



Antiulcerogenic activity of the ethanolic extract of *Licania macrophylla* Benth

Priscila Faimann Sales*

Patrícia de Almeida Nóbrega*

Alessandra Azevedo do Nascimento*

Felipe Ricardo Ferreira Brito Corrêa**

Giovanna Nascimento de Veiga Cabral**

Egínia Gonçalves da Silva***

Abstract

The *Licania macrophylla* Benth species, popularly known as “anauerá”, “anuera”, “anoerá”, “ana-wyra” and “wayäpi”, is widely found in the Amazon. Here, riverine communities use different parts of the plant for the treatment of amoebiasis, dysenteric disorders, wound healing and anti-inflammatory actions. The present study aims to investigate the gastroprotective activity of ethanolic extract of *L. macrophylla* stem bark in experimental animals. For this purpose, different experimental models for gastric ulcer induction were performed, such as absolute ethanol (99.5%), acidified ethanol (60%/0.3M HCl), and the non-steroidal anti-inflammatory drug model (indomethacin). In this study, 25-30g female Swiss mice were used for the absolute and acidified ethanol experimental models, and 200-300g female Wistar rats were used for the non-steroidal anti-inflammatory drug model. Each experimental model was divided into groups of five (5) animals for each tested dose of *L. macrophylla* extract (100, 250 and 625 mg/kg), as well as for the negative (vehicle) and positive (carbenoxolone) control groups. All administrations were performed orally, with a volume ratio of a maximum of 10 ml/kg body weight for mice and 100 ml/kg for rats. After each experiment, stomachs were evaluated to determine the following parameters: total lesion area, ulcer percentage, ulcerative lesion index, cure percentage. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Dunnett post-test, considering significant values when $p < 0.05$. The ethanolic extract of *L. macrophylla* showed gastroprotective effect against gastric lesions induced by absolute ethanol, significantly reducing the established parameters (250 and 625 mg/kg), promoting a cure rate of $53.76 \pm 5.71\%$ and $84.15 \pm 1.89\%$, respectively. For the experimental protocol performed with acidified ethanol the results showed that the animals treated with the *L. macrophylla* ethanolic extract at the doses of 250 and 625 mg/kg, lesions decreased significantly when analyzing the established parameters, obtaining as a cure percentage of $52.34 \pm 4.83\%$ and $83.86 \pm 2.46\%$, respectively. The ethanolic extract of *L. macrophylla* in the non-steroidal anti-inflammatory gastric lesion induction model was able to significantly reduce lesions for all doses tested (100, 250 and 625 mg/kg) in the established parameters, with a cure percentage (%) of $84.46 \pm 1.33\%$, $75.00 \pm 3.71\%$ and $72.27 \pm 2.06\%$, respectively. In conclusion, *L. macrophylla* extract demonstrates antiulcerogenic activity in the acid and absolute ethanol induction models, as well as in the ulcer model induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs with significant gastroprotective activity.

Keywords: Medicinal plants. Crude extract. Anauerá. Gastric ulcer.

INTRODUCTION

Gastric ulcers are lesions that occur in the stomach wall, characterized by bleeding and perforation¹, and are progressive disorders that have a great impact on the patient's quality of life².

The emergence of gastric ulcers is considered a multifactorial process that results from the

imbalance between the aggressing factors and the mucosal protectors. Among the aggressive factors is the secretion of acid, pepsin and free radicals that originate from stimuli related to living conditions such as stress, smoking, alcohol, continuous use of non-steroidal anti-inflammatory drugs - NSAIDs, ingestion of

DOI: 10.15343/0104-7809.20194304814833

*Universidade Federal do Amapá - PPGCS/UNIFAP. Macapá/AP, Brasil.

**Universidade Federal do Amapá/UNIFAP. Macapá- AP, Brasil.

***Faculdade Estácio de Macapá. Macapá- AP, Brasil.

E-mail: pfaimann@gmail.com





certain foods and the presence of *Helicobacter pylori*. Protective factors include the mucus barrier, bicarbonate, nitric oxide (NO), blood flow, prostaglandins and antioxidant defense^{2,3}.

Treatment of ulcers is based on restoring the balance of protective and aggressive factors to eliminate pain, promoting healing and preventing recurrent ulcers. With the understanding of the pathogenesis of peptic ulcers, several classes of drugs have emerged such as proton pump inhibitors (omeprazole, lansoprazole, pantoprazole), H₂ receptor antagonists (cimetidine, ranitidine, famotidine and nizatidine) and antibiotics in cases of *H. pylori* infection (amoxicillin). Other drugs have emerged to protect the mucosa as a cytoprotective agent (carbenoxolone, sucralfate, colloidal bismuth) and a prostaglandin analog (misoprostol)^{4,5}.

Drug therapy for the treatment of gastric ulcer confirms a high recurrence rate of the pathology, besides presenting significant side effects⁶. However, the search for new substances derived from natural products has been one of the main sources of discovery of new drugs with potentially more effective and safer therapeutic effects. Medicinal plants are sources of bioactive compounds such as flavonoids, alkaloids, terpenes, tannins, carotenoids and phenolic compounds. Such compounds contain various biological activities, especially compounds such as flavonoids, terpenoids and tannins, which are attributed to antiulcerogenic activity⁷.

The species *Licania macrophylla* Benth, belonging to the family Chrysobalanaceae, popularly known as “anauerá”, “anuera”, “anoerá”, “ana-wyra” and “wayãpi”, is a large tree that can reach up to 30 m in height. In the Amazon, it is popularly used for various purposes, such as being a potent antidysentery factor, wound healing, an amoebiasis treatment and having anti-inflammatory activity. According to the literature, no reports of its antiulcerogenic activity were reported^{8,9,10,11}.

The species *L. macrophylla* possesses, in its chemical composition, compounds such as flavonoids, chalcones and aurones, quinones, free steroids and tannins^{8,9,12}. In a study of methanolic extract of *L. macrophylla* stem bark and leaves, activity against bacterial

strains tested with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* were demonstrated⁹. Due to the potential therapeutic potential of this species, this study raises the following question: does the ethanolic extract of this species possess gastroprotective activity?

Materials and Methods

The stem bark of the *L. macrophylla* species was collected via waterway in a floodplain in the Maracá community, located on the Urubuzinho River, at the following coordinates (Lat. 0°24'46.83 S Long. 51°27'5.36 W), 32km away from Mazagão Velho, AP. The study material was sent to the Animal Experimentation Laboratory (LEA) of the Federal University of Amapá (UNIFAP). An exsiccate was prepared for the identification of the species and was then deposited in the Amapan Herbarium (HAMAB) of the Amapá State Institute of Scientific and Technological Research (IEPA), Macapá, AP.

To obtain the ethanolic extract of *L. macrophylla*, the bark of the stem was dried at 40°C for 72h. The material was fragmented and ground in a knife mill and turned powder, which underwent a cold maceration process using 1 kg of powder for every 5L of ethanol (1:5, weight/volume) as an ethanol solvent, agitating every 24 hours for 7 days. The extractive solution obtained was filtered and concentrated by evaporation at a temperature around 50°C. A viscous extract was obtained and was stored in a container for residual evaporation of the solvent until obtaining the dry/crude ethanol extract of *L. macrophylla* (EELM). The extract obtained a yield of 10.6%. For the experiments, the extract was weighed and solubilized in a solution of 5% DMSO to obtain different concentrations.

Drugs and Reagents Used

To determine antiulcerogenic activity and mechanism of action, hydrochloric acid p.a. (Alphatec), sodium bicarbonate (Alphatec), sodium chloride (Alphatec), ketoprofen (Sanofi) indomethacin (Sigma Aldrich), carbenoxolone



(Sigma Aldrich), xylazine (Vetbrands), ketamine (Ceva), ethanolic alcohol (Alphatec), ethyl alcohol p.a. (Alphatec), dimethylsulfoxide-DMSO (Prolab). All drugs were prepared immediately before use.

Animals

Female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 200-300 grams (n=25) and female Swiss mice (*Mus musculus albinus*) aged 6-7 weeks and weighing 25-30 grams (n=50) were used. The animals came from the Multidisciplinary Center for Biological Investigations in the area of Laboratory Animal Science - CEMIB, University of Campinas - UNICAMP. The animals were kept in plastic boxes in an experimental room for 7-10 days under controlled conditions of temperature (23±2°C), humidity (50±10%), a 12-hour light-dark cycle, with access *ad libitum* to Presence® brand ration and filtered water for the experiments.

For euthanasia of the animals after the experiments, ketamine and xylazine 40 and 5 mg/kg respectively, as well as anesthesia were administered intraperitoneally, according to the National Council for Animal Experimentation Control, Resolution Norm No. 13 from September 2013. Carcass disposal proceeded according to item 1.6 of the FCF-IQ/USP Laboratory Animal Care and Procedures Manual 2013¹³.

Experimental Design

For the evaluation of the antilcerogenic activity of the extract, gastric ulcer induction experiments were performed based on etiological factors of the disease in man such as absolute ethanol, acidified ethanol and NSAIDs. Each experimental model contained its respective negative/vehicle control groups (5% dimethylsulfoxide - DMSO), positive control (carbenoxolone 200 mg/kg), and test groups of three EELM dose amounts (100, 250, 625 mg/kg). The fasted animals were kept in a special cage with a wire mesh at the bottom (to avoid coprophagia).

At the end of each experimental protocol the stomachs were removed, opened through the greater curvature, washed in physiological solution (0.9% NaCl) and scanned to obtain the

images (HP G4050 scanner). After scanning, the obtained images were analyzed using the EARP software to measure the lesioned areas and to determine the following parameters: (a) total lesion area (TLA), (b) percentage of lesion area in relation to the area total stomach, (c) ulcerative lesion index (ULI); (d) inhibition or cure percent¹⁴.

(a) Σ Total Injury Area (mm²) (TLA);

(b) Percentage of Ulcers: Percentage of Injury Area in relation to Total Stomach Area

$$\% = \frac{\Sigma \text{ Lesion area } \times 100}{\text{Total area of the stomach}}$$

(c) Ulcerative Lesion Index (ULI)

Level 1: hemorrhaging points ≤ 1mm²

Level 2: 1 to 3mm² ulcerations

Level 3: Deep ulcerations ≥ 3mm²

$$ILU = (\Sigma \text{ Nível 1}) + (2 \times \Sigma \text{ Nível 2}) + (3 \times \Sigma \text{ Nível 3})$$

(c) Ulcerative Lesion Index (ULI)

Level 1: hemorrhaging points ≤ 1mm²

Level 2: 1 to 3mm² ulcerations

Level 3: Deep ulcerations ≥ 3mm²

$$CI\% = \frac{100 - ULI_{\text{treated}} \times 100}{ULI_{\text{control}}}$$

Absolute Ethanol-Induced Ulcer Model

The animals were randomly divided into 5 groups (n=5) of Swiss mice. Carbenoxolone 200 mg/kg (positive control), vehicle (negative control) and EELM extract (100, 250 and 625 mg/kg – test groups) were used for their respective treatments. Each treatment was administered orally at a rate of up to 10 ml/kg. After 60 minutes of treatment, 100 ml/kg of the injurious agent (99.5% ethanol) was administered to all animals orally. After 60 minutes of administering

the injurious agent, all animals were euthanized, and their stomachs were opened for analysis and parameter determination.¹⁵

Acidified Ethanol-induced Ulcer Model

After 24 hours of fasting, Swiss mice were divided into 5 groups (n=5). One group received 200 mg/kg carbenoxolone (positive control), another group received vehicle (negative control) and the others the EELM extract at varying doses (100, 250 and 625 mg/kg – test group). All treatments were performed orally. After 50 minutes, 100 mL/kg weight of acidified ethanol (60% ethanol/ 0.3M HCl) was administered. After 60 minutes of administration of the injurious agent, the animals were euthanized to remove their stomachs and determine the parameters.¹⁶

Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID)- Induced Ulcer Model

To perform the experiment, after 24 hours of fasting, the animals were divided into 5 groups (n=5) of Wistar rats. The treatments were carried out respectively with carbenoxolone 200 mg/kg (positive control), vehicle control (negative control) and EELM at the doses of 100, 250 and 625 mg/kg (test group), orally. After 1h and 30 minutes, the indomethacin inducing agent (100 mg/kg) was administered orally, and 0.2 ml ketoprofen was applied intramuscularly. The animals were euthanized 12 hours after the injurious stimulus for stomach removal and determining parameters.¹⁷

Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m., normality and homogeneity tests were performed, and data distribution was normal for the use of the one-way ANOVA followed by a Dunnett post-test for multiple comparisons. Values were considered significant when $p < 0.05$. The program used for these analyses was GraphPad Prism version 5.01.

Ethical Considerations

The treatment protocols to be performed in this study were submitted to the Ethics Committee for Animal Use of the Federal

University of Amapá CEUA/UNIFAP, approved under opinion no. 0019/2017.

RESULTS

Absolute Ethanol-Induced Gastric Ulcers

The results showed a significant reduction in the EELM doses of 250 and 625 mg/kg in the parameters evaluated as the Total Lesion Area (TLA), the Ulcerative Lesion Index (ULI) and Ulcer Percentage (%), compared to the vehicle controls. In calculating the Wound Healing Percentage (%), the 250 mg/kg dose healed 53.76% and the 625 mg/kg dose healed 84.15%, as can be seen in Figure 1, Graph 1 and Table 1.

Acidified Ethanol-Induced Gastric Ulcers

Animals treated with EELM at doses of 250 and 625mg/kg had a significant reduction in Total Lesioned Area (TLA), Ulcerative Injury Index (ULI), and Percentage of Ulcers (%) compared with the group of animals treated with the vehicle. The Wound Healing Percentages (%) obtained were 20.27% for the 100 mg/kg dose, 54.34% for the 250 mg/kg dose and 83.86% for the 625 mg/kg dose, as can be seen in Figure 2, Graph 2 and Table 2.

Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAIDs)-Induced Gastric Ulcers

Regarding the model of gastric ulcer induction with non-steroidal anti-inflammatory agents (indomethacin 100mg / kg + ketoprofen 0.2mL), when assessing the Total Lesioned Area, Ulcerative Lesion Index (ULI), Percentage of Ulcers (%), all doses of the *L. macrophylla* ethanolic extract (EELM) tested (100, 250, 625 mg/kg) significantly reduced these parameters when compared to the negative control. For the Wound Healing Percentage (%) it was possible to measure 84.45% healing for the 100 mg/kg dose, 75.00% for the 250 mg/kg dose and 72.26% for the 625 mg/kg dose, as may be seen in Figure 3, Graph 3 and Table 3.



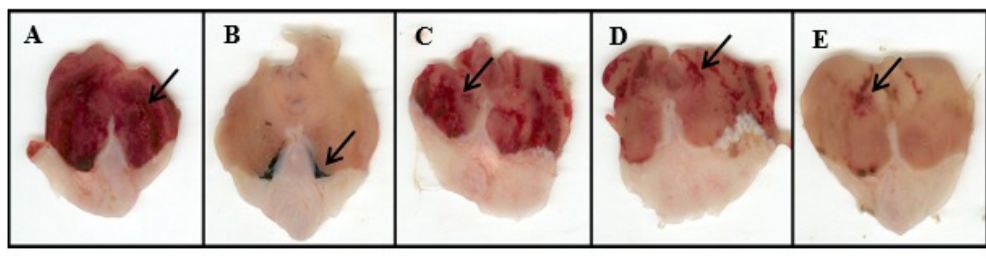
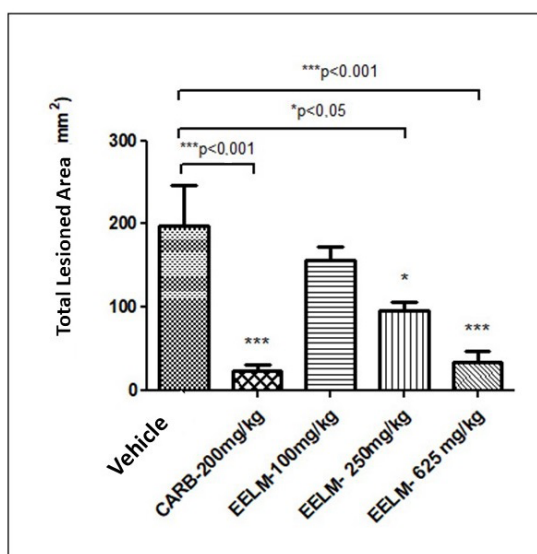


Figure 1 – Stomach images after ulcer induction by absolute ethanol, (A) negative control, (B) positive control; (C) EELM 100 mg/kg; (D) EELM 250 mg/kg; (E) EELM 625 mg/kg.

Graph 1 – Result of the total lesioned area (mm²) parameter in the absolute ethanol-induced gastric ulcer model in mice.



Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. (n=5, per group). One-way Analysis of Variance (ANOVA) was used, followed by Dunnett's test: ***p<0.001 comparing the negative control group (vehicle) vs. CARB (200mg/kg) positive control. *p<0.05 comparing the negative control group (vehicle) vs. EELM (250 mg/kg); ***p<0.001 comparing the negative control group (vehicle) vs. EELM (625 mg/kg).

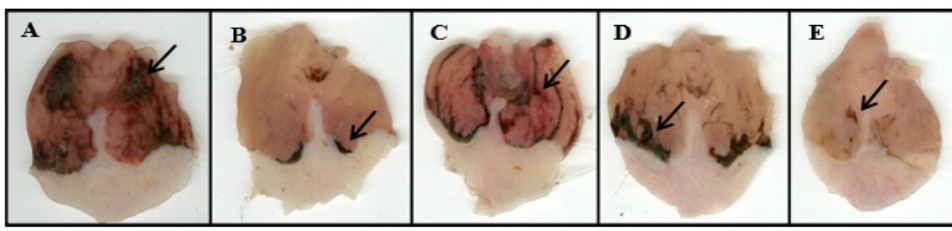
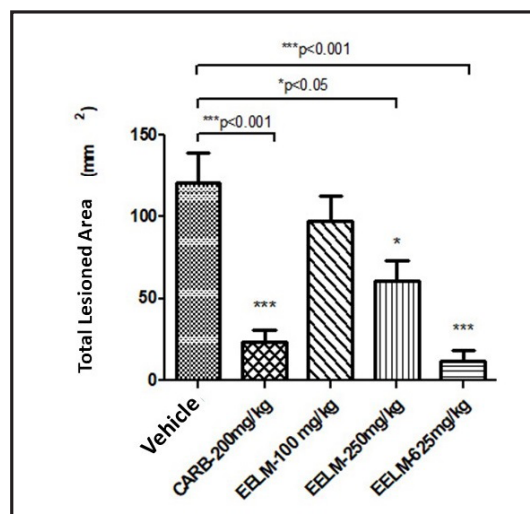


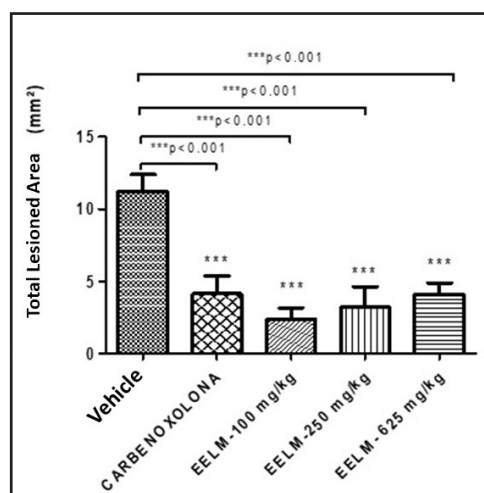
Figure 2 – Stomach images after ulcer induction by acidified ethanol, (A) negative control, (B) positive control; (C) EELM 100 mg/kg; (D) EELM 250 mg/kg; (E) EELM 625 mg/kg.

Graph 2 – Effect of acidified ethanol-induced gastric ulcer model in mice in the total lesioned area (mm²) parameter.



Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m (n=5, per group). One-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Dunnett's test: ***p<0.001 (Vehicle vs. CARB 200mg/kg). *p<0.05 comparing the negative control group (vehicle) vs. extract (250 mg/kg); ***p<0.001 comparing the negative control group (vehicle) vs. extract (625 mg/kg).

Graph 3 – Parameter total lesioned area (mm²) in the NSAID-induced gastric ulcer model in rats.



Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. (n=5, per group). One-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Dunnett's test: ***p<0.001 Vehicle vs. CARB (200mg/kg). ***p<0.001 comparing the negative control group (vehicle) vs. EELM (at doses of 100, 250, 625mg/kg).

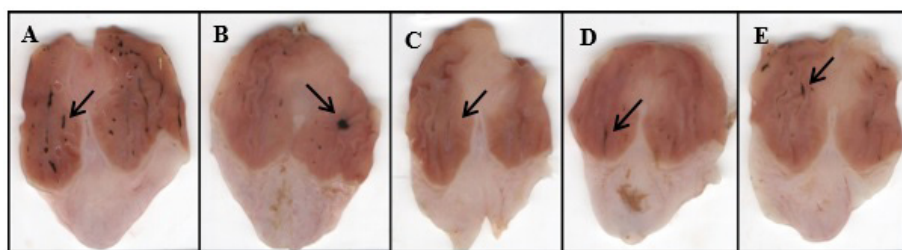


Figure 3 – Stomach images after induction of ulcer by (indomethacin + ketoprofen), (A) negative control; (B) positive control (C) EELM 100 mg/kg; (D) EELM 250 mg/kg; (E) EELM 625 mg/kg.

Table 1 – Absolute ethanol-induced gastric ulcer model in mice concerning the ULI, Ulcer % and Healing % parameters.

Treatment (v.o)	U.L.I.	% of Ulcers	% of Healing
VEHICLE	586.38±19.11	62.64±11.53	0.0±0.00
CARBENOXOLONE	62.72±3.90+++	8.90±2.83***	21.42%±8.45
EELM 100	460.76±4.47	46.87±3.95	21.42%±8.45
EELM 250	271.17±5.64+	31.84±3.92*	53.76%±5.71
EELM 625	92.92±5.82+++	10.79±1.88***	84.15%±1.89

(ANOVA), followed by Dunnett's test: +++p<0.001 comparing the negative control (Vehicle) vs. positive control (CARB 200mg/kg), ILU. +p<0.05 (EELM at 250mg / kg dose) vs. (Vehicle), ILU. +++ p <0.001 (EELM at 625mg / kg dose) vs. (Vehicle). ***p<0.001 Vehicle vs. CARB (200mg/kg), % of Ulcers. *p<0.05 EELM (250 mg/kg) vs. Vehicle, % of ulcers. ***p<0.001 EELM (625 mg/kg) vs. Vehicle, % of ulcers.

Table 2 – Model of acidified ethanol-induced gastric ulcers in mice concerning ULI, % of Ulcers and Wound Healing % parameters.

Treatment (v.o)	U.L.I.	% of Ulcers	% of Healing
VEHICLE	356.21±5.50	51.42±3.94	0.0±0.00
CARBENOXOLONE	62.72±3.90+++	8.90±2.83***	82.39%±1.53
EELM 100	284.01±5.09	31.90±5.74*	20.27%±2.91
EELM 250	169.77±5.14+	21.24±4.60***	52.34%±4.83
EELM 625	57.50±7.92+++	4.19±2.24***	83.86%±2.46

Results are presented as mean ± s.e.m. One-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Dunnett's test: +++p<0.001 comparing the negative control (Vehicle) vs. the positive control (CARB 200mg/kg), ULI. +p<0.05 EELM (250 mg/kg) vs. Vehicle, ULI. +++p<0.001 EELM (625 mg/kg) vs. Vehicle ULI. ***p<0.001 Vehicle vs. CARB (200mg/kg), % of ulcers. *p<0.05 EELM (100 mg/kg) vs. Vehicle, % ulcer. ***p<0.001 EELM (250, 625mg/kg) vs. (Vehicle), % of ulcers.

Table 3 – Model of non-steroidal anti-inflammatory gastric ulcers (NSAIDs) in rats, concerning ULI, % of Ulcers and Wound Healing % parameters.

Treatment (v.o)	U.L.I.	% of Ulcers	% of Healing
VEHICLE	20.21±3.08	2.39±0.31	0.0±0.00
CARBENOXOLONE	5.49 ±1.74++	0.71±0.19***	72.85%±2.42
EELM 100	4.54 ±0.37++	0.40±0.14***	84.46%±1.33
EELM 250	5.05±3.26++	0.63±0.26***	75.00%±3.71
EELM 625	5.61±1.49++	0.68±0.14***	72.27%±2.06

Results are presented as mean ± s.e.m. One-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Dunnett's test: ++p<0.01 Vehicle vs. CARB, ULI ++p<0.01 EELM (at doses of 100, 250, 625mg/kg) vs. Vehicle, ULI.

DISCUSSION

Studies of medicinal plants with possible gastroprotective activities are based on demonstrating the efficacy of new therapeutic alternatives in the treatment or prevention of gastric lesions produced by different harmful agents.

The acute ethanol-induced ulcer model is a primary step in the search for substances with antiulcerogenic potential, as it determines the effectiveness of a test drug, which opens the way for investigating in other models, as well as the mechanisms of action involved in gastroprotective activity¹⁸.

The deleterious effects of ethanol are caused by direct toxic contact to the gastric mucosa compromising its structure by various mechanisms, such as solubilizing the mucus and bicarbonate barrier. This ulcerogenic agent also triggers and inflammatory reaction promoting the release of inflammatory mediators, which induce the activation of granulocytes forming proteases and free radicals, decreasing blood flow thereby causing ischemia, cell death and damage to the gastric mucosa¹⁶.

The acidified ethanol model acts through a local effect on the gastric mucosa. It disrupts its integrity by forming necrotizing lesions by decreasing mucus layer protection, which is caused by the solubilization of the barrier's components releasing access to stomach lumen acid. This model is an appropriate protocol for assessing acute damage^{19,20}.

Studies have disassembled that compounds such as flavonoids are able to protect the gastric mucosa from necrotizing substances and are effective in the treatment of acute and chronic gastric ulcers. Flavonoids have the ability to inhibit specific enzymes and stimulate some hormones and neurotransmitters and sequester free radicals²¹.

The results obtained in this study in the treatments performed within the ulcer models induced by absolute ethanol and

acidified ethanol showed that the groups of animals with the EELM in the respective doses of 100, 250 and 625mg/kg caused a considerable gastroprotective effect; similar to that shown by the standard drug, carbenoxolone. The protective response demonstrated by EELM in the absolute ethanol and acidified ethanol experimental protocols suggests that the extract acts as an antiulcerogenic agent, promoting a significant protection of the gastric mucosa with a dose-dependent response tendency.

In the presented model of gastric ulcer induction by NSAIDs, indomethacin was the first choice because of its high ulcerogenic potential compared to other drugs of the same class of drugs²².

It is pointed out that the effects of NSAIDs are mediated by the inhibition of the type 1 isoform of the enzyme cyclooxygenase (COX-1) and the type 2 isoform of the enzyme cyclooxygenase (COX-2), thereby reducing prostaglandin E1 levels (PGE1) and E2 (PGE2). Thus, the prolonged use of this drug is directly associated with the appearance of gastric lesions²³.

According to the literature, compounds such as tannins can play a role in gastric protection. Authors report that tannins from plant extracts can form a physical barrier in the gastric mucosa by binding to mucus proteins, thus, preventing the formation of ulcers and promote healing^{24,25}.

Another class of mucosal protective compounds are terpenes, which have been reported in studies concerning the antiulcerogenic activity of pentacyclic triterpenes. Terpenes are related to anti-inflammatory activity. This effect occurs through various mechanisms of action such as prostaglandin synthesis (PGs), which are responsible for controlling blood flow, mucus/bicarbonate production and acid secretion among other pathways²⁶.

The results obtained in the NSAID-induced ulcer model showed that all doses tested (100, 250, 625mg/kg) were able to reduce gastric lesions caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs, with the lowest dose showing a significant statistical significance when compared to





the negative control. In this experimental model, there was no dose-dependent activity pattern with the doses tested.

Thus, *L. macrophylla* ethanolic extract acts significantly against mucosal lesions,

potentially exerting a gastroprotective effect as observed by different experimental models. There is a need for further studies to elucidate the mechanisms involved in the gastroprotective activity of the extract.

CONCLUSION

The results showed that the ethanolic extract of *L. macrophylla* in the analyzed doses produce a gastroprotective activity against ulcer models induced by absolute ethanol and acidified ethanol. The gastroprotective effect of the *L. macrophylla* ethanolic extract within the ulcer model induced by non-steroidal

anti-inflammatory drugs showed a significant activity at all doses, especially at the lowest dose tested against the induced lesions. The plant species under study has gastroprotective activity regarding the appearance of gastric ulcers induced by different experimental models.

REFERENCES

1. Kangwan N, Park JM, Kim EH, Hahm KB. Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2014; V. 5, p. 40-47.
2. Amorim MM, Pereira JO, Monteiro KM, Ruiz AL, Carvalho JE, Pinheiro H, et al. Antiulcer and antiproliferative properties of spent brewer's yeast peptide extracts for incorporation into foods. *Food Funct.* 2016; v. 18 n.7 (5) p.2331-7.
3. Bansal VK, Goel RK. Gastroprotective effect of *Acacia nilotica* young seedless pod extract: role of polyphenolic constituents. *Asaian Pac. J. Trop. Med.* 2012; p 523-528.
4. Najim WI. Peptic ulcer disease. *Prim. Care Clin. Office Pract.* 2011; v. 38, p. 383-394.
5. Fox RK, Muniraj T. Pharmacologic therapies in gastrointestinal diseases. *Medical Clinics.* 2016; v. 100, n. 4, p. 827-850.
6. Boltin D, Niv Y. Pharmacological and alimentary alteration of the gastric barrier. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2014; v. 28, p. 981-994.
7. Donatini RS, Ishikawa T, Barros S, Bacchi EM. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2009; v. 19, n. 1a, p. 89-94.
8. Fernandes J, Castilho RO, Costa MR, Wagner-Souza K, Kaplan MAC, Gattass CR. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: Cytotoxicity on Multidrug Resistant and Sensitive Leukemia Cell Lines. *Cancer Letters.* 2003; V. 190, n. 2, p. 165-169.
9. Medeiros, FA. Estudo Fotoquímico e Biológico de Espécies Amazônicas: *Pradosia huberi* (Ducke) (Sapotaceae) e *Licania macrophylla* Benth. (Chrysobalanaceae). Tese (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2008.
10. Medeiros FAD, Medeiros AA, Tavares JF, Barbosa Filho JM, Lima EDO, Silva MSD. Licanol, a new flavanol, and other constituents from the *Licania macrophylla* Benth. *Química Nova.* 2012; v. 35, n. 6, p. 1179-1183.
11. Isaksson JGLA. Propágulos e plântulas de duas *Licania* spp. (chrysobalanaceae) nativas da floresta de várzea estuarina. Monografia (curso de engenharia florestal). Amapá: Universidade do Estado do Amapá; 2015.
12. Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2002; v.79, p.379-381.
13. Neves SMP, Mancini Filho J, Menezes EW. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.
14. Andrade SF, Comunello E, Noldin VF, Monache F, Cechinel Filho V, Niero R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3, 15-Dioxo-21 α -hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). *Archives of Pharmacol Research.* 2008; v. 1, n. 31, p. 41-46.
15. Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto K. Effects of the new antiulcer agente kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. *Japan J. Pharmacology.* 1991; 57, 495-505.
16. Mizui T, Doteuchi M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology.* 1983; v. 33, n. 5, p. 939-945.
17. Rainsford, K. D. Inhibition by leukotriene inhibitors, and calcium and platelet-activating factor antagonists, of acute gastric and intestinal damage in arthritic rats and in cholinomimetic-treated mice. *Journal of pharmacy and pharmacology.* 1999; v. 51, n. 3, p. 331-339.
18. Damasceno SRB, Rodrigues JC, Silva RO, Nicolau LA, Chaves LS, Freitas AL, et al. Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypne musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2013; v.23, n. 2, p. 320-328.
19. Tuorkey M, Karolin K. Anti-ulcer activity of curcumin on experimental gastric ulcer in rats and its effect on oxidative stress/

- antioxidante, IL-6 and anzyme activities. Biomedical and Environmental Sciences. 2009; v. 22, p. 488-485.
20. Li W, Huang H, Niu X, Fan T, Mu Q, Li H. Protective effect of tetrahydrocoptisine againt etanol-induced gastric ulcer in mice. Toxicology and Applied Pharmacology. 2013; v.272, p. 21-29.
21. Zayachkivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, Konturek PC, Brzozowski T, Ghegotsky MR. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. Journal Physiology Pharmacology.2005; v.56, p. 219-231.
22. Suleyman H, Albayrak A, Bilici M, Cadirci E, Halici Z. Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. Inflammation. 2010, v. 33, n. 4, p. 224-234.
23. Halter F, Tarnawski AS, Schamassman A, Peskar BM. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversies and perspectives. Gut.2001; v. 49, n. 3, p. 443-453.
24. Da Silva LM. Mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos.Dissertação (Mestrado em farmacologia). Curitiba-PR: Universidade Federal do Paraná, 2010.
25. Vasconcelos PCP, Andreo MA, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. Effect of Mouriri pusa tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. Journal of ethnopharmacology.2010; v. 131, n. 1, p. 146-153.
26. Szabo, S. Gastric cytoprotection is still relevant. Journal of Gastroenterology and Hepatoly. 2014; V.29, n.9, p.124-132.



Atividade antiulcerogênica do extrato etanólico de *Licania macrophylla* Benth

Priscila Faimann Sales*

Patrícia de Almeida Nóbrega*

Alessandra Azevedo do Nascimento*

Felipe Ricardo Ferreira Brito Corrêa**

Giuvanna Nascimento de Veiga Cabral**

Eginna Gonçalves da Silva***

824



Resumo

A espécie *Licania macrophylla* Benth, conhecida popularmente como “anauerá”, “anuera”, “anoerá”, “ana-wyra” e “wayãpi” amplamente encontrada na Amazônia, onde comunidades ribeirinhas utilizam diferentes partes da planta para como o tratamento de amebíase, distúrbios disentéricos, ação cicatrizante e anti-inflamatória. O presente estudo tem como objetivo investigar a atividade gastroprotetora do extrato etanólico da casca do caule de *L. macrophylla* em animais experimentais. Para tanto, foram realizados modelos experimentais distintos para a indução da úlcera gástrica como o etanol absoluto (99,5%), etanol acidificado (60%/0, 3M de HCl), e o modelo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (indometacina). Neste estudo para os modelos experimentais etanol absoluto e acidificado foram utilizados Camundongos Swiss fêmeas 25-30g para o modelo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais foram utilizados ratos Wistar fêmeas 200-300g. Cada modelo experimental foi dividido em grupos de cinco (5) animais para cada doses testadas do extrato de *L. macrophylla* (100, 250 e 625 mg/kg), bem como para o grupo controle negativo (veículo) e positivo (carbenoxolona), todas as administrações foram realizadas via oral, obedecendo a uma relação de volume de no máximo 10 ml/kg de peso corporal para camundongos e de 100ml/kg para ratos. Após cada experimento, os estômagos foram avaliados para determinação dos seguintes parâmetros: área total da lesão, percentagem de úlcera, índice de lesões ulcerativas; percentagem de cura. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Dunnett, considerando os valores significativos quando $p < 0,05$. O extrato etanólico de *L. macrophylla* apresentou efeito gastroprotetor contra as lesões gástricas induzidas pelo etanol absoluto, reduzindo significativamente nas doses (250 e 625 mg/kg) os parâmetros estabelecidos, promovendo uma porcentagem de cura de $(53,76\% \pm 5,71$ e $84,15\% \pm 1,89)$. Para o protocolo experimental realizado com o etanol acidificado os resultados mostraram que os animais tratados com o extrato etanólico de *L. macrophylla* nas doses de (250 e 625mg/kg) diminuiu significativamente ao analisar os parâmetros estabelecidos, obtendo como porcentagem de cura de $(52,34\% \pm 4,83$ e $83,86\% \pm 2,46)$. O extrato etanólico de *L. macrophylla* no modelo de indução de lesão gástrica por anti-inflamatório não esteroide, foi capaz de reduzir significativamente para todas as doses testadas (100, 250 e 625 mg/kg) os parâmetros estabelecidos, com porcentagem de cura (%) de $(84,46\% \pm 1,33$; $75,00\% \pm 3,71$ e $72,27\% \pm 2,06)$. Em conclusão, o extrato de *L. macrophylla* apresenta ação antiulcerogênica nos modelos de indução por etanol absoluto e acidificado, bem como para o modelo de úlcera induzido por drogas anti-inflamatórias não esteroidais com expressiva atividade gastroprotetora.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Extrato bruto. Anauerá. Úlcera gástrica.

INTRODUÇÃO

As úlceras gástricas são lesões que ocorrem na parede do estômago tendo como características sangramentos e perfurações¹, são distúrbios progressivos que possuem grande impacto sobre a qualidade de vida do

paciente².

O surgimento das úlceras gástricas é considerado um processo multifatorial que decorre do desequilíbrio entre os fatores agressores e os protetores da mucosa. Em

DOI: 10.15343/0104-7809.20194304814833

*Universidade Federal do Amapá - PPGCS/UNIFAP. Macapá/AP, Brasil.

**Universidade Federal do Amapá/UNIFAP. Macapá- AP, Brasil.

***Faculdade Estácio de Macapá. Macapá- AP, Brasil.

E-mail: pfaimann@gmail.com





meio aos fatores agressores há a secreção de ácido, pepsina e radicais livres que se originam a partir de estímulos relacionados a condições de vida como o estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais - DAINES, ingestão de determinados alimentos e presença da *Helicobacter pylori*. Dentre os fatores protetores temos a barreira de muco, bicarbonato, óxido nítrico (NO), fluxo sanguíneo, prostaglandinas e defesa antioxidante^{2,3}.

O tratamento das úlceras baseia-se no restabelecimento do equilíbrio dos fatores protetores e agressores visando a eliminação da dor, promovendo a cicatrização e prevenindo o aparecimento de úlceras reincidentes. Com o avanço do entendimento da patogênese das úlceras pépticas surgiram várias classes de medicamentos como os inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol) antagonistas do receptor H₂ (cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina), antibióticos nos casos de infecção por *H. pylori* (amoxicilina). Outros fármacos surgiram para atuar na proteção da mucosa como agentes citoprotetores (carbenoxolona, sucralfato, bismuto coloidal) e o (misoprostol) análogo das prostaglandinas^{4,5}.

A terapia medicamentosa para o tratamento da úlcera gástrica confirma alto índice de reincidências da patologia, além de apresentar significativos efeitos colaterais⁶. Contudo, a procura por novas substância derivadas de produtos naturais tem sido uma das principais fontes de descoberta de novos fármacos com potencial efeito terapêutico mais eficaz e seguro. As plantas medicinais são fontes de compostos bioativos, como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, carotenoides e compostos fenólicos. Tais compostos contêm diversas atividades biológicas, destacando-se especialmente compostos como flavonoides, terpenóides e taninos, aos quais é atribuída à atividade antiulcerogênica⁷.

A espécie *Licania macrophylla* Benth, pertencente à família *Chrysobalanaceae*, conhecida popularmente como “anauerá”, “anuera”, “anoerá”, “ana-wyra” e “wayãpi”, é uma árvore de grande porte que pode atingir até 30 m de altura. Na Amazônia é utilizada popularmente para várias finalidades, como

potente antidisentérico, na ação cicatrizante de ferimentos, para tratamento de amebíase e na atividade anti-inflamatória. Segundo a literatura não foram reportados relatos de sua atividade antiulcerogênica^{8,9,10,11}.

A espécie *L. macrophylla* apresenta em sua composição química compostos como flavanóides, chalconas e auronas, quinonas, esteróides livres e taninos^{8,9,12}. Em estudo realizado com o extrato metanólico das cascas do caule e folhas de *L. macrophylla* apresentou atividade contra cepas bacterianas testadas com *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*⁹. Devido o possível potencial terapêutico desta espécie, este estudo levanta o seguinte problema: o extrato etanólico da espécie possui atividade gastroprotetora?

MATERIAIS E MÉTODOS

As cascas do caule da espécie *L. macrophylla* foram coletadas em um terreno de várzea na comunidade do Maracá, localizada no rio Urubuzinho, nas seguintes coordenadas (Lat. 0°24'46.83 S Long. 51°27'5.36 O), 32km de distância partindo do Município de Mazagão Velho-AP via fluvial. O material para estudo foi encaminhado para o Laboratório de Experimentação Animal (LEA), da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Foi preparada exsiccata para a identificação da espécie e depositada no Herbário Amapaense (HAMAB) do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), Macapá-AP.

Para a obtenção do extrato etanólico de *L. macrophylla* as cascas do caule sofreram secagem em estufa a 40° C, por 72h. O material foi fragmentado e triturado em moinho de facas e transformado em pó, o qual passou por um processo de maceração a frio utilizando como solvente etanol na proporção 1 kg de pó para cada 5L de etanol (1:5, peso/volume) com agitação a cada 24h, durante 7 dias. A solução extrativa obtida foi filtrada e concentrada em rota evaporador a uma temperatura próxima a 50° C, obtendo-se um extrato viscoso que foi armazenado em recipiente para a evaporação



residual do solvente até a obtenção do extrato seco/bruto de *L. macrophylla* (EELM). O extrato obteve um rendimento de 10,6%. Para a realização do experimento o extrato foi pesado e solubilizado em uma solução de (DMSO 5%) para a obtenção de diferentes concentrações.

Drogas e Reagentes Utilizados

Para determinação da atividade e mecanismo de ação antiulcerogênica foram utilizados: ácido clorídrico P.A (Alphatec), bicarbonato de sódio (Alphatec), cloreto de sódio (Alphatec), Cetoprofeno (Sanofi) indometacina (Sigma Aldrich), carbenoxolona (Sigma Aldrich), xilazina (Vetbrands), quetamina (Ceva), álcool etanólico (Alphatec), álcool etílico P.A (Alphatec), dimetilsulfóxido-DMSO (Prolab). Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas pesando entre 200-300 gramas (n=25) e Camundongos Swiss (*Mus musculus albinus*) fêmeas com 6-7 semanas de vida, pesando 25-30 gramas (n=50). Os animais foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas na Área da ciência de Animais de Laboratório- CEMIB da Universidade de Campinas- UNICAMP. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental por um período de 7-10 dias, sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), umidade ($50 \pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração da marca Presence® e água filtrada, para a realização dos experimentos.

Para a eutanásia dos animais após os experimentos foi utilizado Ketamina e Xilasina 40 e 5 mg/kg respectivamente assim como para a anestesia, administrados via intraperitoneal, de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Resolução Normativa Nº 13, de 20 de setembro de 2013. Os descartes das carcaças procederam conforme o item 1.6 do Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório da FCF-IQ/USP de 2013.¹³

Delineamento Experimental

Na avaliação da atividade antiulcerogênica

do extrato foram realizados experimentos de indução de úlcera gástrica com base em fatores etiológicos da doença no homem como etanol absoluto, etanol acidificado, AINEs. Cada modelo experimental conteve seus respectivos grupos controles negativo/veículo (Dimetilsulfóxido-DMSO 5%), controle positivo (carbenoxolona 200 mg/kg) e grupos testes com três níveis de dose (100, 250, 625 mg/kg) do EELM. Os animais submetidos a jejum foram mantidos em gaiola especial com tela de arame ao fundo (para evitar coprofagia).

Ao fim de cada protocolo experimental os estômagos foram retirados, abertos através da grande curvatura, lavados em solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e escaneados para a obtenção das imagens (escâner HP G4050). Após o escaneamento as imagens obtidas foram analisadas utilizando o software específico "EARP" para medir as áreas de lesões e determinar os seguintes parâmetros: (a) área total da lesão (ATL), (b) porcentagem de área de lesão em relação à área do estômago total, (c) índice de lesões ulcerativas (ILU); (d) porcentagem inibição ou cura¹⁴.

(a) Σ Área Total da Lesão (mm²) (ATL);

(b) Porcentagem de Úlceras: Porcentagem de Área de Lesão em relação à Área do Estômago Total;

$$\% = \frac{\Sigma \text{Área da lesão} \times 100}{\text{Área Total do estômago}}$$

(c) Índice de Lesões Ulcerativas (ILU);

Nível 1: pontos hemorrágicos $\leq 1\text{mm}^2$

Nível 2: ulcerações de 1 a 3mm^2

Nível 3: ulcerações profundas $\geq 3\text{mm}^2$

$$\text{ILU} = (\Sigma \text{Nível 1}) + (2 \times \Sigma \text{Nível 2}) + (3 \times \Sigma \text{Nível 3})$$

(d) Porcentagem Inibição ou Cura;

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



Modelo de Indução de Úlcera por Etanol absoluto

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=5) de camundongos Swiss. Para seus respectivos tratamentos foi utilizado a carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo), veículo (controle negativo) e o extrato EELM nas doses de (100, 250 e 625 mg/kg - teste). Cada tratamento foi administrado por via oral obedecendo a uma relação de no máximo 10 ml/kg. Após 60 minutos do tratamento foi administrado 100 ml/kg do agente lesivo (etanol 99,5%) em todos os animais por via oral. Transcorrido 60 minutos da administração do agente lesivo, todos os animais foram eutanasiados e os estômagos abertos para a análises dos estômagos e determinação dos parâmetros¹⁵.

Modelo de Indução de Úlcera por Etanol acidificado

Após 24 horas de jejum os animais, camundongos Swiss, foram divididos em 5 grupos (n=5) um grupo de animais recebeu carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo), outro grupo recebeu veículo (controle negativo) e os demais o extrato EELM nas doses (100, 250 e 625 mg/kg - teste). Todos os tratamentos foram realizados por via oral. Após 50 minutos foi administrado etanol acidificado (etanol 60%/0,3M de HCl) 100 mL/kg de peso. Após 60 minutos da administração do agente lesivo, os animais foram eutanasiados para a retirados os estômagos e determinação dos parâmetros¹⁶.

Indução de Úlcera por Droga Anti-inflamatória Não Esteroidal (DAINE)

Para realização do experimento, após 24 horas de jejum os animais foram divididos em 5 grupos (n=5) de ratos Wistar. Os tratamentos foram realizados respectivamente com carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo) e veículo (controle negativo) e o EELM nas doses de (100, 250 e 625 mg/kg - teste), por via oral. Após 1h e 30 minutos foi administrado o agente indutor indometacina (100 mg/kg), por via oral e 0,2 mL de cetoprofeno (intramuscular). Os animais foram eutanasiados 12 horas após o estímulo lesivo para a retirada dos estômagos e determinação dos parâmetros¹⁷.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m, o teste de normalidade e homogeneidade foram realizados, a distribuição dos dados foi normal para a utilização do teste paramétrico de Análise de Variância uma via (ANOVA one-way) seguida pelo pós-testes de Dunnett para comparações múltiplas. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O programa utilizado para estas análises foi GraphPad Prism versão 5.01.

Considerações Éticas

Os protocolos de tratamentos a serem realizados neste estudo foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá CEUA/UNIFAP, aprovado sob parecer 0019/2017.

RESULTADOS

Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol Absoluto

Os resultados obtidos apresentaram uma redução significativa nas doses do EELM de (250 e 625 mg/kg) nos parâmetros avaliados como a Área Total Lesionada (ATL), o Índice de Lesão Ulcerativa (ILU) e Percentagem de Úlcera (%), frente aos tratados com veículo. Ao calcular a Percentagem de Cura (%) obteve-se especialmente (53,76 %) para a

dose de 250 mg/kg e (84,15%) para a dose de 625 mg/kg, conforme pode ser observado na Figura 1, Gráfico 1 e Tabela 1.

Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol Acidificado

Os animais tratados com EELM nas doses de (250 e 625mg/kg) tiveram uma redução significativa da Área Total Lesionada (ATL), Índice de Lesão Ulcerativa (ILU) e Percentagem



de Úlceras (%) ao comparar com o grupo de animais tratados com o veículo. Para a Percentagem de Cura (%) obteve-se (20,27%) para a dose de 100mg/kg, (54,34%) para a dose de 250 mg/kg e (83,86%) para a dose de 625 mg/kg, conforme pode ser observado na Figura 2, Gráfico 2 e Tabela 2.

Úlceras Gástricas Induzidas por Anti-inflamatórios não Esteroidais (AINES)

Quanto ao modelo de indução de úlceras gástricas com o agente lesivo anti-inflamatório não esteroidal (indometacina

100mg/kg + cetoprofeno 0,2mL), ao avaliar a Área Total lesionada, Índice de Lesão Ulcerativa (ILU), Percentagem de Úlceras (%) o extrato etanólico de *L. macrophylla* (EELM) reduziu de forma significativa todas as doses testadas respectivamente (100, 250, 625 mg/kg) quando comparado ao controle negativo. Para a Porcentagem de Cura (%) foi possível aferir para a dose de 100 mg/kg com (84,45%), para a dose de 250 mg/kg com (75,00%) e para a dose de 625 mg/kg foi de (72,26%) conforme a Figura 3, Gráfico 3 e Tabela 3.

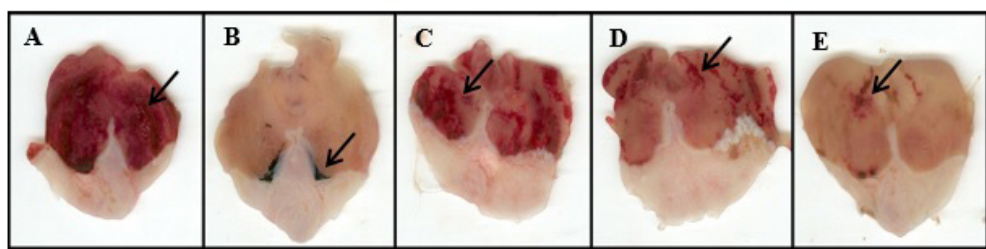
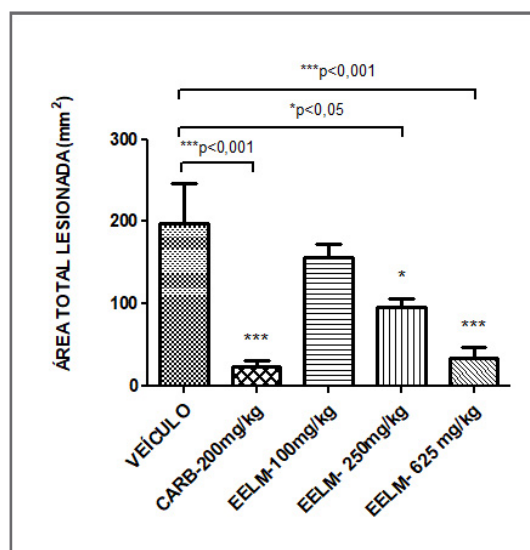


Figura 1 – Imagens dos estômagos após indução de úlcera por etanol absoluto, (A) controle negativo; (B) controle positivo; (C) EELM 100 mg/kg; (D) EELM 250 mg/kg; (E) EELM 625 mg/kg.

Gráfico 1 – Resultado do parâmetro área total lesionada (mm²) no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.



Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=5, por grupo). Foi utilizada a Análise de Variância de uma Via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett: ***p<0,001 comparando o grupo controle negativo (Veículo) vs. (CARB 200mg/kg) controle positivo. *p<0,05 comparando o grupo controle negativo (veículo) vs. (EELM 250 mg/kg); ***p<0,001 comparando o grupo controle negativo (veículo) vs. (EELM 625 mg/kg).

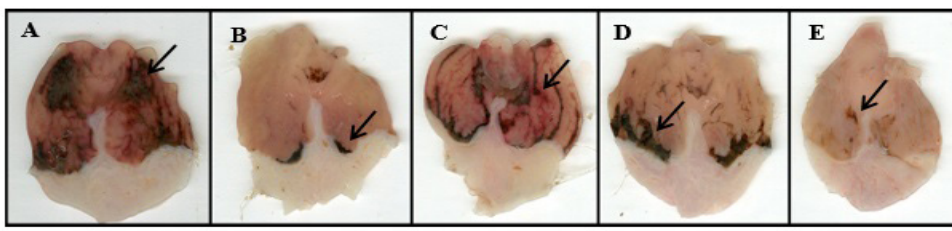
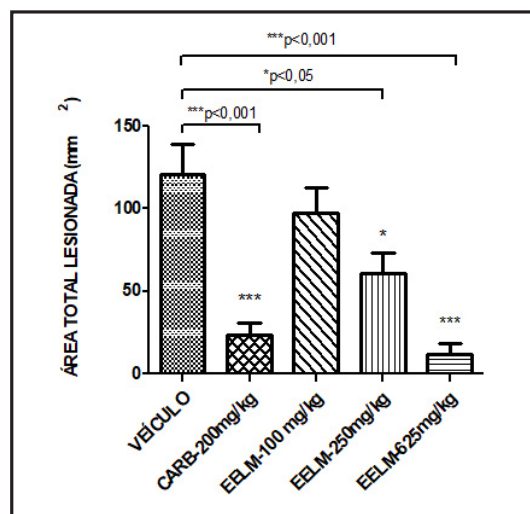


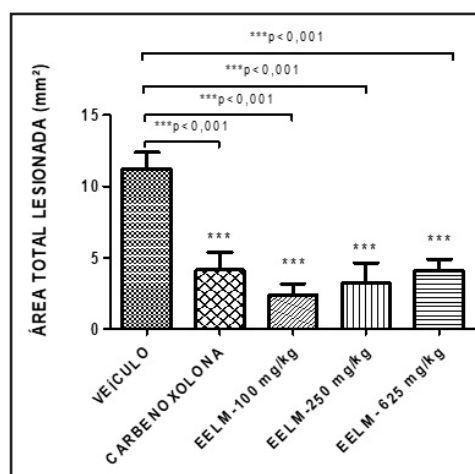
Figura 2 – Imagens dos estômagos após indução de úlcera por etanol acidificado, (A) controle negativo; (B) controle positivo; (C) EELM 100 mg/kg; (D) EELM 250 mg/kg; (E) EELM 625 mg/kg.

Gráfico 2 – Efeito do modelo de úlceras gástricas induzida por etanol acidificado em camundongos, sobre o parâmetro área total lesionada (mm²).



Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=5, por grupo). Foi utilizada a Análise de Variância de uma Via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett: ***p<0,001 (Veículo vs. CARB 200mg/kg); *p<0,05 comparado o grupo controle negativo (veículo) vs. extrato (250 mg/kg); ***p<0,001 comparado o grupo controle negativo (veículo) vs. extrato (625 mg/kg).

Gráfico 3 – Parâmetro área total lesionada (mm²) no modelo de úlceras gástricas induzida por AINE's em ratos.



Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=5, por grupo). Foi utilizada a Análise de Variância de uma Via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett: ***p<0,001 (Veículo) vs. (CARB 200mg/kg); ***p<0,001 comparado o grupo controle negativo (veículo) vs. (EELM nas doses de 100, 250, 625mg/kg).

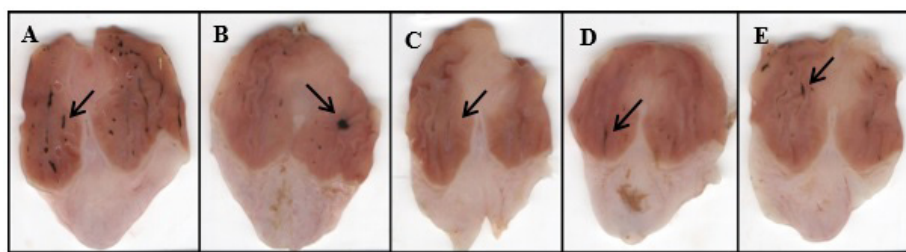


Figura 3 – Imagens dos estômagos após indução de úlcera por (indometacina + cetoprofeno), (A) controle negativo; (B) controle positivo (C) EELM 100 mg/kg; (D) EELM 250 mg/kg; (E) EELM 625 mg/kg.

Tabela 1 – Modelo de úlceras gástricas induzida por etanol absoluto em camundongos, sobre os parâmetros ILU, % de Úlceras e % de Cura.

Tratamento (v.o)	I.L.U	% de Úlceras	% de Cura
VEÍCULO	586,38±19,11	62,64±11,53	0,0±0,00
CARBENOXOLONA	62,72±3,90+++	8,90±2,83***	21,42%±8,45
EELM 100	460,76±4,47	46,87±3,95	21,42%±8,45
EELM 250	271,17±5,64+	31,84±3,92*	53,76%±5,71
EELM 625	92,92±5,82+++	10,79±1,88***	84,15%±1,89

Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=5, por grupo). Foi utilizada a Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett: +++p<0,001 comparação do controle negativo (Veículo) vs. (CARB 200mg/kg) controle positivo, ILU. +p<0,05 (EELM na dose 250mg/kg) vs. (Veículo), ILU. +++p<0,001 (EELM na dose 625mg/kg) vs. (Veículo). ***p<0,001 (Veículo) vs. (CARB 200mg/kg) % de Úlceras. *p<0,05(EELM nas doses de 250 mg/kg) vs. (Veículo) % de úlcera. ***p<0,001(EELM nas doses de 625 mg/kg) vs. (Veículo)% de úlcera.

Tabela 2 – Modelo de úlceras gástricas induzida por etanol acidificado em camundongos, sobre os parâmetros ILU, % de Úlceras e % de Cura.

Tratamento (v.o)	I.L.U	% de Úlceras	% de Cura
VEÍCULO	356,21±5,50	51,42±3,94	0,0±0,00
CARBENOXOLONA	62,72±3,90+++	8,90±2,83***	82,39%±1,53
EELM 100	284,01±5,09	31,90±5,74*	20,27%±2,91
EELM 250	169,77±5,14+	21,24±4,60***	52,34%±4,83
EELM 625	57,50±7,92+++	4,19±2,24***	83,86%±2,46

Os resultados são apresentados como média ± e.p.m. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett: +++p<0,001 comparação controle negativo (Veículo) vs. (CARB 200mg/kg) controle positivo, ILU. +p<0,05(EELM nas doses de 250 mg/kg) vs. (Veículo), ILU. +++p<0,001(EELM nas doses de 625 mg/kg) vs. (Veículo) ILU. ***p<0,001(Veículo) vs. (CARB 200mg/kg) % de úlceras. *p<0,05(EELM nas doses de 100 mg/kg) vs. (Veículo)% de úlcera. ***p<0,001(EELM nas doses de 250, 625mg/kg) vs. (Veículo) % de úlcera.

Tabela 3 – Modelo de úlceras gástricas induzida por anti-inflamatório não esteroidal (AINE's) em ratos, sobre os parâmetros ILU, % de Úlceras e % de Cura.

Tratamento (v.o)	I.L.U	% de Úlceras	% de Cura
VEÍCULO	20,21±3,08	2,39±0,31	0,0±0,00
CARBENOXOLONA	5,49 ±1,74++	0,71±0,19***	72,85%±2,42
EELM 100	4,54 ±0,37++	0,40±0,14***	84,46%±1,33
EELM 250	5,05±3,26++	0,63±0,26***	75,00%±3,71
EELM 625	5,61±1,49++	0,68±0,14***	72,27%±2,06

Os resultados são apresentados como média ± e.p.m. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett: ++p<0,01 (Veículo) vs. (CARB), I.L.U. ++p<0,01(EELM nas doses de 100, 250, 625mg/kg) vs. (Veículo), ILU. ***p<0,001(Veículo) vs. (CARB 200mg/kg) % de Úlcera. ***p<0,001(EELM nas doses de 100, 250, 625 mg/kg) vs. (Veículo) % de úlcera.

DISCUSSÃO

Os estudos de plantas medicinais com possíveis atividades gastroprotetoras fundamentam-se em demonstrar a eficácia de novas alternativas terapêuticas no tratamento ou prevenção de lesões gástricas produzidas por diferentes agentes lesivos.

O modelo agudo de úlcera induzido por etanol é etapa primária na pesquisa de substâncias com potencial antiulcerogênico, pois indica a efetividade da droga teste possibilitando a investigação em outros modelos, bem como os mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora¹⁸.

Os efeitos deletérios do etanol são causados pelo contato tóxico direto à mucosa gástrica comprometendo sua estrutura por vários mecanismos, como solubilizar a barreira de muco e bicarbonato, este agente ulcerogênico desencadeia também reação inflamatória promovendo a liberação de mediadores inflamatórios, os quais induzem a ativação de granulócitos formando proteases e radicais livres, diminuindo o fluxo sanguíneo provocando dessa forma isquemia, morte de células e danos a mucosa gástrica¹⁶.

O modelo por etanol acidificado atua através de um efeito local na mucosa gástrica, causando transtorno a sua integridade formando-se lesões necrosantes pela diminuição da proteção a camada de muco, ocasionado pela solubilização dos componentes desta barreira o que dá acesso ao ácido do lúmen estomacal. Sendo um protocolo apropriado para avaliar danos agudos^{19,20}.

Estudos desmontaram que compostos como os flavonoides são capazes de proteger a mucosa gástrica de substâncias necrotizantes, sendo eficazes no tratamento de úlceras gástricas agudas e crônicas. À medida que, possuem a capacidade de inibir enzimas específicas e estimular alguns hormônios e neurotransmissores, além de sequestrar radicais livre²¹.

Os resultados obtidos neste trabalho nos tratamentos realizados nos modelos de úlceras induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado demonstraram que os grupos de animais com o EELM nas respectivas doses

de (100, 250 e 625mg/kg) ocasionou um efeito gastroprotetor considerável, sendo este efeito semelhante ao demonstrado pela carbenoxolona uma droga padrão. A resposta protetora apresentada por EELM nos protocolos experimentais etanol absoluto e etanol acidificado sugere que o extrato atue como agente antiulcerogênico, promovendo uma proteção expressiva da mucosa gástrica com uma tendência de resposta dose-dependente.

No modelo apresentado de indução de úlcera gástrica por AINEs, a droga indometacina é a primeira escolha pelo seu alto potencial ulcerogênico em comparação a outros fármacos da mesma classe de medicamentos²².

Aponta-se que os efeitos dos AINEs são mediados pela a inibição da isoforma do tipo 1 da enzima ciclogênase (COX-1) como da isoforma tipo 2 da enzima ciclogênase (COX-2) promovendo dessa forma a redução dos níveis de prostaglandinas E1 (PGE1) e E2 (PGE₂). Dessa maneira o uso prologado desse fármaco está associado diretamente ao surgimento de lesões gástricas²³.

De acordo com a literatura, compostos como os taninos podem atuar na proteção gástrica, autores relatam que os taninos em extratos vegetais podem formar barreira física na mucosa gástrica ligando-se em proteínas do muco, podendo assim evitar a formação de úlceras e promover a cicatrização^{24,25}.

Outra classe de compostos que atuam na proteção da mucosa são os terpenos, como na atividade antiulcerogênica de triterpenos pentacíclicos relatada em estudos¹⁴. Os terpenos estão relacionados a atividade anti-inflamatória, uma vez que este efeito ocorre por vários mecanismos de ação como a síntese de prostaglandinas (PGs) responsáveis por controlar o fluxo sanguíneo, a produção de muco/bicarbonato e a secreção ácida entre outras vias²⁶.

Os resultados obtidos no modelo de úlceras induzidas por AINEs demonstraram que todas as doses testadas (100, 250, 625mg/kg) foram capazes de reduzir as lesões gástricas causadas pelos anti-inflamatórios não esteroidais, destacando-se a menor dose com expressiva





significância estatística quando comparada ao controle negativo. Neste modelo experimental não apresentou padrão de atividade dose dependente nas doses testadas.

Dessa forma, o extrato etanólico de *L. macrophylla* atua de maneira significativa frente

às lesões da mucosa, exercendo potencial gastroprotetor por diferentes modelos experimentais. Ressalta-se a necessidade de estudos complementares para a elucidação dos mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora do extrato.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram que o extrato etanólico da *L. macrophylla* nas doses analisadas possui atividade gastroprotetora frente aos modelos de úlceras induzidos por etanol absoluto e etanol acidificado. Quanto ao efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *L. macrophylla* frente ao modelo de úlcera induzido

por drogas anti-inflamatórias não esteroidais demonstrou atividade significativa em todas as doses, especialmente na menor dose testada contra as lesões induzidas. A espécie em estudo apresenta atividade gastroprotetora quanto surgimento de úlceras gástricas induzidas por diferentes modelos experimentais.

REFERÊNCIAS

1. Kangwan N, Park JM, Kim EH, Hahm KB. Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2014; V. 5, p. 40-47.
2. Amorim MM, Pereira JO, Monteiro KM, Ruiz AL, Carvalho JE, Pinheiro H, et al. Antiulcer and antiproliferative properties of spent brewer's yeast peptide extracts for incorporation into foods. *Food Funct.* 2016; v. 18 n.7 (5) p.2331-7.
3. Bansal VK, Goel RK. Gastroprotective effect of *Acacia nilotica* young seedless pod extract: role of polyphenolic constituents. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2012; p 523-528.
4. Najim WI. Peptic ulcer disease. *Prim. Care Clin. Office Pract.* 2011; v. 38, p. 383-394.
5. Fox RK, Muniraj T. Pharmacologic therapies in gastrointestinal diseases. *Medical Clinics.* 2016; v. 100, n. 4, p. 827-850.
6. Boltin D, Niv Y. Pharmacological and alimentary alteration of the gastric barrier. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2014; v. 28, p. 981-994.
7. Donatini RS, Ishikawa T, Barros S, Bacchi EM. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2009; v. 19, n. 1a, p. 89-94.
8. Fernandes J, Castilho RO, Costa MR, Wagner-Souza K, Kaplan MAC, Gattass CR. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: Cytotoxicity on Multidrug Resistant and Sensitive Leukemia Cell Lines. *Cancer Letters.* 2003; V. 190, n. 2, p. 165-169.
9. Medeiros, FA. Estudo Fotoquímico e Biológico de Espécies Amazônicas: *Pradosia huberi* (Ducke) (Sapotaceae) e *Licania macrophylla* Bent. (Chrysobalanaceae). Tese (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2008.
10. Medeiros FAD, Medeiros AA, Tavares JF, Barbosa Filho JM, Lima EDO, Silva MSD. Licanol, a new flavanol, and other constituents from the *Licania macrophylla* Benth. *Química Nova.* 2012; v. 35, n. 6, p. 1179-1183.
11. Isaksson JGLA. Propágulos e plântulas de duas *Licania* spp. (Chrysobalanaceae) nativas da floresta de várzea estuarina. Monografia (curso de engenharia florestal). Amapá: Universidade do Estado do Amapá; 2015.
12. Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2002; v.79, p.379-381.
13. Neves SMP, Mancini Filho J, Menezes EW. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.
14. Andrade SF, Comunello E, Noldin VF, Monache F, Cechinel Filho V, Niero R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3, 15-Dioxo-21 α -hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). *Archives of Pharmacol Research.* 2008; v. 1, n. 31, p. 41-46.
15. Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto K. Effects of the new antiulcer agent kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. *Japan J. Pharmacology.* 1991; 57, 495-505.
16. Mizui T, Doteuchi M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology.* 1983; v. 33, n. 5, p. 939-945.
17. Rainsford, K. D. Inhibition by leukotriene inhibitors, and calcium and platelet-activating factor antagonists, of acute gastric and intestinal damage in arthritic rats and in cholinomimetic-treated mice. *Journal of pharmacy and pharmacology.* 1999; v. 51, n. 3, p. 331-339.
18. Damasceno SRB, Rodrigues JC, Silva RO, Nicolau LA, Chaves LS, Freitas AL, et al. Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypne musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2013; v.23, n. 2, p. 320-328.
19. Tuorkey M, Karolin K. Anti-ulcer activity of curcumin on experimental gastric ulcer in rats and its effect on oxidative stress/

- antioxidante, IL-6 and anzyme activities. Biomedical and Environmental Sciences. 2009; v. 22, p. 488-485.
20. Li W, Huang H, Niu X, Fan T, Mu Q, Li H. Protective effect of tetrahydrocoptisine againt etanol-induced gastric ulcer in mice. Toxicology and Applied Pharmacology. 2013; v.272, p. 21-29.
21. Zayachkivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, Konturek PC, Brzozowski T, Ghegotsky MR. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. Journal Physiology Pharmacology.2005; v.56, p. 219-231.
22. Suleyman H, Albayrak A, Bilici M, Cadirci E, Halici Z. Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. Inflammation. 2010, v. 33, n. 4, p. 224-234.
23. Halter F, Tarnawski AS, Schamassman A, Peskar BM. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversies and perspectives. Gut.2001; v. 49, n. 3, p. 443-453.
24. Da Silva LM. Mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos.Dissertação (Mestrado em farmacologia). Curitiba-PR: Universidade Federal do Paraná, 2010.
25. Vasconcelos PCP, Andreo MA, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. Effect of Mouriri pusa tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. Journal of ethnopharmacology.2010; v. 131, n. 1, p. 146-153.
26. Szabo, S. Gastric cytoprotection is still relevant. Journal of Gastroenterology and Hepatoly. 2014; V.29, n.9, p.124-132.

