8. Referências Bibliográficas	86

INTRODUÇÃO
e
JUSTIFICATIVA

1. Introdução e Justificativa

O uso de plantas medicinais, com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, faz parte da história do homem (GOSSEL-WILLIAMS; SIMON; WEST, 2006; MUTHU et al., 2006). As plantas medicinais são popularmente conhecidas pela sua eficácia, segurança, qualidade e baixos efeitos colaterais comparado com os medicamentos sintéticos (SEMWAL; SEMWAL, 2013). Sua importância e aplicação industrial estão aumentando mundialmente, inclusive no Brasil (MIRUNALINI; ANATHAN; KRISHNAVENI, 2012).

Atualmente as plantas medicinais são amplamente utilizadas em diversos países. Segundo o trabalho realizado por Robinson e Zhang, (2011), cerca de 70% a 95% da população que vive em países em desenvolvimento especialmente na Ásia, África, América Latina e Oriente Médio utiliza a planta medicinal (na maioria, preparações à base de plantas medicinais) para a manutenção da saúde e também para algum aspecto de cuidados básicos primários. Em alguns países industrializados, por exemplo, Canadá, França, Alemanha e Itália, o uso de tal prática é igualmente significativo, pois entre 70% a 90% da população a utiliza com o título de “complementar”, “alternativo” ou “não-convencional”.

Atualmente existem diversas plantas medicinais apresentam ação antiulcera. Em um trabalho recente, YESILAD et al. (2014), realizaram um estudo da ação antiulcera do extrato aquoso e metanólico de partes aéreas de *Sumbuculos ebulus*, pelo modelo de úlcera induzida por stress, em ratos imobilizados. A fração aquosa desta espécie vegetal demonstrou uma atividade dose dependente, reduzindo em até 73% da área ulcerada.

A úlcera péptica é conhecida como uma lesão gástrica ou na mucosa duodenal. É frequentemente uma doença crônica que pode persistir por 10-20 anos, caracterizada por repetições nos episódios de cicatrização e irritação. A moléstia afeta uma grande parte da população mundial e é induzida por graves fatores incluindo *stress*, cigarro, deficiência nutricional e ingestão de medicamentos AINES (anti-inflamatórios não esteroidais) (DEVI et al., 2011). Estes agentes têm sido relacionados com a patogenia da úlcera gástrica, incluindo também o aumento do ácido gástrico, aumento da secreção de pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo gástrico, diminuição da motilidade gástrica e inibição da síntese de prostaglandinas (SILAMBUJANAKI et al., 2010).

Diversos fármacos estão disponíveis no mercado, sendo os mais utilizados os antagonistas dos receptores de H_2 e os bloqueadores da bomba de prótons

(HEMAMALINI et al., 2012). No entanto, efeitos adversos são relatados. Devido a isso, constante pesquisa é realizada para encontrar uma nova medicação mais eficaz para o combate de úlceras gástricas (SANKAR; MURUGAN; SIVAKUMAR, 2013).

Phyllanthus tenellus é uma espécie muito utilizada na medicina popular brasileira e em outras partes do mundo como Caribe e Ásia (CALIXTO, 1998). No Brasil ela está incluída na Relação Nacional de Plantas com Interesse ao SUS (BRASIL, 2013). Dessa maneira, este estudo visa contribuir para o encontro de uma nova terapêutica mais efetiva e segura para o tratamento de úlceras gástricas, por meio da investigação da espécie vegetal *P. tenellus*. Para isso, foram avaliadas a atividade antiúlcera aguda e subaguda bem como realizados o isolamento e a identificação de compostos, para assim sugerir uma possível relação destes com a referida atividade farmacológica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica

2.1 *Phyllanthus tenellus*

Phyllanthus tenellus é uma planta herbácea, glabra, com até 60 cm de altura, caules simples ou ramificados, sendo os principais delgados e sem folha, com ramos laterais portando folhas. As folhas são alternas, simples, membranáceas, elípticas de margem lisa, lâminas discolores, face adaxial cor verde e face abaxial verde-pálido. Em secção transversal, o caule em desenvolvimento secundário exibe epiderme uniestratificada com estômatos. O clorênquima é formado por duas ou quatro camadas de células isodiamétricas. Mais internamente, ocorrem uma ou mais camadas de parênquima cortical, cujas células podem conter grãos de amido. Cristais de oxalato de cálcio estão presentes tanto no floema quanto no parênquima cortical e no clorênquima. O floema é formado por pequeno número de células, e o sistema vascular é do tipo colateral formado por três a seis raios (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

<http://theplantlist.org/> acesso em: 26 agos. 2015.

<http://theplantlist.org/> acesso em: 26 agos. 2015.

Figura 1. Folhas (1) e exsicata (2) de *Phyllanthus tenellus*.

A espécie *Phyllanthus tenellus* Roxb. pertence ao gênero *Phyllanthus*. Este gênero está amplamente distribuído, em torno de todas as regiões da África, Ásia, América, Austrália e Europa contém cerca de 700 espécies, muito utilizadas na medicina tradicional (NARASIMHUDU; RAJU, 2012, SPRENGER; CASS, 2013). Antigamente, este gênero se enquadrava na família *Euphorbiaceae*. Porém, por meio de técnicas moleculares, como o sequenciamento do DNA nuclear e cloroplasto em conjunto com as características morfológicas, foi reconhecido como pertencente à família *Phyllanthaceae*.

A espécie *P. tenellus* possui como sinonímia *P. tenellus* var. *arabicus* (Müll. Arg.), *P. tenellus* var. *garipenses* (Müll. Arg.), *P. tenellus* var. *nossibeensis* (Müll. Arg.), *P. tenellus* var. *roxburghii* (Müll. Arg.), *P. tenellus* var. *tenellus* (THE PLANT LIST, 2015). São coloquialmente chamadas de “quebra-pedra”. Este gênero compreende aproximadamente 550 a 750 espécies distribuídas nos países das regiões subtropicais e tropicais. Cerca de 200 espécies são encontradas nas Américas, principalmente no Caribe e Brasil. As espécies vegetais do gênero *Phyllanthus*, têm sido muito utilizadas na medicina popular. O interesse de plantas do gênero *Phyllanthus* aumentou consideravelmente, devido ao seu potencial terapêutico em relação a diversas doenças, incluindo tratamento de distúrbios no sistema urinário, infecções intestinais, diabetes e Hepatite B (CALIXTO, 1998).

2.1.1 Composição Química

Em triagens fitoquímicas foram identificadas diversas classes de substâncias, listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Classes de substâncias, descritas para *Phyllanthus tenellus*.

Classe Química	Autores
Compostos Fenólicos	Farmacopeia Brasileira, 5.ed.
Taninos	CALIXTO, 1998
Flavonoides	VICTÓRIO et al., 2010 HUANG et al.; 2003
Glicosídeos Antraquinônicos	SPRENGER; CASS, 2013 NARASUMHUDU; RAJU, 2012
Alcaloides	SPRENGER; CASS, 2013
Antocianinas	NARASUMHUDU; RAJU, 2012
Saponinas	NARASUMHUDU; RAJU, 2012
Lignanas	HUANG et al.; 2003

As lignanas são metabólitos secundários que estão amplamente distribuídos no reino vegetal, muitas vezes são utilizadas na medicina popular em muitos países (LEE et al., 1999; GOTTLIEB, 1991; SHEN et al., 1985; CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995; JUNG et al., 1998). Dados da literatura indicam que a maioria das plantas que exibem derivados de lignanas possui importantes ações farmacológicas como anti-inflamatória, antitumoral, anti-aterosclerótica (GOTTLIEB, 1991; MACRAE e TOWERS, 1984). Na fração hexano de *P. amarus* foram encontradas algumas lignanas isoladas tais como phyltetralina, nirtetralina, nirantina que exibem importantes efeitos anti-inflamatórios *in vivo* (quando administrado localmente) e *in vitro* (RAPHAEL e KUTTAN, 2003; KIEMER et al, 2003; KASSUYA et al, 2003, 2005).

2.1.1.2 Flavonoides e Compostos fenólicos

Os produtos naturais têm mostrado muitos efeitos benéficos quando utilizados de forma adequada (SOUSA et al., 2005). O valor terapêutico de *P. tenellus* surge a partir dos seus compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonoides (HUANG et al., 2003). Alguns flavonoides têm demonstrado significativa atividade antiúlcera (VICTORIO et al., 2011).

Estes metabólitos secundários estão distribuídos no reino vegetal e fazem parte da dieta de seres humanos e animais (GONZÁLEZ et al., 2002; MOTA et al., 2009; SIMÕES et al., 2007 PROENÇA DA CUNHA, 2005). Estão presentes em todos os órgãos da planta, desde raízes até frutos e flores. Podem ocorrer de forma livre (aglicona) ou ligada em açúcares (glicosídeos) (SIMÕES et al., 2007). Os flavonoides possuem atividade antioxidante, hepatoprotetora (HARISH; SHIVANANDAPPA; 2006), atividade anti-inflamatória (KASSUYA et al., 2006), analgésica (SANTOS et al., 2012), atividade contra vírus da hepatite B (HUANG et al., 2003).

Apesar de os flavonoides serem largamente utilizados e vários estudos sugerirem promissoras atividades farmacológicas, os mecanismos de absorção digestiva e de biodisponibilidade não estão completamente elucidados (PROENÇA DA CUNHA, 2005). Os flavonoides são absorvidos por via oral, sofrem metabolismo de primeira passagem, reduzindo assim a sua biodisponibilidade. Enzimas bacterianas podem quebrar as moléculas dos flavonoides, influenciando assim a sua absorção (PROENÇA DA CUNHA, 2005; GONZÁLEZ et al., 2011).

Apesar de os flavonoides serem largamente utilizados e vários estudos sugerirem promissoras atividades farmacológicas, os mecanismos de absorção digestiva e de biodisponibilidade não estão completamente elucidados (ERLUND et al., 2000; PROENÇA DA CUNHA, 2005). Sabe-se que os flavonoides são absorvidos por via oral e transportados pela albumina plasmática, sofrem metabolismo de primeira de passagem, reduzindo assim a sua biodisponibilidade. Enzimas bacterianas podem também quebrar as moléculas de flavonoides influenciando sua absorção (GONZÁLES et al., 2011, PROENÇA-CUNHA, 2005).

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e plantas não comestíveis, e foram referidos como tendo múltiplos efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é

devida às suas propriedades redox, que pode desempenhar um importante papel na adsorção e neutralização dos radicais livres (OSAWA, 1994).

Polifenóis pertencem a uma classe heterogênea de compostos que possui como característica eliminar radicais livres, ou seja, efeito antioxidante (SINGH; MURTHY; JAYAPRAKASHA, 2002; WANASUNDARA; SHAHIDI, 1996; YUTING et al., 1990). Segundo Kumaran e Karunakaran (2007) compostos fenólicos do extrato metanólico de *Phyllanthus* constituem um dos principais grupos de compostos que atuam como antioxidantes ou terminadores de radicais livres, sendo que os flavonoides são os principais compostos fenólicos naturais.

Nascimento et al. 2008, estudaram as espécies *P. tenellus*, *P. niruri* e *P. amarus* e demonstraram a presença de taninos, terpenoides e saponinas, sendo que as três espécies estudadas apresentaram perfis semelhantes para algumas classes de metabólitos.

2.1.2 Principais investigações farmacológicas e *in vitro*

Nesta seção serão relatadas as principais atividades farmacológicas e *in vitro* encontradas na literatura sobre o gênero *Phyllanthus*.

Atividade Hepatoprotetora

A atividade hepatoprotetora dos extratos metanólicos e aquoso de espécies de *P. amarus* e *P. niruri*, foram avaliadas em células HepG2 tratadas na presença ou na ausência da toxina terc-butil hidroperóxido. HepG2 é uma cultura celular de hepatócito humano amplamente utilizada para estudos de citotoxicidade, metabolismo xenobiótico e estudos carcinogênicos (THABREW et al., 1997). Estas células apresentam como característica, semelhanças morfológicas e bioquímicas de um hepatócito normal incluindo síntese e secreção de proteínas plasmáticas (KNOWLES et al., 1980; THABREW et al., 1997; SOHN et al., 2005).

Em 2012, Srirama verificou que o extrato metanólico e aquoso das espécies *P. polyphyllus* e *P. virgatus* apresentaram atividade hepaprotetora na concentração de 50 ng/ml contra a toxina botulínica (t-BH) induzida em hepatócitos, enquanto que o extrato metanólico de *P. tenellus*, espécie de interesse nesse estudo, não apresentou atividade hepatoprotetora.

Atividade anti-inflamatória

Alguns estudos foram realizados com a finalidade de avaliar a atividade anti-inflamatória de *P. tenellus*, utilizando ensaio de citotoxicidade *in vitro* com tratamento dos extratos em macrófagos (IGNACIO et al., 2001).

Alguns trabalhos publicados avaliaram a atividade anti-inflamatória de diversos extratos de *P. tenellus*. Na maioria dos estudos o nível de óxido nítrico (NO) produzido em culturas de células tratados com extrato aquoso de *P. tenellus*, foi superior aos extratos acetônico e seco obtendo assim uma melhor capacidade anti-inflamatória (IGNACIO et al., 2000, CERVINI-SILVA et al., 2015).

O óxido nítrico desempenha um papel importante na modulação da integridade da mucosa gástrica contra hiperacidez ou exposição a ulcerações e na regulação da secreção de ácido (TARIQ et al., 2007), além de um papel duplo no processo inflamatório. O NO secretado em altos níveis ativa neutrófilos e macrófagos, que apresentam importantes efeitos citotóxicos na defesa contra células tumorais, fungos, protozoários parasitas, helmintos, micobactérias e vírus (CROEN, 1993, MACMICKING et al., 1997). Do outro lado, efeitos pró-inflamatórios do NO parecem ser mediados pela sua produção exacerbada e tem sido associado a uma variedade de doenças inflamatórias, incluindo arteriosclerose, hipertensão arterial e choque séptico (MONCADA et al., 1991). Segundo Ignácio (2001), os extratos seco, aquoso e acetônico de *P. tenellus* foram capazes de estimular a produção de NO em culturas de macrófagos, sugerindo um efeito direto sobre a ativação dessas células, concluindo que esta espécie vegetal possui efeito anti-inflamatório.

Atualmente têm ocorrido algumas abordagens importantes sobre a função anti-inflamatória promovida por plantas medicinais. Estas estão sendo extensivamente utilizadas contra os efeitos nocivos dos radicais livres sobre a saúde humana (CHOUHAN; SINGH, 2011). A inflamação é um fenômeno que envolve vários fatores em um sistema intrínseco sendo caracterizado por manifestação externa como vermelhidão e inchaço da pele (WINYARD; WILLOUGHBY, 2003). A biossíntese de prostaglandinas e produção de óxido nítrico têm sido implicados neste processo, sendo que o NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) um dos mediadores inflamatórios que desempenha importante papel da inflamação (AUTORE, 2001).

Atividade Antibacteriana e Citotóxica

O desenvolvimento de resistência à maioria de agentes antimicrobianos e o alto custo do tratamento consequente desta resistência trouxe a necessidade da pesquisa de novos compostos bioativos, seguros, eficazes e eficientes no controle de infecções (OKWU; NNANDI, 2009).

Em um trabalho recente realizado por Miranda et al. (2013) foi observada inibição do crescimento *in vitro* do micro-organismo *Staphylococcus aureus* na dose de 200 mg/ml e 500mg/ml de extrato aquoso e etanólico das folhas de *P. tenellus*. Oliveira et al. (2007) observaram a mesma atividade, entretanto, não foi verificada inibição para as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* para os extratos hexânico e acetato de etila de *P. tenellus*. A maior zona de inibição que o extrato promoveu foi contra *S. aureus* e este resultado indica o uso desta espécie na medicina tradicional contra infecções intestinais e urinárias.

As frações de *P. tenellus* foram avaliadas quanto a sua ação em bactérias responsáveis por colonizarem o trato respiratório. A fração etanólica apresentou uma atividade significativa contra *S. aureus*, porém a graduação alcoólica influencia na atividade do extrato, sendo que a graduação alcoólica de 0%, ou seja, extrato aquoso, não apresentou halo de inibição. À medida que aumentou a graduação alcoólica 60, 70 e 100%, resultados foram mais expressivos, este fato pode ser atribuído a uma menor polaridade dos composto(s) ativo(s) o que provavelmente tenha impedido a sua extração (MIRANDA et al., 2013). Em outro trabalho Amin et al. (2012) verificaram que a fração aquosa de *Phyllanthus niruri* apresentou atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (bactérias gram-positivas), enquanto que não houve nenhuma atividade observada contra *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (bactérias gram-negativas), já fração etanólica não apresentou atividade para nenhum micro-organismo.

Composição química

Em outro trabalho, de Sarg et al. (2012), alguns compostos ativos foram isolados da fração acetato de etila de folhas (compostos 1, 2, 3 e 4) e fração acetato de etila de caules e raízes (compostos 5 e 6) da espécie *P. atropurpureus*. Foram eles: di-(3,4,5- tri-hidroxi-phenil) éter (composto 1), 5,6,8,4-tetrahidroxi-isoflavona (composto

2), 6-(4-hidroxi-cinamoil) composto 3 conhecido como robustasida (MICHAEL e GLOMBITZA, 1995), sendo que este foi o primeiro composto isolado a partir do gênero *Phyllanthus* (KEUSGEN e GLOMBITZA, 1995), 6-(3,4-di-hidroxi-cinamoil) arbutina ou pode ser chamada de 3-hidroxi-robustasida (composto 4), 5,7,4-tri-hidroxi-6,8-dimetoxi-flavona (composto 5) e 5,3,4- flavonol trihidroxi-7-O-glucósido este composto foi identificado como quercetina-7-O-glucósido ou quercimeritrin (composto 6), sendo que este foi primeiro composto ativo a ser isolado do gênero *Phyllanthus*.

Outros usos

Poucos estudos farmacológicos e *in vitro* existem na literatura sobre a espécie *Phyllanthus tenellus*, porém existem diversos usos descritos na literatura sobre o gênero *Phyllanthus*, tais como: hidropisia, diabetes e icterícia (MEHTA; PATEL; JAIN, 2014), tratamento de cálculos renais e urinários, infecções intestinais e urinárias (GARCIA, 2004), litíase, reumatismo e hepatite B (OLIVEIRA et al., 2007).

2.2 Noções sobre fisiologia da secreção gástrica

2.2.1 O Estômago

O estômago possui três funções gerais: armazenamento, digestão e proteção (SILVERTHORN, 2010). No estômago existem quatro regiões identificadas: cárdia, fundo, piloro e corpo. As regiões do fundo e do corpo possuem estruturas microscópicas idênticas e, portanto, apenas três regiões são histologicamente consideradas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 2. Divisões anatômicas do estômago. Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.

O estômago secreta de 1 a 2 L de suco gástrico por dia. Entre os principais componentes presentes podemos destacar as células parietais, que secretam o ácido clorídrico, células do tipo enterocromafins (que secretam histamina), células D (que secretam somatostatina) e o pepsinogênio (produzido pelas células principais) que em pH ácido é convertido em pepsina (GUYTON, 2011; SCHUBERT; PEURA, 2008). Há também o muco, que junto com o bicarbonato (secretados pelas células superficiais) formam uma barreira protetora para as células da mucosa gástrica contra a ação digestiva do suco gástrico (HERNANDES, 2011).

2.2.2 Úlceras Pépticas

A úlcera péptica representa uma das mais importantes doenças do sistema digestório (BUCCIARELLI, et al., 2010). A úlcera péptica é conhecida como uma lesão gástrica ou na mucosa duodenal. As formas mais prevalentes de úlceras pépticas são as duodenais e requerem uma estratégia terapêutica bem orientada (VASUDEVA et al., 2012). É caracterizada frequentemente por uma lesão crônica, geralmente aparece isolada com menos de 4 cm de diâmetro, e embora possam ocorrer em qualquer porção do trato gastrointestinal, a grande maioria se localiza no duodeno e estômago; pode persistir por 10-20 anos, caracterizada por repetições nos episódios de cicatrização e irritação (DEVI et al., 2011).

As úlceras são consideradas histologicamente descontínuas e consistem em duas grandes estruturas: a margem da úlcera formada pela mucosa não necrosada (componente epitelial) e o tecido de granulação na base da úlcera (componente do

tecido conectivo) que consiste em macrófagos, fibroblastos e a ocorrência de proliferação de células endoteliais formando microvasos (TARNAWSKI, 2005, 2010).

A patogênese das úlceras pépticas vem sendo estudada por muitos anos. Estudos anteriores sugerem que úlcera péptica surge devido a um desequilíbrio entre fatores agressivos como ácido e pepsina, e fatores defensivos, como muco (barreira protetora) (AEBI, 1984). Danos da mucosa do estômago ocorrem devido à geração excessiva de oxigênio ativo exógeno e endógeno e de radicais livres. Algumas das principais causas de úlceras gástricas incluem uso crônico de bebidas alcoólicas e fármacos anti-inflamatórios, bem como o estresse e infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (BAROCELLI et al., 1997).

A infecção por *H. pylori* pode desencadear o aparecimento de lesões. *H. pylori* está presente em praticamente todos os pacientes com úlcera duodenal e em aproximadamente 70% daqueles com úlceras gástricas, revelando assim a forte associação de sua presença com a formação de úlceras (MALFERTHEINER; CHAN; McCOLL, 2009, KUMAR et al., 2005). Outros fatores como anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), estresse psicológico, consumo abusivo de álcool e cigarro podem desencadear e agravar as úlceras gástricas (KUMAR et al., 2005).

2.2.3 O processo de cicatrização

A cicatrização de feridas é caracterizada em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstrução do tecido (MANDELBAUM et al., 2003). Tal evento é dividido em três fases: fase inflamatória, fase proliferativa e a fase de maturação. Estas fases se sobrepõem, mas não se excluem e tem a finalidade de repor o tecido lesado (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A fase inflamatória ocorre na maioria das formas de lesão a que os organismos vivos estão sujeitos, sendo evidenciada pelos seus sinais clássicos como dor, calor, rubor e edema, podendo ocorrer perda da função. Suas características principais são alterações vasculares (vasodilatação e permeabilidade aumentada) e a migração de mediadores químicos, leucócitos, neutrófilos (MANDELBAUM, 2003, BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A diapedese de neutrófilos para tecidos lesados é um fenômeno precoce do processo de reparo. Ocorre quase de imediato após sinalização dos neutrófilos retidos

pelo coágulo, macrófagos residentes e células estromais. Além disso, com a formação de tecidos devido a produção de fatores de crescimento e citocinas, como por exemplo a IL-1(interleucina-1). Os macrófagos derivados de monócitos têm participação mais relevante na inflamação e reparo tissular e na produção e liberação local de diversos fatores de crescimento e citocinas, cruciais na maturação da reação inflamatória e na iniciação do processo de cura da ferida (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A fase proliferativa tem início pela formação de tecido de granulação no espaço do ferimento e de deposição de matriz extracelular ocorrendo por volta do quarto dia após a lesão. Muitos fatores de crescimento estão envolvidos neste processo, incluindo o fator de crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), sendo que estes últimos possuem papel importante intensificando a migração e ativação de fibroblastos para a produção de colágeno local (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). A etapa final é conhecida como fase de remodelamento, sendo que a característica mais marcante desta fase é a grande e acelerada deposição de colágeno na região da ferida e iniciação do processo de cura, que envolvem etapas produção, digestão e orientação de fibras colágenas. Nesta fase, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (MANDELBAUM, 2003, BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

2.2.4 Terapêutica da úlcera péptica

Os principais fatores que levam à formação das úlceras no trato gastrointestinal (TGI) envolvem o desequilíbrio dos fatores que causam dano na mucosa (como ácido e pepsina) e os agentes protetores (muco e bicarbonato), além da infecção por *H. pylori* (RANG et al., 2011).

Vários fármacos sintéticos estão comercialmente disponíveis para o tratamento de úlcera péptica, mas eles são de alto custo e muitos deles estão associados com efeitos secundários, quando utilizados por longo prazo (BANDYOPADHYAY et al., 2002; DEVAULT e TALLEY, 2009; WALDUM et al., 2005).

Existem várias classes de medicamentos com diferentes mecanismos de proteção da mucosa (citoprotetores). Os mais utilizados pela população são os inibidores de bomba de prótons, seguidos dos antagonistas de receptores de H₂ (GOODMAN; GILMAN, 2007).

Todos os inibidores da bomba de prótons são pró-fármacos e necessitam de ativação em ambiente ácido, pois inibem irreversivelmente a bomba H^+/K^+ ATPase. Os fármacos dessa classe entram na célula parietal a partir do sangue e acumulam-se nos canalículos secretores ácidos onde são ativados. A classe de inibidores de prótons é representada pelos fármacos omeprazol, lansoprazol, esomeprazol, pantoprazol e rabeprazol (RANG et al., 2011, JAIN et al., 2007). Os antagonistas de receptores de H_2 , cimetidina, ranitidina, nizatidina e famotidina, inibem a secreção ácida por competir com a histamina pelos receptores de H_2 , sendo rapidamente absorvidos pelo estômago (KATZUNG, 2006; RANG et al., 2011).

Os sais de alumínio e de magnésio, popularmente conhecidos como antiácidos, apresentam a capacidade de diminuir ou aumentar a taxa de absorção e/ou a quantidade absorvida, devido à neutralização do suco gástrico, sendo considerados adjuvantes no tratamento das úlceras, enquanto que os citoprotetores protegem a mucosa gástrica ou proporcionam uma barreira física sobre a superfície da úlcera (RANG et al., 2011).

Quando o desenvolvimento das úlceras pépticas está relacionado com a presença da bactéria *H. pylori* é necessário associar antimicrobianos com antagonistas de receptores de H_2 ou inibidores de bomba de prótons (terapia tripla). Geralmente utilizam-se associações com três fármacos, amoxicilina/ omeprazol/ metronidazol, omeprazol/ claritromicina/ amoxicilina ou tetraciclina, tetraciclina/ metronidazol/ composto de bismuto (MÖSSER; CACA, 2005).

Os antagonistas de receptores de H_2 e inibidores de bomba de prótons são geralmente bem tolerados pelos pacientes, porém o tratamento prolongado pode ocasionar alguns efeitos indesejáveis como dor de cabeça, dor abdominal, náusea, diarreia, além de induzir hiperplasia nas células gástricas, que pode conduzir a reincidência da úlcera e indução de câncer gástrico (RANG et al., 2011, BABU et al., 2010, KESZTHELYI et al., 2010). A espécie vegetal *P. tenellus* pode ser uma alternativa no tratamento de úlceras gástricas, pois tem a vantagem de possuir diversos metabólitos secundários entre eles, compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonoides, já que estes compostos têm mostrado atividade antiúlcera (HUANG et al., 2003, BORRELI; IZZO, 2000, SANNOMIYA et al., 2005, ZAYACHKIVSKA et al., 2005). Dessa maneira, este estudo visa contribuir para o encontro de uma nova terapêutica mais efetiva para o tratamento de úlceras gástricas, através da investigação da espécie vegetal *P. tenellus*, utilizada popularmente para problemas digestivos.

OBJETIVOS

3. Objetivos

O presente estudo visa comprovar a atividade antiúlcera de partes aéreas de *P. tenellus*, através de seu estudo fitoquímico e farmacológico.

São objetivos específicos:

- Realizar a triagem fitoquímica do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *P. tenellus* e de suas frações acetato de etila e fração aquosa;
- Determinar o perfil cromatográfico em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato e suas frações;
- Isolar e identificar substâncias, visando a um marcador;
- Quantificar flavonoides do extrato hidroetanólico e das frações;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico e das frações;
- Avaliar a atividade antiúlcera aguda do extrato hidroetanólico e das frações;
- Avaliar a atividade antiúlcera subaguda de extrato hidroetanólico;
- Avaliar os mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora da amostra mais ativa, através do envolvimento de NO, grupamentos sulfidrila, COX-1 e COX-2.

MATERIAIS e MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1 Coleta do Material Vegetal

O material vegetal, composto pelas partes aéreas de *P. tenellus* Roxb. (Phyllanthaceae), foi fornecido pelo Dr. Ílio Montanari Júnior do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP). A coleta foi realizada em março de 2014. Exsicata de *P. tenellus* foi depositada no herbário CPMA (Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas), localizado no CPQBA-UNICAMP, sob os números 55, 343 e 478 (diferentes locais de coleta, sendo todos no CPQBA).

<http://www.cpqba.unicamp.br/> acesso em: 26 agos. 2015.

Figura 3. Partes aéreas de *Phyllanthus tenellus*.

4.2 Elaboração do Extrato hidroetanólico e Fracionamento

As partes aéreas de *P. tenellus* (Phyllanthaceae) foram secas em estufa de circulação de ar, à temperatura de 40°C. Após a secagem, as partes aéreas foram pulverizadas em moinho de facas e martelos e posteriormente passadas por tamis de 1mm.

O extrato hidroetanólico a 70% foi elaborado por percolação. No processo de percolação foram empregados 3kg de droga pulverizada, sendo o processo realizado na velocidade de 80 gotas/minuto, adicionando mais líquido extrator, até esgotamento total da droga, resultando em 28 litros de extrato hidroetanólico. O procedimento foi adaptado da Farmacopéia Brasileira (1959). O extrato foi concentrado à pressão reduzida e o extrato aquoso remanescente, liofilizado, obtendo um rendimento de 31,3% a partir da droga vegetal.

Tabela 2. Rendimento do extrato hidroetanólico de folhas de *Phyllanthus tenellus*.

Período de coleta	Droga vegetal (g)	Extrato hidroetanólico (g)	Rendimento (%)
Março (2014)	3000	939	31,3

O extrato hidroetanólico a 70% liofilizado (extrato bruto) foi fracionado por partição líquido-líquido com clorofórmio, acetato de etila e água na proporção de 10g de droga para 100 mL de solvente. Primeiramente, a amostra foi dissolvida em água destilada. Após isso, foi adicionado clorofórmio. Esta mistura foi transferida para um funil de separação e submetida à agitação. A fração clorofórmica foi recolhida, filtrada com sulfato de sódio anidro e concentrada em um evaporador à pressão reduzida. Da mesma forma ocorreu a extração com o acetato de etila. A fração aquosa foi liofilizada.

Tabela 3. Rendimento das frações preparadas a partir de 100g de extrato hidroetanólico de *Phyllanthus tenellus*.

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
Clorofórmica	2,58	2,58
Acetato de etila	8,43	8,43
Aquosa	64,73	64,73
Total	75,74	75,74

Figura 4. Preparação do extrato hidroetanólico de *Phyllanthus tenellus* e seu fracionamento

4.3 Determinação do Perfil Cromatográfico do extrato hidroetanólico e frações de *P. tenellus*

4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada

O extrato hidroetanólico de *P. tenellus* e suas frações (clorofórmio, acetato de etila, aquosa) foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) com a finalidade de verificar a presença, principalmente, de substâncias flavonoídicas. O sistema cromatográfico utilizado foi descrito por Wagner & Bladt (1996), principalmente direcionado para flavonoides. Foi desenvolvida cromatografia de partição, com suporte sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck sobre placa de vidro com espessura 0,2 mm. A fase móvel foi composta por acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água destilada (100:11:11:26). O revelador foi formulado por difenilboriloxietilamina a 1% em metanol (NP). Os padrões utilizados são: rutina e quercetina, solubilizados em etanol. Por último, a visualização das cromatoplacas foi realizada sob luz UV 366 nm.

4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Objetivando isolar substâncias que possam estar relacionadas com a atividade antiúlcera, a fração acetato de etila de *P. tenellus* foi analisada por CLAE analítico.

A partir dos resultados obtidos com a CCD, foi analisada a fração acetato de etila de *P. tenellus* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em equipamento Shimadzu® com bombas LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm.

Para análise inicial foi realizada uma corrida gradiente de 60 min, utilizando a fase móvel (A: água Mili-Q com ácido trifluoracético 0.1%, B: acetonitrila-ACN), com as seguintes concentrações: 0-5 min em 5% em B e de 5-65 min 5 a 100% em B e de 65 min 5 a 100% em B.

A fração acetato de etila foi analisada porque mostrou a melhor atividade antiúlcera durante os ensaios biológicos.

4.3.3 Identificação de compostos

Para a identificação, os compostos obtidos na separação por CLAE foram solubilizados em 500 µl de DMSO-d₆ ou CD₃OD, transferidos para tubos próprio para RMN e submetidos a análises em equipamento Esquire 3000 plus, capilaridade de 4000V, nebulizador 27 psi, dry gás 9 l/min, dry temperature 300°C e ESI⁺.

4.4 Quantificação dos Flavonoides

Para a quantificação de flavonoides foi empregado o método espectrofotométrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl₃) como agente complexante. Isso porque o íon Al³⁺ se complexa com os oxigênios vicinais presentes nos flavonoides, ocorrendo um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda, possibilitando a determinação da quantidade de flavonoides (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). Abaixo está a figura representativa dos sítios quelantes presentes nos flavonoides.

Figura 5. Reação de complexação de flavonoides com cloreto de alumínio (MABRY; MARKHAM, THOMAS, 1970).

A metodologia foi adaptada da Farmacopéia Francesa (POZZI, 2007). A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de AlCl_3 a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm. As amostras (extrato bruto e frações de *P. tenellus*) foram analisadas em triplicata. Os valores foram expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

Para a execução da técnica utilizou-se quercetina (Sigma Aldrich) em etanol 60% como padrão externo. A construção da curva de calibração foi preparada a partir da solução de quercetina nas seguintes concentrações: 200 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$. A concentração de flavonoides foi calculada de acordo com a equação da reta, obtida da curva de calibração.

A quantificação de flavonoides foi realizada para o extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus*, a partir de soluções na concentração de 10 mg/ml em etanol 60% do extrato hidroetanólico, da fração acetato de etila e da fração aquosa. Os valores foram expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

4.5 Quantificação de substâncias fenólicas

A quantificação foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, em placas de 96 poços. As absorbâncias foram determinadas após 2 horas de reação no escuro, em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em comprimento de onda de 760 nm. As amostras (extrato hidroetanólico e frações de *Phyllanthus tenellus*) foram analisadas em triplicata. Ácido gálico em etanol 10% foi

utilizado como padrão externo. Os valores foram expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão (Média±EP).

Para a realização da técnica foram empregados 50 µl do reativo de Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich), 20 µl de amostra ou padrão, 30 µl de água destilada e 100 µl de carbonato de sódio a 700mM. As amostras quantificadas foram: extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus*. Desta maneira, foram preparadas soluções em etanol a 10% a uma concentração de 500 µg/mL para o extrato hidroetanólico e fração aquosa e de 100 µg/mL para a fração acetato de etila.

O reagente de Folin-Ciocalteau consiste do ácido fosfotúngstico/fosfomolibdênico e quando reage com compostos fenólicos há transferência de elétrons formando um complexo de coloração azul, que pode ser espectrofotometricamente determinada. A reação ocorre em meio alcalino (AINSWORTH; GILLEPSIE, 2007).

4.6 Determinação da capacidade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico e frações de *P. tenellus* foi empregado o método de medida de capacidade sequestrante de radicais livres através do DPPH (2,2'-difetil-1-picril-hidrazila) em solução de metanol.

O DPPH (figura 6) é um radical livre estável, o qual apresenta um nível máximo de absorção em 517nm. Este radical é reduzido na presença de compostos que possuem um potencial antioxidante provocando um decaimento de absorbância. O decaimento de absorbância é devido à perda de coloração violácea que o DPPH radical possui (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995; MOLYNEUX, 2004).

Figura 6. Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (MOLYNEUX, 2004).

Neste experimento foi utilizado como substância de referência o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®). Foram ensaiados o extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 µM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm. A partir das amostras (extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus*) foram preparadas soluções metanólicas em concentrações diversas (100,0; 95,0; 90,0; 85,0; 80,0; 75,0; 70,0; 65,0; 60,0; 55,0; 50,0; 45,0; 40,0; 35,0; 30,0; 25,0; 20,0; 15,0; 10,0; 5,0 µg/mL). O mesmo procedimento foi realizado com solução metanólica de Trolox®. As leituras espectrofotométricas foram obtidas empregando 1,0 mL das soluções, adicionadas a 3,0 mL da solução 100,0 µM do DPPH•, após 30 minutos de reação (protegida da luz) (BONDET; BRAND-WILLIAMS & BERSET, 1997; CHENG *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2005; YANG; GUO & YUAN, 2008).

O controle foi realizado por meio da determinação do decaimento da absorbância das amostras ($\text{Abs}_{\text{amostra}}$) correlacionado com o controle negativo ($\text{Abs}_{\text{controle}}$), constituído por metanol e solução 100,0 µM de DPPH• na proporção indicada. A porcentagem de sequestro de radicais livres foi expressa de acordo com a equação.

O cálculo de redução percentual do DPPH radical foi efetuado da seguinte maneira:

$$\% \text{ redução DPPH} \cdot = [(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100$$

Onde:

$Abs_{controle}$ = Absorbância controle;

$Abs_{amostra}$ = Absorbância amostra e ou Trolox[®].

4.7 Ensaios Biológicos

4.7.1 Animais

Os animais, ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*) fêmeas (150 a 180g) entre 6 a 8 semanas de idade, utilizados nos ensaios, foram provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Foram mantidos em gaiolas apropriadas, com ciclo de claro-escuro regulado para 12/12 horas, com umidade de 55% $\pm$ 5%. O projeto foi submetido à CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da FCF-USP e foi aprovado (protocolo CEUA/FCF/424/2014).

4.7.2 Atividade Antiúlcera Aguda – Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico

Para a avaliação da atividade antiúlcera gástrica e da relação dose efeito do extrato hidroetanólico e das frações de *P. tenellus* foi empregado o modelo de indução aguda por etanol acidificado (MIZUI; DOTEUCHI, 1983).

Ratos Wistar fêmeas foram mantidos em jejum de 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso a água.

No primeiro ensaio, foi utilizado extrato hidroetanólico de *P. tenellus* nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg administrado por via oral. Nesse ensaio foi utilizado 5 grupos com 7 animais cada, totalizando 35 animais.

No segundo ensaio, foram utilizadas as frações acetato de etila, aquosa e extrato hidroetanólico de *P. tenellus* na concentração de 200 mg/kg, administrados por via oral. Nesse ensaio foi utilizado 5 grupos com 7 animais cada, totalizando 35 animais.

Em ambos os ensaios, o grupo controle positivo recebeu, também por via oral, cloprostenol, um antagonista de prostaglandina, na dose de 150 μ g/kg, e os animais do grupo controle negativo, água (1mL/100 g de animal).

Após 30 minutos da administração do extrato hidroetanólico e das frações de *P. tenellus* e do controle negativo e positivo, foi administrado, por via oral, ácido clorídrico a 0,3 M em etanol a 60%, com volume de 10 mL/kg. Uma hora depois da administração do indutor, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, prensados entre placas de vidro e copiados por scanner para o computador. A área das ulcerações foi medida através do software Image-Pro Plus®. O experimento foi realizado no período da manhã com duração total estimada em 4 horas.

Os resultados foram expressos em área relativa de lesão, determinada através da área de lesão, dividida pela área total do estômago, e o resultado expresso em %.

Figura 7. Esquema de ensaio de atividade antiúlcera aguda do extrato hidroetanólico e frações de *Phyllanthus tenellus*, SOBREIRA, 2013.

4.7.3 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com indometacina

Para avaliação do envolvimento de COX-1 e COX-2 no mecanismo da ação gastroprotetora da fração acetato de etila de *P. tenellus*, foi empregado o modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com indometacina (ADAPTADO DE MATSUDA, 1999).

Ratos Wistar fêmeas foram mantidos em jejum de 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso a água. Neste ensaio, os animais foram divididos em

grupo controle e grupo teste, com 21 animais em cada grupo, totalizando 42 animais. Indometacina (30 mg/kg) e salina foram administradas por via subcutânea no grupos teste e controle, respectivamente.

Após 30 minutos os animais de ambos grupos receberam, por via oral, água (1mL/100g), cloprostenol (150 µg/kg) e fração acetato de etila de *P. tenellus* na dose de 400 mg/kg. Passados 30 minutos, os animais receberam o agente ulcerativo (150 mmol/L de ácido clorídrico a 0,3M (1 mL/100g) em etanol a 60%), por gavagem. Uma hora depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, lavados com solução fisiológica e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus®. O experimento foi realizado durante o período da manhã, com duração total estimada de 4 horas.

4.7.4 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com etoricoxibe

Para avaliação do envolvimento de COX-2 no mecanismo de ação gastroprotetora da fração acetato de etila de *P. tenellus*, foi empregado o modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com etoricoxibe (ADAPTADO DE MATSUDA, 1999).

Ratos Wistar fêmeas foram mantidos em jejum de 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso a água. Neste ensaio, os animais foram divididos em grupo controle e grupo teste, com 21 animais em cada grupo, totalizando 42 animais. Etoricoxibe (90 mg/kg) e salina foram administradas por via subcutânea no grupos teste e controle, respectivamente.

Após 30 minutos os animais de ambos os grupos receberam, por via oral, água (1mL/100g), cloprostenol (150 µg/kg) e fração acetato de etila na dose de 400 mg/kg. Passados 30 minutos, os animais receberam o agente ulcerativo (ácido clorídrico a 0,3M (1 mL/100g) em etanol a 60%), por via oral. Uma hora depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, lavados com solução fisiológica, prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus®. O experimento foi realizado durante o período da manhã, com duração total estimada de 4 horas.

4.7.5 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM)

Para avaliação do envolvimento de grupamentos sulfidríla no mecanismo de ação gastroprotetora da fração acetato de etila de *P. tenellus* foi empregado o modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-etilmaleimida (ADAPTADO DE MATSUDA, 1999).

Ratos Wistar fêmeas foram mantidos em jejum de 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso a água. Neste ensaio, os animais foram divididos em grupo controle e grupo teste, com 21 animais em cada grupo, totalizando 42 animais. NEM (10 mg/kg) e salina foram administradas por via intraperitoneal no grupos teste e controle, respectivamente.

Após 30 minutos os animais de ambos os grupos receberam, por via oral, salina (1mL/100g), cloprostenol (150 µg/kg) e fração acetato de etila na dose de 400 mg/kg. Passados 30 minutos, os animais receberam o agente ulcerativo (ácido clorídrico a 0,3M (1 mL/ 100g) em etanol a 60%), por via oral. Uma hora depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, lavados com solução fisiológica e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus®. O experimento foi realizado durante o período da manhã, com duração total estimada de 4 horas.

4.7.6 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME)

Para avaliação do envolvimento de óxido nítrico no mecanismo de ação gastroprotetora da fração acetato de etila de *P. tenellus*, foi empregado o modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME) (ADAPTADO DE MATSUDA, 1999).

Ratos Wistar fêmeas foram mantidos em jejum de 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso a água. Neste ensaio, os animais foram divididos em grupo controle e grupo teste, com 21 animais em cada grupo, totalizando 42 animais. L-NAME (70 mg/kg) e salina foram administrados por via intraperitoneal no grupos teste e controle, respectivamente.

Após 30 minutos os animais de ambos os grupos receberam, por via oral, água (1mL/100g), cloprostenol (150 µg/kg) e fração acetato de etila na dose de 400 mg/kg. Passados 30 minutos, os animais receberam o agente ulcerativo (ácido clorídrico a 0,3M (1 mL/ 100g) em etanol a 60%), por via oral. Uma hora depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, lavados com solução fisiológica e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus®. O experimento foi realizado durante o período da manhã, com duração total estimada de 4 horas.

4.7.7 Atividade Antiúlcera Subaguda – Modelo de Indução por Ácido Acético

A avaliação da atividade antiúlcera subaguda foi realizada conforme a técnica escrita por Okabe e Amagase (2005). Foram utilizados 08 ratos Wistar fêmeas por grupo (controle, tratado, 100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg e fármaco de referência), totalizando 40 animais. Antes da incisão cirúrgica, os animais foram mantidos em jejum de 8 a 12 horas com livre acesso à água. Neste procedimento, os animais foram contidos manualmente e anestesiados por via intraperitoneal com ketamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg. Logo depois, foi feita incisão abdominal e, com auxílio de um fórceps que delimitou a região da serosa do estômago, foi aplicado ácido acético a 100%. Após 60 segundos, a solução de ácido acético foi removida do estômago e substituída por salina para a limpeza do local injetado. Ainda anestesiados, os animais foram suturados. Dois dias após a cirurgia, foi administrado por via oral (contenção manual) o volume de 10 mL/kg do extrato hidroetanólico nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg de *P. tenellus* em suspensão aquosa, durante 7 dias. Para os animais do grupo controle negativo foi administrada, por via oral, água destilada (1mL/100g de animal). O fármaco de referência utilizado foi o lansoprazol (30 mg/kg) administrado ao grupo controle positivo.

No ensaio subagudo as úlceras gástricas foram induzidas por ácido acético. As úlceras induzidas aparecem com tamanho e severidade constante com uma incidência de 100%. Assemelham-se com a úlcera humana em termos patológicos e mecanismo de cicatrização e, por último, respondem a vários fármacos antiúlcera, tais como inibidores de bomba de prótons, sulcrafato e diversos fatores de crescimento. Okabe e Amagase (2005) sugerem que o mecanismo pelo qual a úlcera induzida por ácido acético se desenvolve é por necrose isquêmica na mucosa gástrica. De acordo com o artigo de revisão, a úlcera péptica ocorre por uma falta de suprimento de oxigênio e nutrientes e formação de radicais livres, causados por injúria vascular. A mucosa necrosada e a liberação de leucotrieno B4 atraem os leucócitos, os quais irão fagocitar o tecido necrótico e irão liberar citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo: TGF- α (fator de crescimento transformante alfa), IL-1 β (interleucina-1beta), TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), IL-1 α (interleucina-1alfa), ativando fibroblastos, célula endoteliais e epiteliais, com a finalidade de restabelecer a integridade física e cicatrizar a mucosa gástrica (TARNAWSKI, 2005).

Durante este experimento os animais foram pesados a cada 2 dias, para adequar o volume administrado do extrato hidroetanólico, controle negativo e controle positivo, conforme o peso do animal. Após o período de 7 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, foram retirados os estômagos e medida a área da ulceração. A medida das ulcerações foi realizada a partir do programa Image-Pro Plus[®]. Logo após a medição, os estômagos foram fixados em solução tamponada (pH 7,4) de formaldeído a 10%. Posteriormente foi realizado o preparo de lâminas para análise histológica. Os resultados foram expressos em porcentagem de área relativa de lesão.

Figura 8. Esquema do ensaio de atividade antiúlcera subaguda do extrato hidroetanólico de *Phyllanthus tenellus*, SOBREIRA, 2013.

4.7.8. Análise Histológica

Esta etapa do trabalho foi realizada pela empresa Histotech, e os estômagos foram analisados pelo Prof. Dr. José Luiz Guerra da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os estômagos foram fixados em formol a 10% e após o processo de desidratação e diafanização, o material foi incluído em parafina, formando blocos para a realização de cortes. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para a realização de análise histológica.

Na análise histomorfométrica, com o auxílio de um retículo contendo 35 pontos, foi realizada a quantificação de células polimorfonucleares, células mononucleares,

fibroblastos e matriz extracelular pela técnica de estimativa de volume celular, adaptada de Weibel (1979).

Para realizar tal quantificação, foram examinados 5 campos aleatórios de cada lâmina, na qual a contagem foi realizada em cada cruzamento das linhas do grid. Esta análise foi realizada em aparelho Nikon Eclipse E 800 e a captação da imagem foi realizada pela câmera Media Cibernetics, modelo Cool Snap-Procf. Os resultados foram expressos em fração de volume celular (%), como descrito por Dagli et al., 1998.

5.Forma de Análise dos Resultados

Os resultados dos ensaios farmacológicos foram submetidos a tratamento estatístico, através da Análise de Variância (ANOVA) seguido do Teste de Dunnett's e teste T, sendo o resultado considerado significativo para $P \leq 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prisma 5.

RESULTADOS

e

DISCUSSÃO

6. Resultados e Discussão

As plantas medicinais têm sido uma valiosa fonte de novas moléculas, sendo consideradas alternativas na busca de novos medicamentos (ZAKARIA et al., 2011). Há uma rica variedade de plantas medicinais que são utilizadas como gastroprotetoras na medicina tradicional e que, após estudos químicos e farmacológicos, poderão fornecer novos medicamentos contra úlcera (SHAH et al., 2006; SHOKUNBI e ODETOLA, 2008). Conhece-se historicamente que as plantas medicinais podem produzir fármacos importantes, os quais dificilmente seriam adquiridos via síntese química. Também existe a possibilidade de produzir compostos que podem ser ligeiramente modificados, tornando-os mais eficazes e com poucos efeitos colaterais. Além disso, os produtos obtidos de plantas medicinais podem ser utilizados como modelos para a obtenção de fármacos com atividade farmacológica semelhante à dos compostos de referência (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

De acordo com a revisão da literatura, alguns trabalhos foram realizados com o intuito de avaliar a influência do extrato hidroetanólico e frações de *P. tenellus* em diversas atividades farmacológicas e *in vitro*. Alguns estudos fitoquímicos revelaram que algumas classes de metabólitos secundários presentes nesta espécie, como, por exemplo, flavonoides, estão envolvidos na maioria das atividades estudadas. Em relação à atividade antiúlcera, foco deste trabalho, existem poucos estudos publicados. Alguns estudos publicados revelam a presença de metabólitos secundários principalmente, compostos fenólicos, presentes nesta espécie (HUANG et al., 2003), que podem estar envolvidas na proteção da mucosa devido a sua atividade antiúlcera. Desta maneira, houve o interesse de realizar um trabalho mais abrangente, ou seja, além de verificar se o extrato bruto e suas frações apresentam atividade antiúlcera, sugerindo um possível mecanismo de ação, também identificar compostos majoritários, que possam estar envolvidos com tal atividade.

O perfil cromatográfico em camada delgada do extrato hidroetanólico e das frações acetato de etila e aquosa das partes aéreas de *P. tenellus*, determinado no presente estudo, permitiu a constatação da presença de flavonoides, através das colorações apresentadas. Foram utilizados quercetina e rutina como orientação na cromatografia em camada delgada e para verificação da atividade do revelador, que é específico para flavonoides. Rutina, padrão utilizado, teve um R_f semelhante a uma banda de coloração intensa comum a todas as amostras ensaiadas. Prando et al. (2015)

detectaram a presença de vários taninos hidrolisáveis e flavonoides, tal como a quercetina, na fração aquosa das partes aéreas de *P. tenellus*. Os taninos hidrolisáveis foi observada em extrato aquoso e está em conformidade com Sprenger e Cass (2013). No entanto, mais estudos fitoquímicos necessitam ser realizados para confirmar a presença deste flavonoide no extrato hidroetanólico e na fração acetato de etila de *P. tenellus*, pois pelo perfil cromatográfico obtido, não é possível confirmar a presença de quercetina, pois ela encontra-se na linha de frente, sendo impossível calcular o Rf. Como a fração acetato de etila apresentou maior quantidade de bandas, representando flavonoides, esta foi selecionada para o estudo da atividade antiúlcera. Já a fração clorofórmio não apresentou bandas semelhantes às dos padrões, conforme a figura 9. No entanto, mais estudos fitoquímicos precisam ser realizados para determinar a estrutura de flavonoides no extrato hidroetanólico e fração acetato de etila e fração aquosa de *Phyllanthus tenellus*.

Figura 9. Cromatoplaça do extrato hidroetanólico e frações das partes aéreas de *P. tenellus*. 1. Rutina; 2. Quercetina; 3. Extrato hidroetanólico; 4. Fração acetato de etila; 5. Fração aquosa. Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com NP. Distância percorrida pela FM 15 cm. Visualização sob luz UV 366 nm.

Como a fração acetato de etila de folhas de *P. tenellus* apresentou melhores resultados de atividade antiulcera nos ensaios biológicos, houve interesse em analisá-la por CLAE. Neste cromatograma observa-se a presença de um pico majoritário.

A identificação do pico majoritário encontrado na fração acetato de etila de *P. tenellus* foi baseada em dados de HR-MS (high resolution mass spectrometry) técnica de Massa: ESI – Ionização por eletrospray detector em modo positivo. Segundo Prando et al. (2015), a análise de espectro de massa obtida para a espécie *P. tenellus* mostrou a presença de flavonoide glicosilado, di-hidromiricetina. O composto identificado, a seguir, pertence ao grupo dos flavonoides (**FIGURA 10**).

Figura 10. Cromatograma da fração de etila (1mg/mL) de *P. tenellus*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20µl, detector PDA (Thotodiode Array), fluxo de 1mL/min e coluna Thermo Scientific® C18ODS Hypersil de 250mm x 4.6mm, tamanho de partícula de 5µm.

Gradiente de ACN em H₂O + TFA a 0,1%, 5-100% em 60 min.

Cromatograma DAD ($\lambda=254\text{nm}$) da fração de acetato de etila de *P. tenellus*, com di-hidromiricetina.

Figura 11. Cromatograma de íons no modo positivo da fração de etila (1mg/mL) de *P. tenellus*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20µl, detector PDA (Thotodiode Array), fluxo de 1mL/min e coluna Thermo Scientific® C18ODS Hypersil de 250mm x 4.6mm, tamanho de partícula de 5µm.

Gradiente de ACN em H₂O + TFA a 0,1%, 5-100% em 60 min.

As análises do pico com t_r 19-20 min no espectro de massas (figura 12) por espectrometria de massas no modo positivo apresenta íon molecular +MS 19.3-19.9

min m/z 321.2 $[M+H]^+$ e dos fragmentos **+MS2** (321.3), 19.3 min: 292.9 $[M+H-CO]^+$, 274.8 $[M+H-CO-H_2O]^+$, 246.8 $[M+H-CO-H_2O-CO]^+$, 218.8 $[M+H-CO-H_2O-2CO]^+$ (VIEIRA, et al., 2016). A molécula sofre inicialmente uma perda de monóxido de carbono e posteriormente uma desidratação, seguida de duas subseqüentes perdas de monóxido de carbono, as perdas são características de di-hidroflavonoides (TSIMOGIANNIS, et al., 2007).

Figura 12. Espectro de Massa. Equipamento Esquire 3000 plus. Capilaridade: 4000V. Nebulizador: 27 psi. Dry Gas: 9 l/min. Dry Temperature: 300 °C. Espectro no modo positivo MS² de $[M+H]^+$ m/z 321,3 em 19.3 min (fragmentos de di-hidromiricetina). Espectro ESI⁺ de dihidromiricetin em 19.3-19.9 min.

Figura 13. Espectro de Massa. Equipamento Esquire 3000 plus. Capilaridade: 4000V. Nebulizador: 27 psi. Dry Gas: 9 l/min. Dry Temperature: 300 °C. Espectro no modo positivo MS² de $[M+H]^+$ m/z 321,3 em 19.3 min (fragmentos de di-hidromiricetina). Espectro ESI⁺ de dihidromiricetin em 19.3-19.9 min.

Os flavonoides, presentes em vegetais, atraem a atenção dos pesquisadores, devido a sua variada atividade biológica (atividades antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras) (HARBONE, 1984). Há muitos estudos sobre a propriedade antiulcerogênica dos flavonoides, que são conhecidos por protegerem a mucosa gástrica, devido ao seu papel de inibir radicais livres que promovem a lesão

gástrica no trato gastrointestinal, ou seja, os flavonoides são responsáveis pela redução da maior parte de estresse oxidativo associado a diversas doenças (GRACIOSO, 2002; GONZALEZ, 2002; KONAN, 2007, SHIRWAIKAR, 2004).

A quercetina é o único flavonoide que tem sido amplamente estudado nos últimos 30 anos (LAKHANPAL; RAI, 2007). A quercetina apresenta possível atividade antioxidante que atua diretamente em radicais livres interferindo, por exemplo, na síntese do óxido nítrico sintase (LAKHANPAL; RAI, 2007; MATERSKA, 2008). Dhasan et al. (2010) verificaram a propriedade antiúlceras da quercetina em ratos, no modelo de indução de lesões gástricas por ligação do piloro. O tratamento com este flavonoide foi capaz de estimular a secreção de prostaglandina e diminuir os efeitos de deterioração dos agentes oxidantes no lúmen gastrointestinal (DHASAN et al., 2010; SALVAYRE et al., 1982), foi responsável também por evitar esofagite de refluxo e gastrite de ratos (MIN et al., 2009) e houve uma elevada atividade anti *Helicobacter pylori* (ÜSTÜN et al., 2006). Os dados obtidos são importantes, pois devido ao potencial antioxidante da quercetina, há a possibilidade de sua participação na ação antiúlceras.

Sobre a di-hidromiricetina, não foi encontrado nenhum artigo sobre atividade antiúlceras, porém o PROVITAL GROUP (2006) publicou artigo com ensaios *in vitro* e *in vivo* que comprovam a eficácia desse flavonoide como agente redutor de celulite dérmica. Os ensaios *in vitro* detectaram ação na adipogênese, lipólise e lipogênese. Esta ação se deve à inibição seletiva da atividade da tirosina quinase por ligação à subunidade β dos receptores de membrana nos adipócitos. Esta união desencadeia uma série de reações bioquímicas, que aumentam o transporte da glicose através da membrana e ativam ou inativam enzimas, podendo causar mudanças nos níveis de expressão de vários genes. O ensaio determinou a expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) e sugeriu que a di-hidromiricetina inibe em 40% a indução de GLUT-4 e a capacidade da célula adiposa de promover adipogênese. A atividade de tirosina quinase nas subunidades β dos receptores de membrana é fundamental para o bloqueio da lipólise nos adipócitos.

Shen et al. (2012) encontraram efeitos contra o álcool para di-hidromiricetina, isolada de *Hovenia dulcis*, em modelos animais e determinaram um importante alvo molecular e mecanismo celular contra intoxicação e dependência alcoólica. O estudo mostra que a administração oral de 1,0 mg/kg de di-hidromiricetina com álcool ou até 30 minutos antes da ingestão de álcool reduziu significativamente o efeito do álcool nos

ratos. A di-hidromiricetina bloqueou a ligação de neurotransmissores nos receptores GABA.

Hase et al. (1997) encontraram atividade hepatoprotetora dos frutos de *H. dulcis*, sendo que o extrato metanólico mostrou significativa atividade hepatoprotetora contra toxicidade induzida por CCl₄ (tetracloreto de carbono) em ratos, chamada indução química em camundongos. Os animais foram tratados com 100mg/kg do extrato, duas vezes na semana, por uma semana antes da indução de toxicidade hepática. A di-hidromiricetina foi isolada do extrato metanólico, sendo a atividade atribuída ao flavonoide encontrado.

A diferença estrutural entre as moléculas de quercetina e di-hidromiricetina está na quantidade de hidroxilas no anel B e também na dupla ligação do anel C.

Figura 14: Estrutura química de (a) quercetina (b) di-hidromiricetina

No ensaio de quantificação de flavonoides e de compostos fenólicos foi observado que a fração acetato de etila possui maior concentração de substâncias fenólicas, incluindo flavonoides, seguida do extrato bruto e por ultimo, pela fração aquosa. (Figura 15) (Tabela 5). Considera-se que a maioria dos flavonoides age como antioxidante e que esta atividade é muito importante para a proteção da mucosa gástrica contra o stress oxidativo e na facilitação da cicatrização da mucosa gástrica (BENAVENTE-GARCÍA et al.; 1997; KARAKOYUN, et al.; 2009).

Figura 15. Curva de calibração da quercetina, utilizada para a quantificação de flavonoides totais contidos no extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *Phyllanthus tenellus*. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de AlCl_3 a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm.

Tabela 4. Teor de flavonoides do extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa das partes aéreas de *Phyllanthus tenellus*, obtido por reação com AlCl_3 como agente complexante após leitura em espectrofotômetro. Os resultados de flavonoides totais estão expressos como média seguido do erro padrão em triplicata. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de AlCl_3 a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm.

Amostras	Total de teor de Flavonoides
	(mg de flavonoides, calculados em quercetina, g) ± EP)
Fração aquosa	73,39 ± 3,28
Fração acetato de etila	209,30 ± 6,85
Extrato Hidroetanólico	123,00 ± 2,75

Os fenóis totais foram calculados em ácido gálico. A curva de calibração do ácido gálico encontra-se a seguir (Figura 16) (Tabela 6).

Figura 16. Curva de calibração do ácido gálico utilizada para determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus*. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de AlCl_3 a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm.

Tabela 5. Teor de compostos fenólicos nos extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa das folhas de *Phyllanthus tenellus* utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP em triplicata. Conteúdo fenólico total expresso como média $\pm$ DP mg calculado em ácido gálico/g de peso seco. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de AlCl_3 a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm.

Amostras	Total de teor de Fenóis
	(mg de fenólicos calculados em ácido
	gálico/g de F. aquosa) $\pm$ DP
Fração aquosa	134,00 $\pm$ 2,01
Fração acetato de etila	289,66 $\pm$ 8,06
Extrato Hidroetanólico	271,97 $\pm$ 5,45

De acordo com RACHCHH e JAIN (2008), radicais livres podem induzir úlceras gástricas graves, incluindo vários fatores que contribuem com danos sobre a mucosa, como a diminuição do fluxo sanguíneo gástrico, redução do endotélio capilar,

leucotrienos e ativação do fator plaquetário. Espécies do gênero *Phyllanthus* são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de amplo espectro de doenças como cálculo renal (pedra no rim), infecções intestinais, diabetes, vírus da hepatite B, (CALIXTO et al., 1998; UNANDER et al., 1995).

Muitos compostos antioxidantes são produzidos naturalmente em diversas partes dos vegetais e têm sido identificados como compostos sequestradores de radicais livres ou de compostos reativos de oxigênio (ZHENG e WANG, 2001). O interesse por produtos naturais aumentou consideravelmente, principalmente por alimentos que apresentam propriedades antioxidantes.

Zhang et al. (2003) demonstraram que a di-hidromiricetina possui elevada atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e inibitória da peroxidação lipídica. Eles propuseram que o mecanismo de ação antioxidante seja quelante de Fe^{2+} , atuando no sistema de peroxidação lipídica dependente de Fe^{2+} . Zhang et al. (2003) corroboraram estes resultados, testando a inibição da peroxidação lipídica, pela di-hidromiricetina, no coração, fígado, homogenato de tecido do cérebro e em mitocôndrias. O flavonoide inibiu peroxidação lipídica no homogenato e nas mitocôndrias de maneira dose dependente.

Assim, foi realizada uma investigação de uma possível capacidade antioxidante, pelo método do DPPH, do extrato hidroetanólico e frações acetato de etila e aquosa de *P. tenellus*.

Figura 17. Curva de calibração do Trolox utilizado como padrão externo para determinação da capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico e frações de *Phyllanthus tenellus*. Neste experimento foi utilizado como substância de referência o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®). Foram ensaiados o extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 µM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm.

Figura 18. Curva de calibração da porcentagem da redução do DPPH radical referente à concentração do padrão externo Trolox. Neste experimento foi utilizado como substância de referência o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm.

Figura 19. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração do extrato hidroetanólico de *Phyllanthus tenellus*. Foi ensaiado o extrato hidroetanólico de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 µM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm.

Figura 20. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração da fração acetato de etila de *Phyllanthus tenellus*. Foi ensaiado a fração acetato de etila de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 µM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm.

Figura 21. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração da fração aquosa de *Phyllanthus tenellus*. Foi ensaiado a fração aquosa de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 µM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm.

No experimento de determinação de capacidade antiradicalar observou-se que a fração acetato de etila ($\text{CE}_{50}=13,09 \mu\text{g/ml}$) apresentou uma melhor capacidade de redução do radical DPPH, seguida do extrato hidroetanólico ($\text{CE}_{50}=19,86 \mu\text{g/ml}$) e fração aquosa ($\text{CE}_{50}=45,76 \mu\text{g/ml}$). Trolox substância de referência utilizada apresentou uma CE_{50} de $26,67 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 6). Estes resultados estão em consonância com a gastroproteção observada no experimento de úlcera gástrica, evidenciando que a dihidromiricetina e miricetrina além de outros compostos flavonoídicos presentes em *P. tenellus*, podem ser parcialmente responsáveis pelo processo de gastroproteção, provavelmente, por uma ação antioxidante.

Sugere-se que a fração acetato de etila apresenta atividade antioxidante maior do que as outras frações, pela presença de substâncias fenólicas. Estas podem apresentar função antioxidante, podendo ser parcialmente responsáveis pelo processo de proteção gástrica (SILAMBUJANAKI et al., 2010). Conforme os dados das figuras 17 a 21 e da Tabela 7, verificou-se presença de atividade antioxidante promovida pelo extrato bruto e frações da espécie *P. tenellus*.

Tabela 7. Concentração efetiva (CE₅₀) do extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *Phyllanthus tenellus* obtida no ensaio de determinação de atividade antioxidante. Neste experimento foi utilizado como substância de referência o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®). Foram ensaiados o extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus* na presença da solução de 100,0 µM do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente (24,0 ± 2,0°C). O potencial antioxidante é expresso como a concentração da amostra capaz de inibir 50% da absorbância do DPPH• por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) a 517 nm.

Amostras	CE ₅₀ (µg/mL)
Trolox	26,67
Fração aquosa	45,76
Fração acetato de etila	13,09
Extrato Hidroetanólico	19,86

O etanol é altamente corrosivo, fere as células endoteliais da mucosa gástrica e as conseqüências observadas envolvem a necrose superficial da mucosa, induzindo assim perturbação da microcirculação, hipóxia e superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SUZUKI, 2012; KAHN, et al., 2013). Ambos, ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são subprodutos da normalidade celular no processo redox. No entanto, em concentrações elevadas, podem causar peroxidação lipídica e danos nos componentes celulares (ASOKKUMAR, 2014).

De acordo com GLAVIN e SZABO (1992), o mecanismo pelo qual o etanol produz úlceras gástricas ocorre através da diminuição fluxo sanguíneo gástrico e da redução da produção de muco estomacal. Os níveis de glutathione e prostaglandinas são reduzidos, ocorrendo aumento da isquemia seguido de um aumento da secreção do suco gástrico, produção de radicais livres, efluxo de sódio e potássio.

No modelo de úlcera aguda gástrica, induzida por etanol, as lesões são formadas por administração intragástrica de 0,5 a 2,0 ml de etanol em uma concentração de 50 a 100%. A maioria das lesões inicia a sua formação entre 1-3 minutos após a administração do indutor na mucosa gástrica (GLAVIN e SZABO, 1992). A administração aguda de etanol em conjunto com o ácido é capaz de reduzir a citoproteção da mucosa gástrica, particularmente através da redução de concentração de

prostaglandinas, o que facilita os danos pelo ácido clorídrico, gerando uma resposta inflamatória, causando necrose celular (AMANDEEP et al., 2012; TOMA et al., 2014).

Vários fatores são responsáveis pela indução de úlceras gástricas por esse modelo. Alguns deles são: aumento da geração de radicais livres, aumento do refluxo na difusão de ácido, aumento da liberação de serotonina e histamina, aumento do efluxo de sódio e potássio, aumento do influxo de cálcio, aumento da produção de leucotrienos, aumento da isquemia, aumento da permeabilidade vascular gástrica e diminuição da produção de muco, diminuição da produção endógena de GSH (glutathiona), diminuição da produção de prostaglandinas e diminuição do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (GLAVIN; SZABO, 1992).

Em estudo realizado por Li et al. (2013), com a finalidade de elucidar o mecanismo pelo qual ocorre a formação de úlceras gástricas, os autores sugerem que este é um processo multifacetado, que inclui secreção ácida e formação de espécies reativas de oxigênio, inibição de prostaglandinas e degradação da matriz extracelular.

Os nossos estudos demonstraram que nos estômagos de animais tratados apenas com etanol acidificado (grupo controle negativo), ocorreu ulceração gástrica. No grupo tratado com extrato hidroetnólico de *P. tenellus* verificou-se que houve tendência de redução da área de lesão gástrica nas doses testadas (100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg), porém não houve diferença significativa entre as doses (Figura 22). O mesmo modelo de indução por etanol acidificado foi utilizado, ensaiando extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa, nas concentrações de 200mg/kg, para verificar qual destas amostras-teste seria mais efetiva contra a formação de lesões gástricas. Assim, houve tendência de redução da área de lesão gástrica, porém não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 22).

Figura 22. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda de extrato hidroetanólico de *P. tenellus* em doses de 100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; ** p<0,01 em relação ao controle negativo (água). Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg

Tabela 8. Média ± Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda do Extrato Hidroetanólico de *P. tenellus* na dosagem de 100, 200 e 400 mg/kg; n=7 para cada grupo; Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg, EH: Extrato Hidroetanólico.

** p<0,01 em relação ao controle negativo (água).

	Água	Cloprostenol	EH 100 mg/kg	EH 200 mg/kg	EH400 mg/kg
Média±EP (%)	5,56±1.26	0,18±0.09**	9,83±1.43	4,25±0.55	3,44±0.90

Frações e Extrato Hidroetanólico

Figura 23. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda comparativa do extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de *P. tenellus* na dosagem de 200mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; * P<0,05 em relação ao controle negativo (Água). Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg.

Tabela 9. Média ± Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda do Extrato Hidroetanólico, Fração Acetato de Etila e Fração Aquosa de *P. tenellus* na dosagem de 200 mg/kg; n=7 para cada grupo; Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. EH: Extrato Hidroetanólico. FA: Fração Acetato de Etila. Faq: Fração Aquosa. Clo: Cloprostenol

	Água	Clo	EH 200 mg/kg	FA 200 mg/kg	Faq.200 mg/kg
Média±EP (%)	12,32±2.55	0,32±0.12*	4,12±0.51	10,01±2.01	4,09±0.67

* P<0,05 em relação ao controle negativo (Água)

Em função de uma maior tendência à atividade antiúlcera da fração acetato de etila, esta foi utilizada na continuação dos experimentos. No experimento utilizando fração acetato de etila, foi verificada uma tendência de redução de lesões gástricas nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, em relação ao controle negativo. Sendo assim, esta fração revelou ter um potencial importante na redução de úlceras gástricas. Entretanto, houve falta de relação dose-resposta neste ensaio. Como esperado, houve maior tendência de redução de úlceras gástricas na concentração de 400 mg/kg em relação as

concentrações de 100 e 200 mg/kg. Desse modo, os ensaios posteriores relacionados ao envolvimento de mecanismo de ação, foram realizados com a fração acetato de etila de *P. tenellus* na dose de 400 mg/kg (Figura 24).

Figura 24. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 100, 200 e 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; * P<0,05 em relação ao controle negativo (Água). Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg.

Tabela 10. Média ± Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 100, 200 e 400 mg/kg; n=7 para cada grupo; Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. FA: Fração Acetato de Etila. Clo: Cloprostenol

	Água	Clo	FA 100 mg/kg	FA 200 mg/kg	FA 400 mg/kg
Média±EP(%)	11,22±2.55	0,16±0.12*	9,46±3.56	12,86±2.32	2,80±1.35

* P<0,05 em relação ao controle negativo (Água).

Vários mecanismos moleculares que participam da proteção da mucosa foram propostos. Entre esses, estão a biossíntese e liberação de óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂), prostaglandina (PG). Estes mediadores atuam reduzindo a ativação de leucócitos e plaquetas, mantendo a perfusão tecidual e microvascular, protegendo contra danos agudos (TARNAWSKI et al., 2010).

A integridade da mucosa gástrica contra úlceras e agentes necrosantes depende da produção de PG pela ciclo-oxigenase-1 (COX-1). Entre os diferentes mecanismos de gastroproteção quase todos são estimulados ou facilitados pela PG. A inibição de sua síntese pode ser promovido por AINES, o que torna a mucosa gástrica mais suscetível a lesões (TARNAWSKI et al., 2013).

A ciclo-oxigenase (COX) existe na forma de duas isoenzimas COX-1 e COX-2. A COX-1 é conhecida por funcionar como uma enzima de organização, catalisando a formação de PG, contribuindo para a manutenção da integridade da mucosa gástrica, por meio de modulação de várias funções (SOLL, 1991 e VANE, 1995). A COX-2 é uma enzima induzível regulada por citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, que medeiam reações patológicas tais como inflamação e crescimento de tumores (DAVIES, 1997 e KOGA, 2004).

Um possível modo de ação para a eficácia dos anti-inflamatórios não-esteroidais seria o bloqueio específico da isoforma COX-2 (SERENIKI; VITAL, 2008). A COX-2 é uma enzima que catalisa a produção de prostaglandinas, que contribui para o processo inflamatório e danos nos tecidos. Foi relatado também que a COX-2 pode ser ativada pelas altas concentrações de óxido nítrico, contribuindo com maior intensidade para a inflamação, observada principalmente em doenças inflamatórias crônicas (ABDELWAHAB et al., 2011).

Considerando as informações acima, no ensaio representado pela figura 25 e pela Tabela 11, foi utilizada a indometacina para bloquear especificamente as enzimas COX-1 e COX-2, diminuindo a produção de PG, sendo que qualquer substância que atua por esta via perderá seu efeito.

Figura 25. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dose de 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com indometacina por via sub-cutânea (30 mg/kg); n=7 para cada grupo. Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 μ g/kg. FA: fração acetato de etila. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem indometacina, referentes do mesmo tratamento. Teste t.

Tabela 11. Média $\pm$ Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com indometacina (**Indo+Clo**: Indometacina+Cloprostenol. **Indo+FA**: Indometacina+Fração Acetato de Etila. **Indo+Água**: Indometacina+Água. **Salina+Clo**: Salina+Cloprostenol. **Salina+FA**: Salina+Fração acetato de Etila).

	Indo+Clo	Indo+FA	Indo+água	Salina+Clo	Salina+FA	Salina+água
Média $\pm$ EP(%)	0,97 $\pm$ 0,25	0,73 $\pm$ 0,16	11,04 $\pm$ 1,81	0,22 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,38	5,71 $\pm$ 1,39

Dessa maneira, foi verificado que a ação antiúlcera da fração acetato de etila de *P. tenellus* não ocorre por mecanismo de COX-1 e COX-2, pois não houve aumento

significativo das regiões ulceradas no grupo tratado em relação ao grupo tratado com o veículo.

No ensaio seguinte (Figura 26) foi utilizado etoricoxibe, para inibir especificamente a enzima COX-2, administrado por via sub-cutânea.

Figura 26. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com etoricoxibe por via sub-cutânea (90 mg/Kg); n=7 para cada grupo. Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 μ g/kg. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem etoricoxibe, referentes ao mesmo tratamento. Teste t.

Tabela 12. Média $\pm$ Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com etoricoxibe (**Etori+Clo:** Etoricoxibe+Cloprostenol. **Etori+FA:** Etoricoxibe +Fração Acetato de Etila. **Etori+Água:** Etoricoxibe +Água. **Salina+Clo:** Salina+Cloprostenol. **Salina+FA:** Salina+Fração acetato de Etila).

	Etori+Clo	Etori+FA	Etori+água	Sal+Clo	Sal+FA	Sal+água
Média$\pm$EP(%)	0,63 $\pm$ 0.22	0,06 $\pm$ 0.04	6,40 $\pm$ 0.75	0,22 $\pm$ 0.10	0,32 $\pm$ 0.18	6,25 $\pm$ 0.95

Através destes ensaios verificou-se que a fração acetato de etila de *P. tenellus* não utiliza a enzima COX-2 como mecanismo para promover a gastroproteção. Sendo assim, outros mediadores foram ensaiados, visando ao mecanismo de ação da atividade antiúlcera de *P. tenellus*.

No stress oxidativo os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) estão aumentados e as defesas antioxidantes, como a glutathiona (GSH), um antioxidante sulfidrilo não proteico, estão diminuídas (SUZUKI, 2012). A inibição da geração de ROS interrompe a apoptose e outros tipos de morte celular (MAITY et al., 2009).

Na mucosa gástrica existem grupos sulfidrilas, que são moléculas não proteicas. As sulfidrilas são uma classe de substâncias citoprotetoras endógenas, que são capazes de reduzir radicais livres na mucosa estomacal (SZABO, 1981). 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 à mucosa (HIRUMA-LIMA et al., 2009; NATALE et al., 2004)

Com o objetivo de verificar o envolvimento dos radicais sulfidrilas, em nosso ensaio houve tratamento prévio com N-etilmaleimida (NEM), cuja função é bloquear grupamentos sulfidrilas, administrado por via intraperitoneal, tanto para o grupo teste quanto para o grupo controle, com a função de bloquear grupos sulfidrilas (SZABO et al., 1983).

Foi observado que houve diferença significativa entre os grupos que foram administrados com NEM e salina, após administração oral da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dose de 400 mg/kg (Figura 27). Através deste resultado sugere-se a participação dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção no presente ensaio.

Figura 27. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM) por via intraperitoneal (10 mg/kg); n=7 para cada grupo; *p<0,05. Controle negativo (Salina+água). Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem N-etilmaleimida, referentes do mesmo tratamento. Teste t.

Tabela 13. Média ± Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-etilmaleimida (**NEM+Clo** N-etilmaleimida +Cloprostenol. **NEM+FA**: N-etilmaleimida+Fração Acetato de Etila. **NEM+Água**: N-etilmaleimida+Água. **Sal+Clo**: Salina+Cloprostenol. **Sal+FA**: Salina+Fração acetato de Etila. **Sal+Água**: Salina+Água); n=7 para cada grupo; Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem N-etilmaleimida, referentes do mesmo tratamento.

	NEM+Clo	Sal+Clo	NEM+FA	Sal+FA	NEM+Água	Sal+Água
Média±EP(%)	16,30±7,15	0,01±0,01*	13,12±1,58	1,15±0,49*	13,41±3,81	1,08±0,40*

*p<0,05. Controle negativo (Salina+água).

O óxido nítrico (NO) é uma substância endógena que desempenha um papel importante na regulação do ácido gástrico e modulação da integridade da mucosa gástrica em conjunto com as PG endógenas (KHALIFA et al., 2002; TAHA et al., 2012). Ele auxilia nos mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica, aumentando o

fluxo sanguíneo na mucosa e inibindo a liberação de metabólitos oxigenados e proteases de leucócitos na microcirculação gástrica. O NO também modula a secreção de alguns fatores de crescimento celulares, principalmente o fator de crescimento epidérmico (ELLIOT et al., 1995).

No trato gastrointestinal superior (TGI), o óxido nítrico atua como um potente vasodilatador, ou seja, atua aumentando o fluxo de sangue da mucosa gástrica regulando a secreção de muco e bicarbonato. Devido a isso ocorre a inibição da secreção gástrica, protegendo a mucosa gástrica contra os danos induzidos por uma variedade de agentes (TARNAWSKI et al., 2013). A inibição de NO sintase por L-NAME agrava a lesão, em modelo animal de úlcera gástrica (KONTUREK et al., 1993). Da mesma forma, uma interrupção na síntese de prostaglandinas citoprotetoras por inibição da forma constitutiva da COX-1 no muco é considerada um dos principais mecanismos da formação de úlceras pépticas e duodenais (HOOGERWERF, PASRICHA, 2006).

A liberação de óxido nítrico está envolvida na regulação da secreção do ácido gástrico, bem como na modulação da atividade da mucosa gástrica em conjunto com PG (HEEBA, 2009). As experiências com os inibidores seletivos sugerem que as isoformas constitutivas de COX (COX-1) e de óxido nítrico sintase (NOS) (NOS endotelial e neuronal) são agentes de proteção (LUNDBERG, 2008).

Considerando o envolvimento de NOS, foi realizado um ensaio com intuito de revelar se o óxido nítrico está envolvido no mecanismo de gastroproteção. A principal função do NO, liberado do endotélio, envolve a manutenção do fluxo sanguíneo, também mantém a integridade do epitélio gástrico, e estimula a secreção e síntese de muco e bicarbonato (BRZOZOWSKI et al., 2005; FREITAS et al., 2011). No ensaio realizado por nós houve tratamento prévio com L-NAME, administrado por via intraperitoneal, cuja principal função foi bloquear o óxido nítrico (SZABO et al., 1983)

Figura 28.

Figura 28. Área relativa de lesão. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dose de 400mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME) por via intraperitoneal (70 mg/kg); n=7 para cada grupo. Dose de cloprostenol (controle positivo): 150 μ g/kg. Foram comparados estatisticamente os experimentos com e sem N-nitro-L-argininametilester, referentes ao mesmo tratamento. Teste t.

Tabela 14. Média $\pm$ Erro Padrão (EP) da área relativa de lesão da atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *P. tenellus* na dosagem de 400 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado em animais pré-tratados com N-nitro-L-arginina metilester (**L-NA+Clo:** N-nitro-L-argininametilester+Cloprostenol. **L-NA+FA:** N-nitro-L-argininametilester +Fração Acetato de Etila. **L-NA+Água:** N-nitro-L-argininametilester+Água. **Sal+Clo:** Salina+Cloprostenol. **Sal+FA:** Salina+Fração acetato de Etila).

	L-NA+Clo	L-NA+FA	L-NA+Água	Sal+Clo	Sal+FA	Sal+Água
Média$\pm$EP(%)	1,55 $\pm$ 0,46	2,46 $\pm$ 1,10	18,97 $\pm$ 0,81	0,22 $\pm$ 0,22	0,86 $\pm$ 0,33	8,53 $\pm$ 1,29

Foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos, tratados ou não com L-NAME. Isso indica que a fração acetato de etila de *P. tenellus*, não atua

pelo mecanismo de proteção que envolve a participação de NO, pois não houve diferença significativa entre os grupos L-NAME+FA e salina+FA.

Em função dos resultados obtidos nos ensaios de úlcera aguda, conclui-se que há tendência de envolvimento de grupos sulfidrilas na gastroproteção da mucosa gástrica, pois no ensaio utilizando o NEM houve diferença significativa nos resultados.

No ensaio subagudo as úlceras gástricas foram induzidas por ácido acético. As úlceras induzidas aparecem com grau de tamanho e severidade constante com uma incidência de 100% nos animais. Assemelham-se com a úlcera humana em termos patológicos e mecanismo de cicatrização, e por último, respondem a vários fármacos antiúlcera, tais como: inibidores de bomba de prótons, sulcrafato e diversos fatores de crescimento. Okabe e Amagase (2005) sugerem que o mecanismo pelo qual a úlcera induzida por ácido acético se desenvolve é por necrose isquêmica na mucosa gástrica. De acordo com o artigo de revisão, a úlcera péptica ocorre por falta de suprimentos de oxigênio e nutrientes, além de formação de radicais livres, causada por injúria vascular. A mucosa necrosada e a liberação de leucotrieno B₄ atraem os leucócitos, os quais irão fagocitar o tecido necrótico e liberar citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo: TGF- α (fator de crescimento transformante alfa), TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), IL-1 α (interleucina-1alfa) e IL-1 β (interleucina-1 β) ativando os fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, com a finalidade de restabelecer a integridade física e cicatrizar a mucosa gástrica (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI, 2010). O objetivo deste trabalho não foi estudar os mediadores químicos, porém vimos que estão envolvidos tanto na cicatrização como na proteção da mucosa gástrica, assim os estudos posteriores certamente terão como foco os mediadores químicos.

No ensaio de úlcera subaguda houve diferença significativa na redução da área de lesão gástrica nas doses testadas do extrato hidroetanólico (100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg) comparado com o controle negativo, após 7 dias de tratamento, no entanto, não houve uma tendência à diminuição das úlceras gástricas com o aumento da dose (**Figura 29**).

Área Relativa de Lesão Ulcerativa (Média±EP)

Figura 29. Atividade antiúlcera subaguda do extrato hidroetanólico de *Phyllanthus tenellus* em diferentes doses em modelo de indução por ácido acético 100%; Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/Kg; n=5-8; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação ao controle negativo (água). ANOVA seguido de Teste Dunnett's.

A cicatrização de úlcera é um processo complexo que envolve migração e proliferação celular, re-epitelização, angiogênese e deposição de matriz extracelular, resultando na cicatrização da lesão. Estes eventos são regulados por citocinas, fatores de crescimento e fatores de transcrição (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI, 2010). O aumento da expressão de COX-2 e de prostaglandina também foi relacionado como fator importante na cicatrização da úlcera gástrica induzida por ácido acético (KONTUREK et al., 2008).

Complementando o estudo foi realizada avaliação histológica dos estômagos dos animais submetidos ao ensaio antiúlcera subagudo, conforme pode ser verificado nas figuras abaixo.

Figura 30. Fotomicrografia de corte histológico de parede gástrica de rato, com lesão ulcerada experimentalmente induzida por ácido acético a 100%. Dois dias após a cirurgia, foi administrado por via oral (contenção manual) o volume de 10 mL/kg do extrato hidroetanólico nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg de *P. tenellus* em suspensão aquosa, durante 7 dias. Para os animais do grupo controle negativo foi administrada, por via oral, água destilada (1mL/100g de animal). O fármaco de referência utilizado foi o lansoprazol (30 mg/kg) administrado ao grupo controle positivo. Nesse período houve regeneração do epitélio da mucosa e reparação com cicatrização da lamina própria da mucosa com proliferação fibroblástica e neoformação (tecido de granulação). A) Área de lesão sem regeneração do epitélio da mucosa, indicado pela seta. B) Área de cicatrização, tecido de fibroblasto, vaso neoformado, indicado pela seta. C e D) Área de lesão com muito colágeno (cicatrização bem avançada), indicado pela seta. D) reparação com cicatrização da lamina própria da mucosa com proliferação fibroblástica e neoformação (tecido de granulação), indicado pela seta. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 2x (figura A), 4x (figura B).

Neste trabalho as células não foram quantificadas, porém na avaliação microscópica, foi visualizado um grande aumento regenerativo do epitélio da mucosa e reparação com cicatrização da lamina própria da mucosa com proliferação fibroblástica

e neoformação de vasos sanguíneos, e grande deposição de colágeno evidenciando que o processo de cicatrização e regeneração está ocorrendo após o tratamento com o extrato hidroetanólico de *P. tenellus*.

Este trabalho indica atividade antiúlcera nos modelos ensaiados, pois a molécula isolada (di-hidromericitina) da fração acetato de etila de *Phyllanthus tenellus* pertencente classe dos flavonoides, responsável pela atividade antioxidante, proporciona uma possível interação com radicais sulfídrilas promovendo um potencial terapêutico desta espécie sendo muito utilizada pela população. No entanto, mais investigações são necessárias para confirmar o mecanismo de ação dos flavonoides presentes nesta espécie, além da possível participação de outros compostos nos processos de gastroproteção e cicatrização de lesões gástricas observados no presente estudo.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

Os extratos de *P. tenellus* ainda não haviam sido estudados quanto a uma possível atividade antiúlcera, sendo que através dos diferentes modelos testados é possível extrair algumas conclusões.

O extrato bruto e frações acetato de etila e aquosa de *P. tenellus* exercem uma tendência à ação protetora na mucosa gástrica, verificado no processo de indução por etanol acidificado. No ensaio com extrato hidroetanólico observou-se gastroproteção na dose de 400 mg/kg, enquanto que na fração aquosa foi a partir de 200 mg/kg;

Os grupamentos sulfidrilas possivelmente estão envolvidos na proteção da mucosa gástrica, verificado através do ensaio da fração de acetato de etila de *P. tenellus* com NEM.

O processo de cicatrização de úlceras subagudas, induzidas por ácido acético, foi facilitado pela administração do extrato hidroetanólico de *P. tenellus* (doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg), verificado pela redução da fração de volume ocupada por células polimorfonucleares, com proliferação fibroblástica e neoformação (tecido de granulação) no local da lesão e pelo tamanho da úlcera.

Verificou-se na quantificação de flavonoides e compostos fenólicos que a fração acetato de etila possui maior concentração desses compostos, seguido do extrato hidroetanólico e fração aquosa.

O extrato hidroetanólico, fração aquosa e principalmente a fração acetato de etila de partes aéreas de *P. tenellus* possuem capacidade antioxidante, confirmada por ensaio *in vitro* por meio do sequestro do radical DPPH;

Di-hidromiricetina pertence ao grupo dos flavonoides sendo isolada da fração acetato de etila, portanto esta molécula deve estar envolvida no mecanismo de gastroproteção e cicatrização de úlceras gástricas.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

ABDELWAHAB, S.; HASSAN, L.; SIRAT, H.; YAGI, S.; KOKO, W.; MOHAN, S.; TAHA, M.; AHMAD, S.; CHUEN, C.; NARRIMA, P.; RAIS, M.; HADI, A. Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition, **Fitoterapia** v.82, p.1190–1197, 2011.

AEBI, H. **Catalase. Methods in Enzymology**, v.105, p.121–126, 1984.

AHMAD, H.; ALI, N.; AHMAD, B.; KHAN, I. Screening of *solanum surrattense* for antibacterial, antifungal, phytotoxic and haemagglutination. **Journal Traditional Chineses Medical** v.32, p.616–620, 2012.

AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plants tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v.2, n.4, 2007.

AL-REHAILY, A. J.; AL-HOWIRINY, T. A.; AL-SOHAIBANI, M. O.; RAFATULLAH, S. Gastroprotective effects of ‘Amla’ *Emblica officinalis* on in vivo test models in rats. **Phytomedicine**, v.9, p.515-522, 2002.

AMANDEEP, K., ROBIN, S., RAMICA, S., SUNIL, K. Peptic ulcer: a review of etiology and pathogenesis. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v.3, p.34-38, 2012.

AMIN, Z. A.; ABDULLA, M. A.; ALI, H. M.; ALSHAWSHA, M. A.; QADIRC, S. W. Assessment of In vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1874 – 1877, 2012.

ANVISA (Brasil). Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1. Acesso em: 13/05/2013.

ASOKKUMAR, K.; SEN, S.; UMAMAHESWARI, M.; SIVASHANMUGAM, A. T.; SUBHADRADEVI, V. Synergistic effect of the combination of gallic acid and famotidine in protection of rat gastric mucosa. **Journal of Pharmacology**, v.66, p.594–599, 2014.

AUTORE, G.; RASTRELLI, L.; M.R. MARZOCCO, L. S.; SORRENTINO, R.; PINTO, A.; AQUINO, R. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. **Life Science**, v. 70, p. 523-534, 2001.

BABU, T. H.; MANJULATHA, K.; KUMAR, G. S.; HYMAVATHI, A.; TIWARI, A. K.; PUROHIT, M.; RAO, J. M.; BABU, K. S. Gastroprotective flavonoid constituents from *Oroxylum indicum* Vent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p.117-120, 2010.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 41, 2005.

BANDYOPADHYAY, D.; BISWAS, K.; BHATTACHARYYA, M.; REITER, R. J.; BANERJEE, R. K. 2002. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration: protection by melatonin. **Indian Journal Experimental Biology**, v.40, p.693–705, 2002.

BAROCELLI, E.; CHIAVARINI, M.; BALLABENI, V.; BARLOCCO, D.; VIANELLO, P.; DAL PIAZ, V.; IMPICCIATORE, M. Study of the antisecretory and antiulcer mechanism of a new indenopyridazinone derivative in rats. **Pharmacological Research**, v.35, p.487–492, 1997.

BATKHUU, J.; HATTORI, K.; TAKANO, F.; FUSHIYA, S.; OSHIMAN, K.; FUJIMIYA, Y. Suppression of NO production in activated macrophages in vitro and ex vivo by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1169–1174, 2002.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILHO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of Citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.12, 1997.

BORRELI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v.14, p.581-591, 2000.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; & Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensm. Wiss. Technology**, 28, 609–615, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas Medicinais de interesse ao SUS**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1. Acesso em: 25 de fevereiro 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BUCCIARELLI, A.; MINETTI, A.; MILCZAKOWSKY, C.; SKLIAR. Evaluation of Gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 1025-1030, 2010.

BRZOZOWSKI, T. *et al.* Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 33-55, 2005.

CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. FILHO, V. C.; YUNES, R. A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal Research Review**, V.18, p. 225–258, 1998.

CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T.; CRUZ, H.N.; SILVA, C.L.; VIOLANTE, F.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; THOMAS, G.; MARTINS, M.A.; TIBIRICA, E.V.; NOEL, F. Yangambin: a new naturally-occurring platelet-activating factor receptor antagonist: binding and in vitro functional studies. **Planta Medical**, v. 61, p. 101–105, 1995.

CERVINI-SILVA, J.; CAMACHO, A.; KAUFHOLD, S.; UFER, K.; DE JESUS, E. The anti-inflammatory activity of bentonites. **Applied Clay Science**, v. 118, p. 56-60, 2015.

CHENG, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414-420, 2013.

CHOUHAN, H. S.; SINGH, S. K. Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1337–1344, 2011.

CROEN, K. D. Evidence for an antiviral effect of nitric oxide. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 2446–2452, 1993.

DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SINHORINI, I. L.; WU, T.S.; RIZZI, M. B. S. L.; PENTEADO, V. C.; MORENO, F. S. Beta-carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Pathology**, v. 30, p. 259-266, 1998.

DAVIES, N.; SHARKEY, K.; ASFAHA, S.; MACNAUGHTON, W.; WALLACE, J. Aspirin causes rapid up-regulation of cyclo-oxygenase-2 expression in the stomach of rats. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.11, p. 1101–8, 1997.

DEVAULT, K. R.; TALLEY, N. J. Insights in to the future of gastric acid suppression. **Natural Review Gastroenterology Hepatology**, v.6, p.524–532, 2009.

DEVI, K.; RAJA, N.; PALANIVELU, M.; SRINIVASAN, B.; RAJARATHINAM, D.; KIRAN, C. K.; NIRANJAN, P. Anti Ulcer Activity of The Leaves of *Punica Granatum* Linn. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v.1, n.4, 2011.

DHASAN, P. B.; JEGADEESAN, M.; KAVIMANI, S. Antiulcer activity of aqueous extract of fruits of *Momordica cymbalaria* Hook f. in Wistar rats. **Research Pharmacognosy**, v.2, p.58-67, 2010.

DIAS, P.; FOGLIO, M.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p. 57–62, 2000.

ELLIOT, S.; MSKNIGHT, W.; CIRINO, G.; WALLACE, J. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Journal of Gastroenterology**, v.109, p.524–530, 1995.

ERLUND, I.; KOSONEM, T.; MAENPAA; PERTTUNEM, K.; KENRAALI, J.; PARANTAINEM, J.; ARO, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 56, p. 545-553, 2000.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1959. p.35 a 36.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed. São Paulo: ANVISA, 2010. p.1235 a 1240.

FOLKMAN, J., SZABO, S., STOVROFF, M., MCNEIL, N., LI, W. & SHING, Y. Duodenal ulcer. Discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy that accelerates healing. **Annals of Surgery**, v.241, p. 414–425, 1991.

FLAMAND, N.; PLANT, H.; PICARD, S.; LAVIOLETTE, M.; BORGEAT, P. Histamine-induced inhibition of leukotriene biosynthesis in human neutrophils: involvement of the H₂ receptor and Camp. **British Journal of Pharmacology**, v.141, p. 552-561, 2004.

FREITAS, F.F.B.P.; *et al.* Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, 137:700-708, 2011.

GARCIA, C. M. Estudo Morfo-Anatômico de *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.23, n.1, p.67-70, 2004.

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

GOODMAN; GILMAN. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p.869-882, 2007.

GONZALEZ, F. G.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* mice. *Phytomed*, V.9. p.125 – 134, 2002.

GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; LÓPEZ-POSADAS, R.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELA, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, p. 331-362, 2011.

GOTTLIEB, O.R. The rational search for natural neolignans. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, p.25–29, 1991.

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.48. p.487 – 491, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 715-722, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. *International Journal of Radiation Biology*, v.58. p. 725 – 725, 1990.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1984.

HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemical*, v. 95, p. 180 -185, 2006.

HASE, K.; OHSUGI, M.; XIONG, Q.; BASNET, P.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. On Experimental Liver Injuries Induced by Carbon Tetrachlorid ou DGalactosamine/Lipopolysaccharide. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 20(4), p. 381-385, 1997.

HEEBA, G. B.; HASSAN, M. K.; AMIN, R. S. Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: role of nitric oxide and prostaglandins. **Europe Journal Pharmacology**, v.607, p.188–193, 2009.

HEMAMALINI, K.; SUVIDHA, S.; ANRUGAG, B.; AMA, V. Evaluation of Anti-ulcer activity of kigelia africana, Sophora interrupta and Holoptera integrifolia in rats. **International Journal of Reserch in Phytochemistry**, v.2, n.2, p.84-89,2012.

HERNANDES, L. S. **Farmacologia e Fitoquímica dos extratos de Pothomorphe umbellata (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera.** São Paulo, 2011. 64 p. Tese de mestrado apresentado ao programa de Pós- graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, 2011.

HIRASAWA, N.; WATANABE, M.; MEU, S.; TSURUFUJI, S.; OHUCHI, K. Downward regulation of neutrophil infiltration by endogenous histamine without affecting vascular permeability responses in air-pouche-type carragenin inflammation in rats. **Inflammation**, v.15, n. 2, p. 117-126, 1991.

HIRUMA-LIMA, C. A. The anti-ulcerogenic effects of *Curatella Americana* L. **Journal Ethnopharmacology**, v. 12q, p. 425-432, 2009.

HOOGERWERF, W. J.; PASRICHA, P. J. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease. The pharmacological basis of therapeutics. **Goodman and Gilman's**, p.869–882, 2006.

HUANG, R.; HUANG, Y.; OU, J.; CHEN, C.; HSU, F.; CHANG, C. Screening of 25 Compounds Isolated from *Phyllanthus* Species for Anti-Human Hepatitis B Virus *In Vitro*. **Phytotherapy Research**, p. 449-453, 2003.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IGNACIO, S.; FERREIRA, J.; ALMEIDA, M.; KUBELKA, C. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.181–187, 2001.

IVANOVA, A.; POPOVA, I.; NAZAROV, S. Effect of Antioxidants and Nitric Oxide on Activity of Peritoneal Macrophages in Albino Rats during Normal Pregnancy. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, vol. p. 532-534 154, 2013.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of National Cancer Institute**, v.70, p.343–347, 1983.

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

JOY, K.L., Kuttan, R. Antioxidant activity of selected plant extracts. **Amala Research Bulletin**, 15, 68–71, 1995.

JUNG, K.Y.; KIM, D.S.; OH, S.R.; PARK, S.H.; LEE, I.S.; LEE, J.J.; SHIN, D.H.; LEE, H.K. Magnone A and B, novel anti-PAF tetrahydrofuran lignans from the flower buds of *Magnolia fargesii*. **Journal of Nature Products**, v. 61, p. 808–811, 1998.

JÚNIOR, F.; OLIVEIRA, D.; BOLIGON, A.; ATHAYDE, M.; KAMDEM, J.; MACEDO, G.; SILVA, G.; MENEZES, I.; COSTA, J.; COUTINHO, H.; KERNTOPF, M.; POSSER, T. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.153, p.469–477, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 283-316, 2008.

KARAKOYUN, B.; YUKSEL, M.; ERCAN, F.; ERZİK, C.; YEGEN, B. C. Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. **Inflammation**, v. 32, n.1, 2009.

KASSUYA, C.A.L.; SILVESTRE, A.A.; REHDER, V.L.G.; CALIXTO, J.B. Antiallodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, p. 145–153, 2003.

KASSUYA, C.A.L.; LEITE, D.F.P.; DE MELO, L.V.; REHDER, V.L.G.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. **Planta Medica**, v. 71, p. 721–726, 2005.

KASSUYA, C. A. L.; SILVESTRE, A.; MENEZES-DE-LIMA, O.; MAROTTA, D. M.; REHDER, V. L. G.; CALIXTOS, J. B. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the

lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **Journal Europe Pharmacology**, v. 546, p. 182-188, 2006.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: Básica e Clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 867-881, 2006.

KESZTHELYI, D.; JANSEN, S. V.; SCHOUTEN, G. A.; KORT, S.; SCHOLTES, B.; ENGELS, L. G. J. B.; MASCLEE. Proton pump inhibitor use is associated with an increased risk for microscopic colitis: a case-control study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, p. 1124-1128, 2010.

KEUSGEN, M.; GLOMBITZA, K. W. Phlorethol, fufalols and their derivatives from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 975- 985, 1995.

KHALIFA, M. A.; HASSAN, M. K.; ASHOUR, O. M.; HEEBA, G. Evaluation of the anti-ulcer activity of pi-buti-di-nehydrochloride(IT-066); the new histamine (H₂)- receptor antagonist, in cold-restraint stress-and ethanol-induced ulcer models in rats. **AlAzhar Medicinal Journal**, v.31,p.33–47, 2002.

KHAN, M.; JAIS, A.; AFREEN, A. Prostaglandin Analogous and Antioxidant Activity Mediated Gastroprotective Action of *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. Flower Methanolic Extract against Chemically Induced Gastric Ulcers in Rats. **BioMed Research International**, 2013.

KIEMER, A.K.; HARTUNG, T.; HUBER, C.; VOLLMAR, A.M. *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. **Journal of Hepatology**, v. 38, p. 289–297, 2003.

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO, J.; NAKAZAWA, S. Infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological Research**, v.43, 2001.

KOGA, T.; SHIBAHARA, K.; KABASHIMA, A. Overexpression of cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in human gastric cancer. **Hepatogastroenterology**, v.51, p. 1626–30, 2004.

KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale*L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacol**, v.112. p. 237 – 242, 2007.

KONTUREK, S.; BILSKI, J.; KINTUREK, P.; CIESZKOWSKI, M.; PAWLIK, W. Role of endogenous nitric oxide in the control of canine pancreatic secretion and blood flow. **Journal of Gastroenterology**, p. 104, 1993.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BURNAT, G.; BRZOZOWSKI, T.; BRZOZOWSKA, I.; REITER, R. J. Dynamical physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. **Journal of Pineal Research**, v.45, p. 180-190, 2008.

KUMARAN, A.; KARUMAKARAN, R. J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **Food Science and Technology**, v.40. p. 344 – 352, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins Patologia Básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 68-64, p. 647-651, 2008.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v. 209, p.497–499, 1980.

LAKHANPAL, P.; KAI, D. K. Quercetin: A Versatile Flavonoid. **Internet Journal of Medical Uptodate**, v.2, p. 22-37, 2007.

LEE, I.S.; JUNG, K.Y.; OH, S.R.; PARK, S.H.; AHN, K.S.; LEE, H.K. Structure–activity relationships of lignans from *Schisandra chinensis* as platelet activating factor antagonists. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p.265–267, 1999.

LI, S. L.; ZHAO, J. R.; REN, X. Y.; XIE, J. P.; MA, Q. Z.; RONG, Q. H. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 associated with gastric ulcer recurrence. **World Journal Gastroenterology**, v.19, p.4590-4595, 2013.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Natural Review Drug. Discovered**, v.7, p.156–167, 2008.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACMICKING, J. D.; NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323–350, 1997.

MACRAE, W.D.; TOWERS, G.H.N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1207–1220, 1984.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plants against plant and human pathogens. **World Journal Agricultural Science** v.4, p.839–843, 2008.

MAITY, P.; BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. The use of neem for controlling gastric hyperacidity and ulcer. **Phytotherapy Research**. v.23, p.747–755, 2009.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K.; McCOLL, K. E. L. Peptic ulcer Disease. **The Lancet**, v.374, n.9699, p.1449-1461, 2009.

MANDELBAUM, S. H.; Di SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, p.393-410, 2003.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso racional de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v.46, n.3, p.234-239, 1998.

MARTESKA, M. Quercetin and its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.58, p.407-413, 2008.

MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. Chromatographic profile of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.400, p.469 – 481, 2011.

MATSUDA, H. LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotections of escins Ia, Ib, IIa and IIb on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 373, p. 63-70, 1999.

MEHTA, K.; PATEL, B. N.; JAIN, B. K. Antimicrobial Activity of root extract of *Phyllanthus fraternus* Webster: An Ethnomedicinal plant. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 3, p. 2277-2502, 2014.

MIN, Y. S.; LEE, S. E.; HONG, S. T.; KIM, H. S.; CHOI, B. C.; SIM, S. S.; WHANG, W. K.; SOHN, U. D. The inhibitory effect of quercetin-3-O- β -D-glucuronopyranoside on gastritis and reflux esophagitis in rats. **Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v.13, p.295–300, 2009.

MIRANDA, G.S.; SANTANA, G.S.; MACHADO B.B.; COELHO, F.P.; CARVALHO, C.A. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.104-111, 2013.

MIRUNALINI, S.; VAITHIYANATHAN, V.; KRISHNAVENI, M. AMLA: A novel ayurvedic herb as a functional food for health benefits - A mini review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.1, 2012.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.33, p.939-945, 1983.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimation antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109–142, 1991.

MÖSSER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v.35, p.469-475, 2005.

MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F. LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Flavonoids with Gastroprotective activity. **Molecules**, 14, p. 979-1012, 2009.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, v.33, p. 323-336, 2002.

NARASIMHUDU, C.; RAJU, R. Phytochemical constituents of *Phyllanthus* species (Euphorbiaceae) from eastern ghats of andhra Pradesh. **International research Journal of Pharmacy**, p. 184-200, 2012.

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA e SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NATALE, G.; *et al.* Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 62– 72, 2004.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acid ulcer models-the history and state of the art of peptic research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.8, p.1321—1341, 2005.

OKWU, D. E.; NNANDI, F. U. Exotic multifaceted medicinal plants of drugs and pharmaceutical industries. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 25, p. 7271-7282, 2009.

OLIVEIRA, F. D.; PEREIRA, A. C.; FIGUEIREDO, H.; CARVALHO, D. A.; SILVA, G.; NUNES, A. S.; ALVES, D. S.; CARVALHO, H. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v. 78, p. 142–145, 2007.

OSAWA, T. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In URITANI, I.; GARCIA, V. V.; MENDOZA, E. M. Postharvest biochemistry of plant food-materials in the tropics. **Japan Scientific Societies Press**, p. 241–251, 1994.

Phyllanthus amarus extracts on absolute ethanol-induced ulcer in albino rats. **Planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. 5ª ed., p.1102.

PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, p. 384-405, 2010.

POZZI, A.C.S. **Desenvolvimento de Métodos de Análise Espectrofotométrica de Flavonóides do “Maracujá”**. Tese de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – 2007.

PRANDO, T. B. L.; BARBOZA, L. N.; GASPAROTTO, F. M.; ARAUJO, V. O.; TIRLONI, C. A. S.; SOUZA, L. M.; LOURENÇO, E. L. B.; JUNIOR, A. G. Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p.369–378, 2015.

PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 238-288, 2005.

PROVITAL GROUP. Myriceline. Centerchem, Inc., 2004. Disponível em: <http://www.centerchem.com>, acesso em: 29/03/2016.

RACHCHH, M. A.; JAIN, S. M. Gastroprotective effect of Benincasa hispida fruit extract. **Indian Journal of Pharmacology**, v.40. p.271–275, 2008.

RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier p. 385-390, 2011.

RAPHAEL, K. KUTTAN, R.; Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 87, 193 – 197, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobioteecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, p. 372, 1997.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.; LANCASTER, C.; DAVIS, j.; FIEL, S.; HANCHAR, A. Mild irritants prevent gastric necrosis through “adaptive cytoprotection” mediated by prostaglandins. **Journal Physiology**. v.245, p. G113–G121, 1983.

ROBINSON, M.M.; ZHANG, X. **The world medicines situations 2011**: tradicional medicines: global situations, issues and challenges. 3.ed. Geneva: World Health Organization, 2011. 12p. Disponível em: <http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf>. Acesso em: 15 março 2013.

ROCHA, N. F. M.; OLIVEIRA, G. V.; ARAÚJO, F. Y. R.; RIOS, E. R. V.; CARVALHO, A. M. R.; VASCNCELOS, L. F.; MACÊDO, D. S.; SOARES, P. M. G.; DE SOUSA, D. P.; SOUSA, F. C. F. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection os associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, p. 455-461, 2011.

SAIRAM, K.; RAO, C. V.; BABUD.; KUMAR, M. K. V.; AGRAWAL, V.K.; GOEL, R.K. Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Emblica officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.82, p.1-9, 2002.

SANKAR, R.; MURUGA, A.; SIVAKUMAR, V. Anti-inflammatory, Anti-ulcer, Antipyretic, Analgesic and Cns Stimulant Activies of Manine Bryozoan *Zoobotryon verticillatum*. **Pharmacologia**, v.4, n.1, p.15-21,2013.

SANTOS, M. S.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FERREIRA, A. G.; BOFFO, E. F.; FIGUEIRA, G. M. Authenticity study of *Phyllanthus* species by NMR and FT-IR techniques coupled with chemometric methods. **Quim. Nova**, v.35, n.11, p.2210-2217, 2012.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogênica activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal Ethnopharmacology**, v.97, p. 1-6, 2005.

SARG, T.; ABDEL- GHANI, A.; ZAYED, R.; EL-SAYED, M. Bioactive compounds from *Phyllanthus atropurpureus*. **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 10-20, 2012.

SCHMASSMANN, A., TARNAWSKI, A., PESKAR, B.M., VARGA, L., FLOGERZI, B. & HALTER, F. Influence of acid and angiogenesis on kinetics of gastric ulcer healing in rats: interaction with indomethacin. **American Journal Physiology**, v.268, p. G276–G285, 1995.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SEMWAL, D. K.; SEMWAL, R. B. Ethnobotany, Pharmacology and Phytochemistry of the Genus *Phoebe* (Lauraceae). **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v.10, p.12-26, 2013.

SERENIK, A.; VITAL, M. A.; A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Artigo de Revisão**, Universidade Federal do Paraná, 2008.

SHEN, Y. et al. Dihydromyricetin as a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 390-401, 2012.

SHIRWAIKAR, A. ; RAJENDRAN, K. ; KUMAR, C. D. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona Squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 3 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.171 – 5, 2004.

SHOKUNBI, O. S.; ODETOLA, A. A. Gastroprotective and antioxidant activities of *Phyllanthus amarus* extracts on absolute ethanolinduced ulcer in albino rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, p. 261-267, 2008.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 687-719, 2010.

SILAMBUJANAKI, P.; CHITRA, V.; DURGAPRASAD, K.; RAJU, D.; SANKARI, M.; SONI, D. Anti-ulcer activity of methanolic extract of *Hibiscus cannabinus* (Leaves) in wistar strain rats. **Scholars Research Library**, v.2, n.2, p.223-228, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5.ed. ver.amp. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC; p.577-614, 2007.

SINGH, R. P.; MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 81–86, 2002.

SOBREIRA, F. C. **Avaliação da Atividade Antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Crassulaceae)**. São Paulo, 2013. 106 p. Tese de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOHN, J.H.; HAN, K. L.; LEE, S. H.; HWANG, J. K. Protective effects of panduratin A against oxidative damage of *tert*-butylhydroperoxide in human HepG2 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1083–1086, 2005.

SOLL, A.; WEINSTEIN, W.; KURATA, J.; MCCARTHY, D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer disease. **Ann. Intern. Med.** Vol. 114, p. 307–19, 1991.

SONNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogênica activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.1-6, 2005.

SOUSA, P. J. C.; ROCHA, J. C. S.; PESSOA, A. M.; ALVES, L. A. D.; CARVALHO, J. C. T. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.1, p. 60-64, 2005.

SHEN, T.Y.; HWANG, S.B.; CHANG, M.N.; DOEBBER, T.W.; LAM, M.H.; WU, M.S.; WANG, X. The isolation and characterization of kadsurenone from haifenteng (*Piper futokadsura*) as an orally active specific receptor antagonist of platelet-activating factor. **International Journal Tissue Reactions**, v.7, p.339–343, 1985.

SPRENGER, R. F.; CASS, Q. B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1291, p.97-103, 2013.

SRIRAMA, R.; DEEPAK, H. B.; SENTHILKUMAR, U.; RAVIKANTH, G.; GURUMURTHY, B. R.; SHIVANNA, M. B.; CHANDRASEKARAN, C. V.; AGARWAL.

A.; UMA SHANNKER. R. Hepatoprotective activity of Indian *Phyllanthus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 948 – 953, 2012.

SZABO, S.; GALLACHER, G.; HORNER, H.; FRANKEL, P.; UNDRWOOD, S.; KONTUREK, S.; BRZOZOWSKI, T. Role of the adrenal cortex in gastric mucosal protection by prostaglandins, sulfhydryls and cimetidine in the rat. **Gastroenterology**, v.851, p.384–1390, 1983.

SZABO, S. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p. 201–202, 1981.

SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TSUGAWA, H.; MOGAMI, S.; HIBI, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal Clinical Biochemecanism Nutrition**, v.50, p.35–39, 2012.

TAHA, M. M. E.; SALGA, M. S.; ALI, H. M.; ABDULLA, M. A.; ABDELWAHAB, S. I.; HADI, A. H. A. 2012. Gastroprotective activity esofarbutin role. **Journal Ethnopharmacology**, v.141, p.273–281, 2012.

TAKEUCHI, K.; ARAKI, H.; UMEDA, M.; KOMOIKE, Y.; SUZUKI, K. Adaptive gastric cytoprotection is mediated by prostaglandin EP1 receptors: a study using rats and knockout mice. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v.297, p.1160–1165, 2001.

TARIQ, M.; KHAN, H. A.; ELFAKI, I.; ARSHADUDDIN, M.; AL MOUTAERY, M.; AL RAYES, H. Gastric antisecretory and antiulcer effects of simvastatin in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, p. 2316–23, 2007.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastroprotective ulcer healing. **Digestive Disease and Science**, v.50, n.1, p.S24-S33, 2005.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastroprotective ulcer healing: state of the art 2010. **Gastroenterologia Polska**, v.17, n.3, p.171-179, 2010.

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

THABREW, M. I.; HUGHES, R. D.; Mc FARLANE, I. G. Screening of hepatoprotective plant components using a HepG2 cell cytotoxicity assay. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, p. 1132–1135, 1997.

THE PLANT LIST. Quick Name Search. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em: 26 agos. 2015.

TOMA, W., GUIMARÃES, L. L., BRITO, A. R. M. S., SANTOS, A. R., CORTEZ, F. S., PUSCEDUU, F. H., CESAR, A., JÚNIOR, L. S., PACHECO, M. T. T., PEREIRA, C. D. S. Safflower oil: an integrated assessment of phytochemistry, antiulcerogenic activity, and rodent and environmental toxicity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, p.538-544, 2014.

TOMA, W.; GRACIOSO, J.S.; ANDRADE, F.D.P.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.9, p.1151-1155, 2002.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v.12, p. 593-606, 2007.

UNANDER, D. W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): IV. Clustering of antiviral uses and other effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p. 1–18, 1995.

ÜSTÜN, O.; ÖXÇELİK, B.; AKUÖN, Y.; ABBASOĞLU, U.; YESİLADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **Journal Ethnopharmacology**, v.108, p.457–461, 2006.

VANE, J.; BOTTING, R. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Journal of Inflammation Research**, v. 44, p. 1–10, 1995.

VASUDEVA, N.; YADAV, N.; SHARMA, S. K. Natural products: a safest approach for obesity. **Chinese Journal Integral Medical**, v. 18, p. 473-480, 2012.

VENDRAMINI-COSTA, D.; MONTEIRO, K.; IWAMOTO, L.; JORGE, M.; TINTI, S.; PILLI, R.; CARVALHO, J. Gastroprotective effects of goniothalamin against ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in rats: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryl compounds. **Chemico-Biological Interactions**, v.224, p.206–212, 2014.

VICTORIO, C. P.; LEAL-COSTA, M. V.; TAVARES, E. S.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Effects of Supplemental UV-A on the Development, Anatomy and Metabolite Production of *Phyllanthus tenellus* Cultured In Vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v.87, p.685-689, 2011.

VIEIRA, M. N.; WINTERHALTER, P.; JERZ, G. Flavonoids from the flowers of *Impatiens glandulifera* Royle isolated by high performance countercurrent chromatography. **Phytochemical Analyses**, 2016.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1060-1066, 2008.

YESİLADA, E.; SESİK, E.; FUJITA, T.; TANAKA, T.; TABATA, M. Screening of some Turkish Medicinal Plants for their anti-ulcerogenic activities. **Phytotherapy Research**, v.7, p. 263–2, 1993.

YESILADA, E.; GÜRBÜZ, I.; b, TOKER, G. Anti-ulcerogenic activity and isolation of the active principles from *Sambucus ebulus* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.153, p.478-483, 2014.

YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONGJIAN, J.; YOUNG, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical biology and Medicine**, v. 9, p. 19–21, 1990.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: thin layer chromatography atlas**. 2.ed Berlin: Springer, p.384, 1996.

WALDUM, H. L.; GUSTAFSSON, B.; FOSSMARK, R.; QVIGSTAD, G. Antiulcer drugs and gastric cancer. **Digestive Disorder Science**, v.50, p.S39–S44, 2005.

WANASUNDARA, P. K.; SHAHIDI, F. Optimigation of hexametaphosphate-assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 604–607, 1996.

WEIBEL, E. R. **Stereological Methods**, v.1, London: Academic Press, 1979.

WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation Protocols**. 1.ed. New Jersey: Humana Press, 2003.

ZACARIA, Z. A.; SOMCHIT, N.M.; MAT JAIS, A. M.; TEH, L. K.; SALLEH, M. Z.; LONG, K. In vivo antinociceptive and anti-inflammatory activities of dried and fermented processed virgin coconut oil. **Medical Principal Practical**, v. 20, p. 231-236, 2011.

ZHANG, Y.S.; NING, Z.X.; YANG, S.Z.; WU, H. Antioxidation properties and mechanism of action of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata*. **Yao Xue Xue Bao.**, v. 38(4), p. 241-244, 2003.

ZAKARIA, Z. A.; ALAN, T.; MAMAT, S. S.; MOHTARRUDIN, N.; KEK, T. L.; SALLEH, M. Z. Mechanisms of gastroprotection of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 135, 2015.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extract. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.56, n.1, p.219-231, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in select herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 5165 – 5170, 2001.